

Шеметова А.Ф., Черкашин Е.А.

## ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора», Москва

**Введение.** ДНК-зависимая ДНК-полимераза — это фермент, катализирующий синтез новой цепи ДНК на матрице ДНК. ДНК-полимераза не только участвует в поддержании целостности генома и передаче генетической информации в живых организмах, но и широко используются в биотехнологии (для проведения реакции секвенирования, клонирования мутагенеза и т.д.). В основе многих методов молекулярной биологии лежит использование полимеразной цепной реакции (ПЦР). В зависимости от целей, в ПЦР можно использовать разные полимеразы. Стандартный фермент, используемый в ПЦР - Taq-полимераза, впервые была выделена из экстремально термофильной бактерии *Thermus aquaticus*.

Taq-полимераза - термостабильный фермент, не инактивирующийся при высокотемпературной денатурации ДНК и обладающий несколькими видами ферментативной активности: полимеразной, экзонуклеазной, эндонуклеазной. При получении новых ферментов необходимо охарактеризовать их по активности. В настоящее время «золотым стандартом» определения ферментативной активности является радиоактивный способ.

Однако у данного способа есть ряд ограничений, касающихся работы с радиоактивными изотопами. В литературе описан метод измерения активности ферментов, основанный на применении интеркалирующих красителей с последующим измерением уровня флуоресценции.

**Результаты.** Кинетика ферментов-это изучение скоростей химических реакций, катализируемых ферментами. В кинетике ферментов измеряется скорость реакции и исследуются эффекты изменения условий протекания реакции. Изучение кинетики фермента таким образом может выявить каталитический механизм этого фермента, его роль в ПЦР.

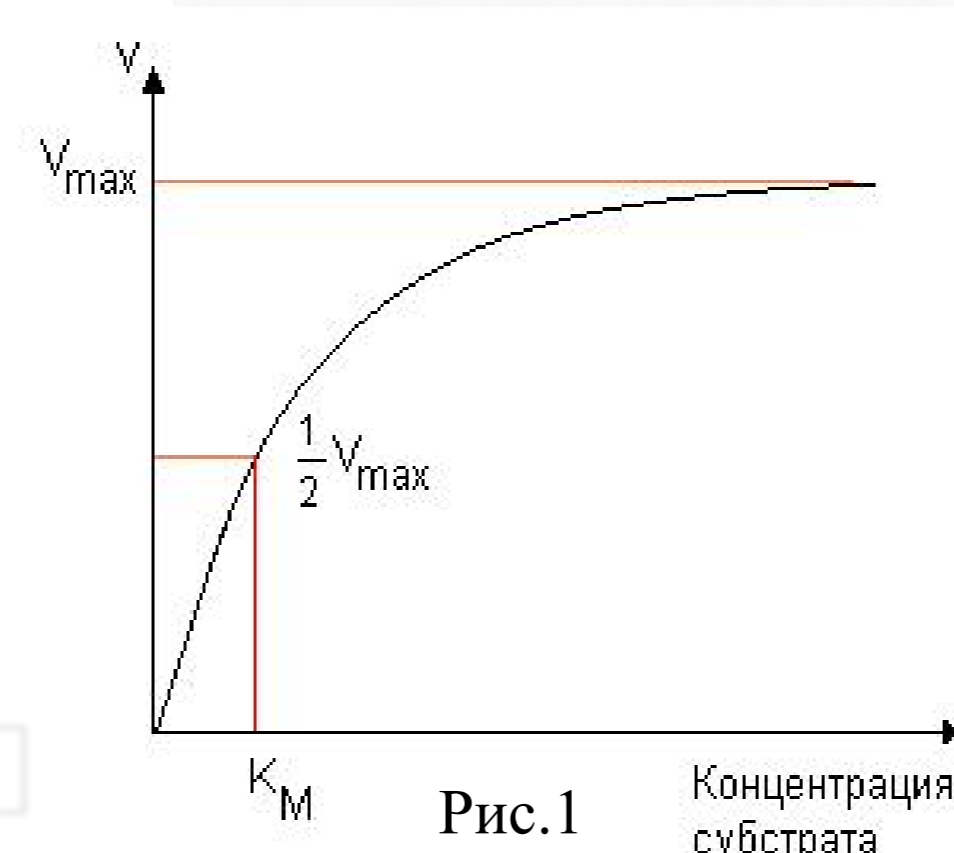
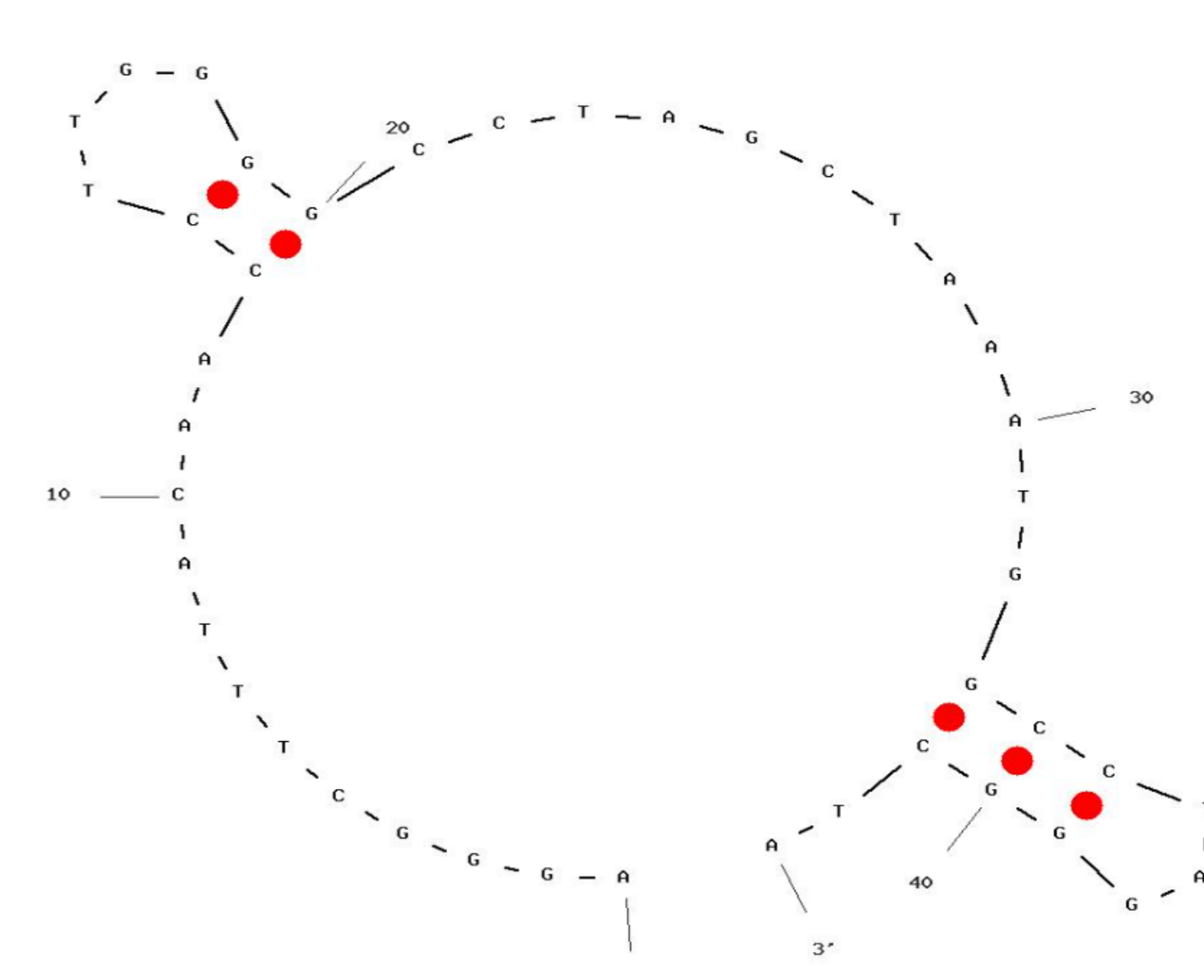
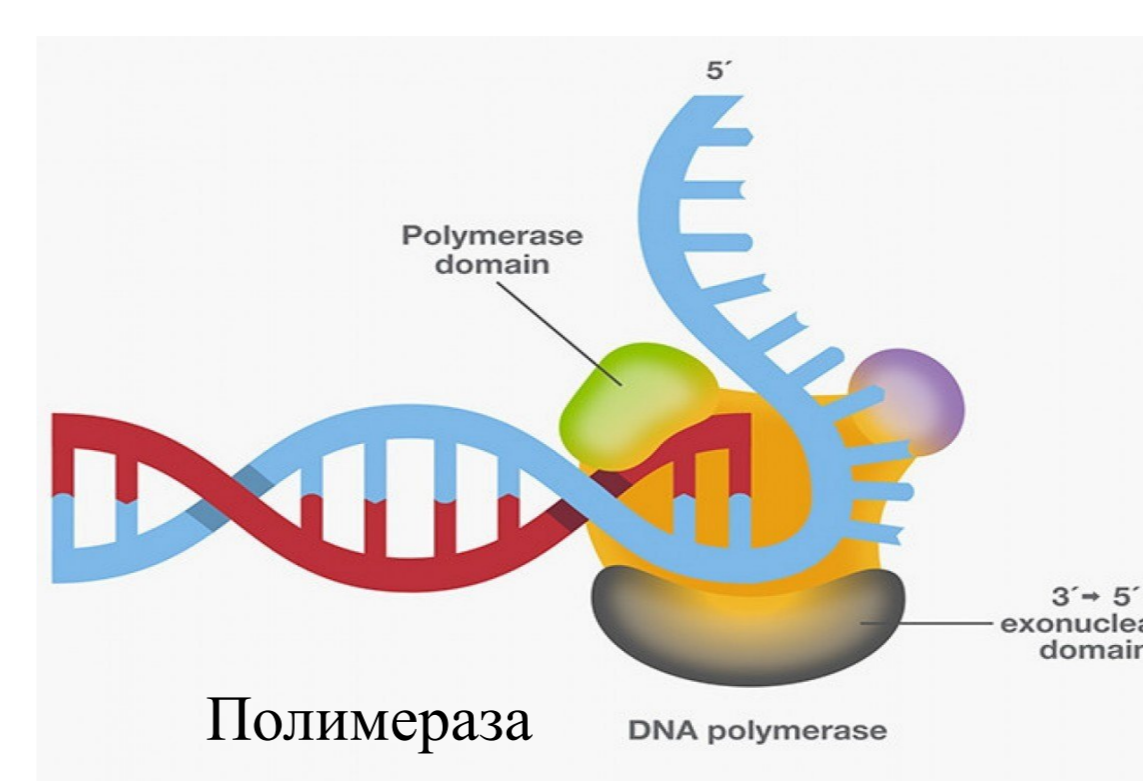
Два важных свойства кинетики фермента - это то, насколько легко фермент может быть насыщен субстратом, и максимальная скорость, которой он может достичь. Скорость ферментативной реакции зависит от многих факторов: от концентрации субстрата и фермента, температуры, pH среды, наличия различных регуляторных веществ, способных увеличивать или снижать активность ферментов. График зависимости активности фермента от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса – Ментен, которое получило свое название в честь выдающихся ученых Л.Михаэлиса и М.Ментен, внесших большой вклад в исследование кинетики ферментативных реакций (рис.1). По сравнению с методом ПЦР уровень активности показывает не только концентрацию фермента, но и его работу в ПЦР.

До настоящего времени не было широко известной и принятой в научном мире не радиоактивной методики измерения активностей. Работу ферментов принято оценивать в ПЦР, что является правильным, но помимо данных показателей для более глубокого анализа, проработки и изменений характеристик фермента нужны и данные кинетических значений, которые способны нам дать определяемые активности. С помощью методики измерения активностей можно определить концентрацию тестируемого фермента, более того, возможно подобрать минимальную концентрацию для работы в ПЦР, что поможет сократить уровень расхода фермента.

**Цель.** Создание инструмента для возможности более детализированного описания характеристик ферментов, что повысит возможность более эффективно и продуктивно работать с ними.

**Материалы и методы.** Был проведен литературный обзор на тему данной проблематики. В качестве объектов исследования были использованы рекомбинантные ферменты производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. В качестве стандарта были использованы коммерческие ферменты компаний NEB (США) и Promega (США). В качестве термостабируемого флуориметра использовался амплификатор в реальном времени CFX96 (Bio Rad). Методом анализа и подбора олигонуклеотида (Рис. 2) и зонда нужной структуры и характеристик были подобраны подходящие условия реакции. Активности можно измерять как в одной пробирке, так и по отдельности. В процессе работы была проведена корреляция между данными ПЦР и данными измеренных активностей, которые оказались сопоставимыми.

**Новизна.** До настоящего времени не было широко известной и принятой в практическом применении не радиоактивной методики измерения активностей. Работу ферментов принято оценивать в ПЦР, что является правильным, но помимо данных показателей для более глубокого анализа, проработки и изменений характеристик фермента нужны и данные кинетических значений, которые способны нам дать определяемые активности. С помощью методики измерения активностей можно определить концентрацию тестируемого фермента, более того, возможно подобрать минимальную концентрацию для работы в ПЦР, что поможет сократить уровень расхода фермента.



### Результаты измерения лот 1 (2019 г.в.) и лот 2 (2022 г.в.) лотов полимеразы

