

REDISCOVERING CYANOBACTERIA AS VALUABLE SOURCES OF BIOACTIVE COMPOUNDS

© 2010 г. R. Prasanna*, A. Sood**, P. Jaiswal*, S. Nayak*, V. Gupta*, V. Chaudhary*, M. Joshi*, C. Natarajan*

**Division of Microbiology & Centre for Conservation and Utilization of Blue-Green Algae Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, 110012, India*

e-mail: radhapr@gmail.com

***Department of Botany, University of Delhi, Delhi, 110007, India*

e-mail: anjulisood@gmail.com

Received January 16, 2009

Cyanobacteria are a simple, but primitive and diverse group of microorganisms, with characteristics in common to both bacteria and algae. Their success as a group in a wide range of habitats has been attributed to their unique physiological characters and high adaptive ability under a wide range of environmental conditions. The potential of cyanobacteria as a source of a variety of compounds such as polysaccharides, lipids, proteins, vitamins, sterols, enzymes, pharmaceuticals and other fine chemicals is well recognized, and their demand is now on an increasing trend. This compilation reviews the salient advances in the discovery of bioactive compounds from cyanobacteria and their significance in agriculture and industry.

ВЛИЯНИЕ ЛЕЦИТИНА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ФЛАВОНОИДОВ И α -ТОКОФЕРОЛА

© 2010 г. Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Л. Н. Шишкина

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва 119334

e-mail: lim@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 23.04.2009 г.

Изучено влияние лецитина, широко используемого в качестве пищевой добавки, на эффективность ингибирующего действия природных антиоксидантов (кверцетин, дигидрокверцетин, α -токоферол) в зависимости от скорости генерирования свободных радикалов в модельных реакциях окисления. Установлено, что при инициированном и автоокислении метилолеата лецитин уменьшал антиоксидантную эффективность флавоноидов, величина эффекта увеличивалась с ростом концентрации лецитина. В аналогичных условиях при ингибировании окисления смесями α -токоферола и лецитина последний либо не влиял на антиоксидантную эффективность токоферола (аддитивность), либо приводил к увеличению эффективности ингибирования (синергизм).

КЛОНИРОВАНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТ-СИНТАЗЫ (*phaC*) *Ralstonia eutropha* B5786

© 2010 г. И. В. Кожевников*, Т. Г. Волова**, Тран Хаи***, А. Штайнбюхель***

**Сибирский федеральный университет, Красноярск 660036*

***Институт биофизики СО РАН, Красноярск 660036*

e-mail: volova45@mail.ru

****Институт молекулярной микробиологии и биотехнологии, Мюнстер, Германия*

Поступила в редакцию 14.07.2009 г.

Клонирован и охарактеризован ген полигидроксиалканоат (ПГА)-синтазы класса I (*phaC*) бактерий *Ralstonia eutropha* B5786, характеризующихся редкой способностью синтезировать на моноуглеродном субстрате многокомпонентные ПГА, содержащие коротко- и среднецепочечные мономеры. Проведено

сопоставление молекулярной структуры ПГА-синтаз с субстратной специфичностью и способностью штаммов накапливать ПГА той или иной структуры. Гомология ПГА-синтазы исследованного штамма *R. eutropha* B5786 и фермента близкородственного штамма *R. eutropha* H16, способного включать в ПГА среднепечочный мономер гидроксигексаноат только при наличии в среде гексаноата в качестве ко-субстрата, составила 99%. Сопоставление структуры ПГА-синтазы штамма B5786 с синтазами микроорганизмов, синтезирующих коротко- и среднепечочные ПГА, показало уровень гомологии от 26 до 41%: гомология с синтазой *Rhodospirillum rubrum* — 41%; *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* — 26%, *Aeromonas punctata* — 40%, *Thiococcus pfennigii* — 28%, *Rhodococcus ruber* — 38% и с синтазами PhaC1 и PhaC2 *Pseudomonas* sp. 61-3 — 34 и 37% соответственно. Это позволяет считать, что отсутствует прямая связь между молекулярной организацией ПГА-синтаз и их функциональными особенностями, а именно способностью синтезировать ПГА той или иной структуры.

FUNCTION ANALYSIS OF A NEW TYPE I PKS-SAT DOMAIN BY SAT-EAT DOMAIN REPLACEMENT

© 2010 г. Y. L. Jiao*, L. H. Wang**, B. H. Jiao**, S. J. Wang*, Y. W. Fang*, S. Liu*

*College of Marine Sciences, HuaiHai Institute of Technology, Lianyungang, China 222005

**Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences

Second Military Medical University, Shanghai, 200433 China

e-mail: laioni1980@126.com

Received March 31.2009

The function of a new starter unit acyltransferase (SAT) domain SAT-EF080951 (GenBank accession number) encoded in a new type I polyketide synthase (PKS) gene cluster EF568935 (GenBank accession number) isolated for this study was analyzed by domain replacement with an extender unit AT (EAT) domain of avermectin PKS. It was shown that the SAT-EF080951 incorporated malonyl-CoA specifically in vivo, which contradicted the specificity that we had previously determined by substrate binding test in vitro. The result of this study indicates that type I PKS-SAT can alter its specificity in vivo and functions well in extender units and proved the feasibility of the SAT-EAT domain replacement in type I PKS. We propose that SAT-EAT replacement strategy could be a novel route for increasing the diversity of new polyketides combinatorially biosynthesized. The new type I PKS-SAT-EF080951 studied herein may be further employed for related studies on enzymology or combinatorial biosynthesis of polyketides.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМАЯ FRET-ПАРА НА ОСНОВЕ ТЕРБИЙСВЯЗЫВАЮЩЕГО ПЕПТИДА И КРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА

© 2010 г. Л. Р. Арсланбаева*, В. В. Жердева*, Т. В. Ивашина**, Л. М. Винокуров***, А. Л. Русанов*, А. П. Савицкий*

*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: apsavitsky@inbi.ras.ru

**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пуццоно, 142290

***Филиал института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Пуццоно, 142290

Поступила в редакцию 09.10.2009 г.

Разработана генетически кодируемая FRET-пара на основе тербийсвязывающего пептида и красного флуоресцентного белка DsRed2. Для изучения индуктивно-резонансного переноса энергии внутри FRET-пары получена генно-инженерная конструкция, содержащая в единой рамке считывания последовательности, кодирующие тербийсвязывающий пептид и красный флуоресцентный белок DsRed2. Изучена экспрессия этой конструкции в штамме *E. coli* BL21 (DE3) и оптимизированы условия синтеза, выделения и очистки рекомбинантного белка. Методом динамического светорассеяния определен гидродинамический радиус гибридного белка. Методами фосфоресцентной спектроскопии подтвержден перенос энергии между сенсibilизированным тербием и красным флуоресцентным белком DsRed2. Полученную FRET-пару можно использовать как для исследований in vitro, так и в качестве репортера в живых клетках.

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ФЕНОЛЬНЫХ ЛИПИДОВ

©2010 г. Ю. А. Николаев, И. А. Борзенков, М. В. Калинин, Н. Г. Лойко, А. Л. Тарасов, В. К. Плакунов, С. С. Беляев, Н. В. Воронина, В. Ф. Гальченко, Г. И. Эль-Регистан

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН

Москва, 117312, e-mail: nikolaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 17.06.2009 г.

Показана связь антимикробной эффективности фенольных липидов с их гидрофобностью (растворимостью) и гидрофобностью поверхностных структур клеток микроорганизмов. Наибольшей эффективностью против *Staphylococcus aureus*, с гидрофильной клеточной стенкой, обладала смесь амфифильных ди(оксифенил)-фенил-метанов, действующая бактериостатически при 15 мг/л. Против *Mycobacterium smegmatis*, с гидрофобной клеточной стенкой, был более эффективен гидрофобный 2,4-диалкилоксибензол 70 мг/л. Гексилрезорцин (ГР) останавливал развитие грамположительных бактерий при концентрациях 20—50 мг/л, грамотрицательных бактерий — при 65 мг/л, *M. smegmatis* — при 70 мг/л, дрожжи и грибы — при 300 мг/л. ГР предотвращал прорастание бациллярных спор при концентрациях 25—100 мг/л. Исследована зависимость антибактериального действия изомеров и гомологов алкилрезорцинов, от их структуры — числа, расположения и длины алкильных заместителей.

МЕТИЛОВЫЙ ЭФИР СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ - НОВЫЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИТ ОБЛИГАТНОЙ МЕТИЛОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ *Methylophilus quaylei*

© 2010 г. Е. А. Терехова, Н. А. Степичева, А. Б. Пшеничникова, В. И. Швец

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Москва, 117571, e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2009 г.

В культуральной жидкости и в составе клеточных липидов облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* в оптимальных для роста условиях и условиях осмотического стресса обнаружены метиловые эфиры жирных кислот, свободные жирные кислоты, углеводороды. Основной внеклеточный гидрофобный метаболит — метилстеарат. Свободные жирные кислоты C₁₆—C₁₈ и их метиловые эфиры, добавленные экзогенно, стимулировали рост, продукцию экзополисахарида и выживаемость *Methylophilus quaylei* в условиях осмотического и окислительного стрессов, выполняя функции факторов роста и адаптогенов. По способности стимулировать рост бактерий гидрофобные добавки располагались в ряду C_{18:1} > C_{18:0} > C_{16:0} > метилолеат > метилстеарат > без добавок > C_{14:0} > C_{12:0}. Обсуждается механизм протекторного действия жирных кислот и их метиловых эфиров.

БИОСИНТЕЗ БИОПРОТЕКТОРА ЭКТОИНА АЭРОБНЫМИ МЕТИЛОТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ ИЗ МЕТАНОЛА

© 2010 г. Н. В. Доронина, В. А. Ежов, А. П. Бесчастный, Ю. А. Троценко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пущино, 142290

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 04.03.2009 г.

Впервые показано, что нейтрофильные метилобактерии *Methylophaga thalassica* и *M. marina* имеют более высокие скорости роста и уровни накопления эктоина по сравнению с галоалкалофильными видами *M. alcalica*, *M. natronica*, а также метанотрофами *Methylomicrobium alcaliphilum* и *M. kenyense*. Оптимизированы условия культивирования *M. thalassica* на среде с метанолом. Достигнуты показатели процесса: абсолютно сухая биомасса — 60 г/л с содержанием эктоина 15—19% (9—11 г/л). Разработана схема экстракционного выделения и очистки эктоина из биомассы, позволяющая получать препараты разной степени чистоты.

ПРОТЕКТОРНОЕ И РЕАКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВОГО ЭКЗОМЕТАБОЛИТА НА КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ, ИНАКТИВИРОВАННЫЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

© 2010 г. Л. И. Воробьева, Е. Ю. Ходжаев

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 119899

e-mail: lvvorobjeva@mail.ru

Поступила в редакцию 12.03.2009 г.

Установлено, что штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* и *Candida utilis* образуют белковые экзометаболиты, проявляющие протекторное и реактивирующее действие на облученные УФ клетки дрожжей. Защитный эффект предварительно облученного УФ ("активированного") белкового экзометаболита всех штаммов увеличивался в 2—3 раза, а его реактивирующая активность при этом не изменялась. Клетки дрожжей *Yarrowia lipolytica*, выделенные из ареалов с высокой суточной радиацией, и *Endomyces magnusii* — облигатные паразиты грибов, отличались наиболее высокой устойчивостью к действию УФ-излучения, по сравнению с другими исследованными штаммами, но не образовывали экзометаболитов с антистрессовой активностью. Реактивирующий фактор (РФ) *Luteococcus casei* проявлял перекрестное защитное и реактивирующее действие в отношении облученных УФ клеток *S. cerevisiae*, *K. lactis* и *C. utilis* и не был активен в отношении *Y. lipolytica* и *E. magnusii*. С использованием киллерного и некиллерного штамма *S. cerevisiae* показано, что аккумуляция пептидного экзометаболита не связана с токсинообразованием.

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛИФОСФАТОВ ПРИ СИНТЕЗЕ ЦЕФАЛОСПОРИНА С У *Acremonium chrysogenum*

© 2010 г. А. Я. Валиахметов*, Л. В. Трилисенко*, В. М. Вагабов*, Ю. Э. Бартошевич**, И. С. Кулаев*, М. И. Новак**, А. Г. Домрачева**, М. А. Эльдаров**, К. Г. Скрыбин**

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, РАН Пушchino, 142290

e-mail: airatv@ibpm.pushchino.ru

** Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, 117312

e-mail: bartoshevech@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.09.2009 г.

Изучено содержание пяти фракций богатых энергией неорганических полифосфатов (полиР), АТФ и активность Н⁺-АТФазы плазматической мембраны у низкоактивного продуцента цефалоспорина С (цефС) *Acremonium chrysogenum* АТСС 11550 и селекционированного высокоактивного штамма 26/8 при выращивании гриба на глюкозе и комплексной среде, обеспечивающей активный синтез антибиотика. Показано, что на комплексной среде штамм 26/8 образует в 26 раз больше цефС, чем штамм АТСС 11550. При этом происходило резкое падение содержания в клетках АТФ и высокомолекулярных фракций полиР2, полиР3 и полиР5 с одновременным возрастанием низкомолекулярной фракции полиР1. Эти данные свидетельствуют об участии полиР как источников энергии, в синтезе цефС. Активность Н⁺-АТФазы мало изменялась как при низкой, так и высокой продукции цефС. Это подтверждает предположение, что у *A. chrysogenum* наряду с ceft, присутствуют и другие, альтернативные, транспортеры антибиотика. Полученные данные могут быть использованы при оптимизации процесса биосинтеза цефалоспорина С в промышленных масштабах.

CHARACTERIZATION OF HYDROCORTISONE BIOCONVERSION AND 16S RNA GENE IN *Synechococcus nidulans* CULTURES

© 2010 S. Rasoul-Amini, Y. Ghasemi, M. H. Morowvat, M. B. Ghoshoon, M. J. Raee, S. B. Mosavi-Azam, N. Montazeri-Najafabady, F. Nouri, R. Parvizi, N. Negintaji, and S. Khoubani

Department of Pharmaceutical Biotechnology and Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy,

Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, 71345—1583, Iran

e-mail: ghasemiy@sums.ac.ir

Received March 10, 2009

A unicellular cyanobacterium, *Synechococcus nidulans* (Pringsheim) Komárek, was isolated from paddyfields and applied in the biotransformation experiment of hydrocortisone (**1**). This strain has not been previously tested for steroid bioconversion. Fermentation was carried out in BG-11 medium supplemented with 0.05% substrate at 25°C for 14 days of incubation. The obtained products were chromatographically purified followed by their characterization using spectroscopic methods. 11 β , 17 β -dihydroxyandrost-4-en-3-one (**2**), 11 β -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (**3**), and androst-4-ene-3,17-dione (**4**) were the main bioproducts in the hydrocortisone bioconversion. The observed bioreaction characteristics were the side chain degradation of the substrate to prepare compounds (**2**) and (**3**) following the 11 β -dehydroxylation for accumulation of the compound (**4**). Time course study showed the accumulation of the product (**2**) from the second day of the fermentation and compounds (**3**) and (**4**) from the third day. All the metabolites reached their maximum concentration in seven days. Cyanobacterial 16S rRNA gene was also amplified by PCR. Sequences were amplified using the universal prokaryotic primers which amplify a ~400-bp region of the 16S rRNA gene. PCR products were sequenced to confirm their authenticity as 16S rRNA gene of cyanobacteria. The result of PCR blasted with other sequenced cyanobacteria in NCBI showed 99% identity to the 16S small subunit rRNA of seven *Synechococcus* species.

БИОКОНВЕРСИЯ C₁₉- И C₂₁-СТЕРОИДОВ РОДИТЕЛЬСКИМ И МУТАНТНЫМИ ШТАММАМИ *Curvularia lunata*

© 2010 г. В. В. Коллеров, А. А. Шутов, В. В. Фокина, Г. В. Суходольская, С. А. Гулевская, М. В. Донова

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН Пущино, Московская обл., 142290

e-mail: svkollerov@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.02.2009 г.

Изучена регио- и стереоспецифичность гидроксирования 3-кето-4-ен-стероидов андростанового и прегнанового ряда культурой *Curvularia lunata* ВКМ F-644. Продукты трансформации выделяли колоночной хроматографией и идентифицировали методами ВЭЖХ, масс-спектрометрии и ¹H ЯМР-спектроскопии. Показано, что C₁₉-стероиды (андрост-4-ен-3,17-дион, андроста-1,4-диен-3,17-дион, андрост-4-ен-9 α -ол-3,17-дион) преимущественно подвергаются гидроксированию в положении 14 α ; среди минорных продуктов выявлены 6 α -, 6 β -, 7 α -гидроксипроизводные. При трансформации C₂₁-стероидных соединений — кортексолона и его ацелированных производных установлено, что введение ацетильного заместителя в положение 17 стероидного ядра молекулы кортексолона способствует селективному образованию 11 β -гидроксипроизводных. Разработаны оригинальные методы получения протопластов, мутагенеза и селекции штаммов грибной культуры. Получен мутантный штамм М4 с повышенной 11 β -гидроксилазной активностью в отношении 21-ацетата и 17 α ,21-диацетата кортексолона. Выход 11 β -гидроксипроизводных при трансформации 17 α ,21-диацетата кортексолона (1 г/л) мутантным штаммом М4 составил 87%.

ВЛИЯНИЕ ТОЧЕЧНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН ВО ВНУТРЕННЕЙ α -СПИРАЛИ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ ИЗ *Aspergillus awamori* X100

© 2010 г. М. А. Суржик, С. В. Чуркина, А. Е. Шмидт, А. В. Швецов, Т. Н. Кожина, Д. Л. Фирсов, Л. М. Фирсов, М. Г. Петухов

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН

188300, Ленинградская обл., Гатчина

e-mail: surgik@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.04.2009 г.

С помощью методов молекулярной динамики изучали конформационную подвижность α -спиралей глюкоамилазы (ГА) гриба *Aspergillus awamori*. Сконструировали и исследовали несколько аминокислотных замен (G127A, P128A, I136L, G137A и G139A), оптимизирующих внутренние взаимодействия в одной из α -спиралей (D), расположенной в гидрофобном ядре этого белка. Обнаружили разнонаправленное влияние отдельных точечных мутаций на константы термоинактивации ГА. В отличие от замены АК P128A, замены G137A, A246C, I136L и G139A имели сильный аддитивный термостабилизирующий эффект.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА ПРИ КОНТРОЛЕ ТРАНСПОРТА КАЛЬЦИЯ ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАЛЕММУ КЛЕТОК КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

© 2010 г. Э. П. Ладыженская, Н. П. Кораблёва

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва 119071,

e-mail: ladyzhen@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 10.02.2009 г.

Исследовали взаимодействие фитогормонов (жасмоновой, гибберелловой и абсцизовой кислот) и синтетического регулятора роста мелафена на транспорт Ca^{+2} через мембрану везикул плазмалеммы из клеток клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в период вынужденного покоя. Мелафен, жасмоновая и гибберелловая кислоты стимулируют активность Ca^{+2} , Mg^{+2} -АТФазы цитоплазматической мембраны, тогда как абсцизовая кислота подавляет активность фермента. Исследованные соединения не влияли на пассивную проницаемость мембраны для Ca^{+2} . Характер действия мелафена на активность Ca^{+2} , Mg^{+2} -АТФазы плазмалеммы изменялся в зависимости от присутствия фитогормонов в среде инкубации. При совместном применении мелафена и каждого из фитогормонов не наблюдалось суммирования их эффектов, что свидетельствует о взаимозависимости действия исследуемых веществ на поступление Ca^{+2} в везикулы плазмалеммы. Очевидно, взаимодействие фитогормонов с компонентами плазмалеммы приводит к изменению реакции на мелафен.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУЛЬФАМЕТОКСИПИРИДАЗИНА В МЁДЕ

© 2010 г. И. Ю. Тафинцева*, А. В. Жердев*, С. А. Ерёмин**, Б. Б. Дзантиев*

**Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, 119071,*

e-mail: irentaf@mail.ru

***Химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991*

Поступила в редакцию 16.05.2009 г.

Предложен метод иммуноферментного анализа сульфаметоксипиридазина в мёде, который разработан с использованием поликлональных кроличьих антител, полученных против N-сульфанил-4-аминомасляной

кислоты, включающей структурную группу, общую для сульфонамидов. В оптимизированных условиях предел обнаружения сульфаметоксипиридазина составил 0.05 нг/мл при длительности анализа 2 ч. Проведено тестирование 24 проб мёда с использованием протокола, основанного на десятикратном разведении образцов без дополнительной пробоподготовки.

АССОЦИАЦИЯ-ДИССОЦИАЦИЯ МОЛЕКУЛ ГЕМОГЛОБИНА И ПОЛИМЕРНОГО ГЕМОГЛОБИНА В РАСТВОРАХ

© 2010 г. **Н. П. Кузнецова, Л. Р. Гудкин, Р. Н. Мишаева, Е. А. Березецкая, М. Э. Вылегжанина, Т. Е. Суханова, Е. Ф. Панарин**

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург 199004

e-mail: strelka@imc.macro.ru

Поступила в редакцию 02.02.2009 г.

Исследован процесс ассоциации—диссоциации молекул гемоглобина на димеры его субъединиц в водных и водно-солевых растворах методом гельпроникающей хроматографии и ультрафильтрации. Впервые проведена количественная оценка стабилизации четвертичной структуры гемоглобина в химически сшитом полимерном производном по сравнению с нативным белком на основе построения дифференциальных концентрационных кривых. Методом атомно-силовой микроскопии изучена морфология наночастиц гемоглобина и его модифицированных полимерных производных.

ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НА ПРИМЕРЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ-ТИМОЗИН- α 1

© 2010 г. **Т. В. Фёдоров, В. И. Коробов, В. Г. Назаров, А. Е. Смолкина, В. А. Шмелёв**

ООО "НПП Фармаклон", Московская обл., п. Оболенск

e-mail: tfedorov@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.03.2009 г.

Гибридный белок фактор некроза опухолей—тимозин— α 1 (**ФНО-Т**) в процессе биосинтеза в штамм-продуценте *Escherichia coli* SG200-50 с плазмидой рThy315 входил в состав "телец включений" в основном в виде высокомолекулярного комплекса с другими белками за счет образования S—S-связей. Предложен способ очистки ФНО-Т, включающий в себя разрушение комплекса в присутствии додецилсульфата натрия (**ДДС-Na**) и дитиотреитола (**ДТТ**) с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-100 и ренатурацией с помощью ультрафильтрации на аппарате с полыми волокнами. Метод позволяет выделять ФНО-Т в виде электрофоретически гомогенной формы, несодержащей ДДС-Na и обладающей высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток мышинной аденокарциномы L-929. Выход ФНО-Т составлял до 80% от его содержания в биомассе и до 30% от общего белка.

A NEW THERMOSTABLE DNA POLYMERASE MIXTURE FOR EFFICIENT AMPLIFICATION OF LONG DNA FRAGMENTS

© 2010 г. **K. G. Davalieva and G. D. Efremov**

Research Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Macedonian Academy of Sciences and Arts

Krste Misirkov 2, POB 428, WOO Skopje, Republic of Macedonia

e-mail: gde@manu.edu.mk

Received March 31, 2009

The thermostable DNA polymerases have been used for amplification of DNA fragments since the invention of PCR. The constraint on the maximum size of the amplified fragments can be solved to certain level by the use of unbalanced mixtures of non-proofreading and proofreading thermostable DNA polymerases. In this study, we tested the use of a mixtures of N-terminal deletional variant of *Taq* polymerase — Klentaq278 and *Tne* polymerase from *Thermotoga neapolitana*. Klentaq278 and *Tne* polymerase genes were cloned and expressed in different expression vectors under *tac* promoter. The most efficient ratio of Klentaq278/*Tne* polymerase for amplification was 10:1. The polymerase mixture of Klentaq278 and *Tne* polymerase is very effective in amplification of DNA fragments for up to 8 kb and is useful addition to a DNA polymerases used in long-range PCR.