

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра аналитической химии

ДОЛГАЯ

Стефания Сергеевна

**ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И СВОЙСТВА
ТРАНКИРОВАННОЙ ДНК-ЭКЗОТРАНСФЕРАЗЫ**

Дипломная работа

Научные руководители:
кандидат химических наук,
доцент И.В. Мельситова,
научный сотрудник

ИБОХ НАН Беларуси
А.Б. Саченко

Допущена к защите

«___» _____ 2024 г.

Зав. кафедрой аналитической химии,
доктор химических наук, доцент М. Ф. Заяц

Минск, 2024

РЕФЕРАТ

Дипломная работа состоит из 50 страниц, в том числе 19 рисунков, 3 таблиц, 1 приложения, 50 использованных источников.

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И СВОЙСТВА ТРАНКИРОВАННОЙ ДНК-ЭКЗОТРАНСФЕРАЗЫ

Объект исследования: фермент терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза.

Цель работы: получение и исследования свойств рекомбинантных препаратов транкированных ДНК-экзотрансфераз.

Методы исследования: спектрофотометрические, хроматографические, масс-спектрометрические.

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT) представляет собой уникальную разновидность матрице независимых ДНК-полимераз, обладающую перспективами для осуществления программируемого ферментативного *de novo* синтеза ДНК. Несмотря на исследования в течение 60 лет, свойства и механизм действия фермента все ещё недостаточно изучен для белковой инженерии.

В данной работе описано получение рекомбинантных препаратов нативной TdT и транкированных на 100 и 138 N-концевых аминокислот. С помощью масс-спектрометрии MALDI, электрофореза в денатурирующих условиях и динамического рассеяния света (DLS) подтверждено выделение ферментов и соответствие их молекулярной массе. Впервые изучена термостабильность транкированных ферментов с помощью методов дифференциально сканирующей флуориметрии и DLS, а также ферментативная активность в присутствии субстратов различной длины и при добавлении катионов различной природы. Представленные в работе результаты представляют большой интерес для прикладной биотехнологии и важны для расширения границ практического применения TdT.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца складаецца з 50 старонак, у тым ліку 19 малюнкаў, 3 табліц, 1 дадатку, 50 выкарыстаных крыніц.

ГЕТЭРАЛАГІЧНАЯ ЭКСПРЭСІЯ, АЧЫСТКА І ЎЛАСЦІВАСЦІ ТРАН-КОВАНАЙ ДНК-ЭКЗАТРАНСФЕРАЗЫ

Аб'ект даследавання: фермент тэрмінальная дэзоксінуклеатыдылтрансфераза.

Мэта працы: атрыманне і даследаванне ўласцівасцяў рэкамбінантных прэпаратаў транкіраваных ДНК-экзатрансфераз.

Метады даследавання: спектрафотаметрычныя, храматаграфічныя, мас-спектраметрычныя.

Тэрмінальная дэзоксінуклеатыдылтрансфераза (TdT) уяўляе сабой унікальную разнавіднасць матрыц незалежных ДНК-полімераз, якая валодае перспектывамі для ажыццяўлення праграмуемага ферментатыўнага *de novo* сінтэзу ДНК. Нягледзячы на даследаванні на працягу 60 гадоў, уласцівасці і механізм дзеяння фермента ўсё яшчэ недастаткова вывучаны для бялковай інжынерыі.

У дадзенай працы апісана атрыманне рэкамбінантных прэпаратаў натыўнай TdT і транкіраваных на 100 і 138 N-канцавых амінакіслот. З дапамогай мас-спектраметрыі MALDI, электрофарэзу ў дэнатурыруюшчых умовах і дынамічнага рассеявання святла (DLS) пацверджана вылучэнне ферментаў і адпаведнасць іх малекулярнай масе. Упершыню вывучана тэрмастабільнасць транкіраваных ферментаў з дапамогай метадаў дыферэнцыяльнай сканіруючай флуарыметрыі і DLS, а таксама ферментатыўная актыўнасць у прысутнасці субстратаў рознай даўжыні і пры дабаўленні катыёнаў рознай прыроды. Прадстаўленыя ў працы вынікі ўяўляюць вялікую цікавасць для прыкладной біятэхналогіі і важны для пашырэння межаў практычнага прымянення TdT.

ABSTRACT

The diploma work consists of 50 pages, including 19 figures, 3 tables, 1 supplement, 50 sources used.

HETEROLOGICAL EXPRESSION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF TRUNCATED DNA-EXOTRANSFERASE

The object of study: the enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase.

The purpose of the work: Isolate and study the properties of recombinant truncated DNA-exotransferases.

Research methods: spectrophotometric, chromatographic, mass spectrometric.

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) is a kind of template-free DNA-polymerase promising programmable enzymatic *de novo* DNA synthesis. Despite 60 years of research, the properties and mechanism of action of the enzyme are still not well understood for protein engineering.

This work describes the isolation of recombinant proteins of native TdT and truncated at 100 and 138 N-terminal amino acids. Using MALDI mass spectrometry, denaturing electrophoresis and dynamic light scattering (DLS), were confirmed the enzymes molecular weights and isolation. For the first time, the thermal stability of truncated enzymes was studied using differential scanning fluorimetry and DLS methods, as well as enzymatic activity in the presence of substrates of various lengths and with the addition of cations of different natures. The results presented in this work are of great interest for applied biotechnology and are important for expanding the boundaries of practical application of TdT.