

Детальный анализ (до 100 компонентов в одном анализе и до десятка диагностируемых заболеваний в одном образце) позволяет полностью избежать или снизить количество применяемых радиационных методов диагностики.

Невозможно обойтись без ХМС и в разработке новых лекарственных средств. На этапах доклинических и клинических испытаний она позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью определять ксенобиотики и их метаболиты в сложных биоматрицах лабораторных животных и человека для решения вопросов фармакокинетики, фармакодинамики, био-

доступности. На примере отражено ВЭЖХ/МС определение нового лекарственного средства для лечения болезни Паркинсона и нового препарата антиагреганта, а также идентификация и количественная оценка их метаболитов в плазме крови и моче.

Высокоспецифичный, точный и быстрый ХМС анализ большого количества образцов с высокой достоверностью и отсутствием помех от сопутствующих веществ делает метод незаменимым в ряде определений метаболитов эндогенных веществ организма и ксенобиотиков.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ ГИБРИДНОГО БЕЛКА ГЛАРГИН-ИНСУЛИНА ИЗ КУЛЬТУРЫ *Escherichia coli*

В. Д. Аликова<sup>1,2</sup>, Т. С. Герасимова<sup>2</sup>, Д. А. Гусаров, А. П. Чернова<sup>1</sup>  
Научные руководители – к.х.н. Д. А. Гусаров; к.х.н., доцент А. П. Чернова

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский политехнический университет  
634050, Россия, г. Томск, проспект Ленина, дом 30, [alikova@tpu.ru](mailto:alikova@tpu.ru)

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева  
125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, дом 9

Биосинтез рекомбинантного белка в культуре *Escherichia coli* часто связан с образованием белковых агрегатов *in vivo* в виде телец включения (ТВ) [1]. Образование телец включения внутри клетки защищает терапевтический белок от протеаз. Однако дальнейший процессинг, включающий солюбилизацию и рефолдинг белка из ТВ, может быть лимитирующей стадией эффективного производства биоактивного белка с использованием технологии рекомбинантных ДНК [2]. Как правило, тельца включения солюбилизируются при использовании высоких концентраций денатурантов, таких как мочевины или гидрохлорид гуанидина, вместе с восстановителем, таким как ДТТ или β-меркаптоэтанол [3]. Солюбилизация телец включения с использованием высоких концентраций хаотропов приводит к полному нарушению третичной структуры белка. Это в ряде случаев способствует мисфолдингу и агрегации целевых молекул. Потеря третичной структуры при солюбилизации и взаимодействие между денатурированными белковыми молекулами, приводящее к их агрегации, считаются основными причинами плохого извлечения биоактивных белков из телец включения [4].

Цель данной работы – исследование оптимальных условий солюбилизации гибридного белка гларгин-инсулина из культуры *Escherichia coli*.

Для работы был использован штамм инсулина на основе непатогенной *E. coli* BL21. В качестве хаотропного агента использовали мочевины в концентрации от 2 до 8 М, в качестве восстановителя дисульфидных связей – дитиотреитрол (ДТТ) с концентрацией от 0,1 до 10 мМ.

Чтобы найти оптимальные для солюбилизации концентрацию хаотропного агента и диапазон рН, тельца включения суспендировали в водном буфере при различных значениях рН в присутствии возрастающих концентраций мочевины.

Тельца включения пасты гибридного белка (ГБ) с содержанием основного компонента 15 мг/мл суспендировали при значениях рН от 7 до 12 в воде очищенной. Растворимость (%) рассчитывали путем измерения концентрации солюбилизированного белка по методу Брэдфорда [5].

Для определения оптимального количества восстанавливающего агента тела включения растворяли в денатурирующем буфере с разным

количеством ДТТ. Поскольку максимальная солюбилизация была достигнута при pH 11,0 следующие исследования проводили при значении  $11,0 \pm 0,5$ . Анализ SDS-PAGE проводили на 15 % (масса/объем) акриламидном геле по методу Лэммли.

Заметное растворение гибридного белка было при увеличении pH с 9 до 12. Более высокая степень растворения наблюдалась при до-

бавлении в раствор мочевины 4 М при pH 10–11. Дальнейшее возрастание концентрации мочевины не привело к увеличению солюбилизации. Резкое количественное уменьшение олигомеров наблюдалось с увеличением содержания ДТТ от 0,1 до 3 мМ. Дальнейшее увеличение концентрации реагента не привело к видимым изменениям, в связи с чем оптимальным для солюбилизации телец было принято значение  $3,0 \pm 0,5$  мМ.

### Список литературы

1. Williams D. C., Van Frank R. M., Muth W. L., Burnett J. P. Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science*, 1982; 215 : 687–9.
2. Sadana A. Review: Protein refolding and inactivation during bioseparation: Bioprocessing implications. *Biotechnol Bioeng*, 1995; 48 (5) : 481–9.
3. Marston F. A., Hartley D. L. Solubilization of protein aggregates. *Methods Enzymol*, 1990; 182 : 264–76.
4. Dill K. A., Shortle D. Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem*, 1991; 60 : 795–825.
5. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*, 1976. – V. 72. – № 1–2. – С. 248–254.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИЙ *Micrococcus luteus 1-u* НА ЁМКОСТЬ ДВОЙНОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО СЛОЯ МЕЖФАЗНОЙ ГРАНИЦЫ «ЭЛЕКТРОД-ЭЛЕКТРОЛИТ» МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИМПЕДАНСА

Д. Ю. Амшеев, И. А. Топчий

Научный руководитель – к.х.н., доцент А. В. Кашевский

*Иркутский государственный университет*

664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1; [rector@isu.ru](mailto:rector@isu.ru)

Изучение процессов адсорбции различных микроорганизмов играет большую роль в биотехнологии, и, в частности, при разработке и производстве биотопливных элементов – одной из наиболее перспективных областей альтернативной энергетики [1].

Для исследований подобных систем в последнее время часто используют спектроскопию электрохимического импеданса, большими преимуществами которой являются неdestructивность по отношению к адсорбированным микроорганизмам и возможность анализа при стационарном состоянии биотопливного элемента.

Таким образом, всё вышеперечисленное делает тему настоящей работы перспективной и актуальной задачей.

В качестве объектов исследования использовались стеклоуглеродный электрод (СУ) марки СУ-2000 и угольно-пастовый электрод (УПЭ) на основе графитового порошка и силиконовой жидкости в качестве связующего вещества. Рабочими растворами являлись модельная сточная вода (МСВ) с pH  $\approx 7,7$  и содержанием субстрата  $\text{CH}_3\text{COONa}$  равным 50 мг/дм<sup>3</sup>, а также бактериальные суспензии *M. luteus 1-u* на основе МСВ с pH  $\approx 8,8$ .

Полученные экспериментальные данные анализировались с помощью эквивалентных схем – последовательности идеализированных электрических элементов, которые обеспечивают такие же параметры выходного тока, как и исследуемая система.