

## СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА СВИНЕЙ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* И *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

**Колковская Е.В., Голенченко С.Г., Прокулевич В.А.**

Белорусский государственный университет, Минск, пр-т Независимости,  
4, 220030, Республика Беларусь  
*katerinakolkovskaya@gmail.com*

В Республике Беларусь животноводство является одной из ключевых сельскохозяйственных отраслей, поэтому повышение жизнеспособности молодняка свиней является одной из основных задач в данной отрасли сельского хозяйства. Алиментарная анемия – одно из наиболее распространенных заболеваний поросят. В настоящее время для профилактики данного заболевания в Республике Беларусь новорожденным животным инъектируют препараты железа (ферродекс, импозил и др.). Данные методы являются недостаточно эффективными и, кроме того, проводятся на раннем этапе постнатального развития поросят и, в перспективе, такое лечение не служит гарантией профилактики развития вторичной гипопластической анемии.

В профилактике и лечении анемии человека уже длительное время используют эритропоэтин. Так как эритропоэтин продуцируется всеми млекопитающими и эффективен при лечении анемии человека, создание и использование рекомбинантного свиного эритропоэтина с использованием генно-инженерных подходов может явиться решением в борьбе с алиментарной анемией поросят.

**Целью работы** явилось создание генетических конструкций для экспрессии гена эритропоэтина в клетках бактерий *Escherichia coli* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

**Материалы и методы.** В работе использовались следующие штаммы и плазмиды: *E. coli* XL-1Blue, *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, плазида pET-24b(+), плазида pAS2. Для культивирования микроорганизмов использовали среду LB.

В работе использовались ферменты и соответствующие буферные системы производства «Thermo Scientific».

Последовательность эритропоэтина (GenBank: AAA31029.1) была оптимизирована для экспрессии в дрожжевых системах и разбита на 7 пар праймеров. Синтез нуклеотидной последовательности осуществлялся с помощью ПЦР. Для переноса генетических конструкций в клетки *E. coli* использовали метод кальциевой трансформации. Наличие целевых гибридных последовательностей устанавливалось рестрикционным анализом, ПЦР и секвенированием по методу Сенгера. Фрагменты ДНК анализировались путём проведения электрофореза в 1% агарозном геле с

бромистым этидием. Анализ тотальных клеточных белков проводился методом ДСН-ПААГ электрофореза.

**Результаты исследований.** С помощью метода ПЦР из семи пар праймеров нам удалось синтезировать полноразмерную последовательность гена эритропоэтина размером 507 п.н. Праймеры были разработаны таким образом, что продукт каждой реакции нёс области комплементарности для праймеров следующего этапа. Синтез осуществлялся двунаправленно от центра к концам последовательности с увеличением продукта на каждом этапе на 62 – 74 п.н. Полученный фрагмент был клонирован в вектор рЕТ-24b по сайтам *NdeI* и *EcoRI* таким образом, что кодирующая последовательность гена эритропоэтина оказалась под контролем T7 промотора, находящегося в плазмиде. Полученная конструкция была успешно перенесена в клетки *E. coli* XL-1Blue. Таким образом, была получена гибридная генетическая конструкция рЕТ-24b-еро, позволяющая экспрессировать ген свиного эритропоэтина в клетках *E. coli*.

Для экспрессии плазмиды рЕТ-24b-еро была перенесена в *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. В полученных трансформантах провели индукцию экспрессии с использованием в качестве индуктора IPTG в конечной концентрации 1мМ. Проведение белкового электрофореза показало, что экспрессия целевого белка в клетках бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL отсутствует, что может быть связано с рядом причин (неоптимальность кодонного состава, так как нуклеотидная последовательность была разработана для дрожжевой системы экспрессии, наличие вторичных структур, препятствующих процессу транскрипции или трансляции в клетках бактерий или др).

Результаты секвенирования полученной в ходе работы последовательности гена эритропоэтина показали, что в последовательности имеется 3 замены нуклеотидов в положениях A6(→G6), A9(→G9), A498(→T498). Замены в положениях A6(→G6) и A9(→G9) не приводят к замене аминокислот в составе белка, в случае замены в положении A498(→T498) происходит замена глутамата (E) на аспарат (D) в положении E167, однако данные аминокислоты сходны по своим свойствам. Кроме того, данная замена находится в области белка, которая не участвует во взаимодействии с рецептором эритропоэтина. Также сиквенс позволил установить наличие инсерции одного нуклеотида после T502. Однако данная инсерция не приводит к удлиннению полипептидной цепи, происходит лишь замена стоп-кодона: UAG → UGA.

Плазмида рЕТ-24b-еро была использована в качестве матрицы в ПЦР для замены сайта рестрикции на 3'-конце последовательности гена эритропоэтина на сайт для *BamHI*. После чего по сайтам *NdeI* и *BamHI* целевая последовательность гена была внедрена в состав челночного вектора рAS2. Стоит отметить, что в ходе замены сайта рестрикции

должны были устраниться замена нуклеотида в положении A498(→T498), а также инсерция нуклеотида после T502. Полученная конструкция pAS2-epo была перенесена в клетки *E. coli* XL-1Blue. Таким образом была получена гибридная генетическая конструкция, способная стабильно наследоваться в клетках бактерий и дрожжей, в которой ген свиного эритропоэтина находится под контролем промотора NMT.

#### **Заключение.**

В результате, на основе векторных молекул pET-24b и pAS2 нами были получены генетические конструкции, предназначенные для экспрессии гена эритропоэтина свиней в клетках *E. coli* – pET-24b-epo и *S. cerevisiae* – pAS2-epo.

#### **PLASMIDS FOR PORCINE ERYTHROPOIETIN CLONING AND EXPRESSION IN ESCHERICHIA COLI AND SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

*K.V. Kolkovskaya, S.G. Golenchenko, V.A. Prokulevich*

Porcine anemia is caused by the lack of sufficient red cells in the blood due to defective erythropoiesis. It is especially common for suckling piglets 5 to 35 days old. This study is dedicated to cloning of the main erythropoiesis regulator gene – erythropoietin for its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*.

The coding sequence of porcine erythropoietin was synthesized by PCR and cloned into pET-24b bacterial vector and pAS2 shuttle vector. The recombinant DNA molecules pET-24b-epo and pAS2-epo were introduced into *E. coli* XL-1Blue. Although *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL were transformed by pET-24b-epo followed by IPTG induction, no recombinant erythropoietin in *E. coli* was obtained.

#### **АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ АЛКИЛОВЫХ ЭФИРОВ IN VITRO**

*Коробач Е.В.<sup>1</sup>, Шляхтун А.Г.<sup>2</sup>, Бубен А.Л.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Гродненский государственный университет им. Я. Купалы

<sup>2</sup>Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси

<sup>3</sup>Гродненский государственный медицинский университет

Получение новых соединений, а также исследование их физико-химических свойств в настоящее время является одним из основных направлений органической химии. Особенное внимание привлекает получение модифицированных биологически активных соединений. Избыточная наработка свободных радикалов в организме является центральным фактором риска сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний и других патологий. Необходимость терапии заболеваний, в которых важную роль играет свободнорадикальное окисление, определяет актуальность поиска перспективных средств антиоксидантной фармакотерапии. Галловая кислота (ГК) и ее производные широко используются, прежде всего, в производстве продуктов питания и