

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи
УДК 577.21

Код 1-31 80 01

Колковская Екатерина Владимировна

Применение ИТ в получении химерной конструкции для экспрессии гена эритропоэтина свиней в клетках *Saccharomyces cerevisiae*

Выпускная работа по
«Основам информационных технологий»

Магистранта кафедры микробиологии
биологический факультет

Специальность: 1-31 80 01 – биология

Рецензент:

Минск, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	5
ГЛАВА 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Роль эритропоэтина в процессе эритропоэза.....	6
1.1.1. Сущность эритропоэза.....	6
1.1.2 Механизм действия ЭПО.....	6
1.1.3 Применение ЭПО для стимуляции кроветворения	7
1.2 Структурно-функциональная организация эритропоэтина.....	8
1.2.1 Ген эритропоэтина	8
1.2.2 Молекула эритропоэтина.....	8
1.3 Возможности синтеза эритропоэтина.....	9
1.3.1 Производство rHuEPO	10
1.3.2 Возможность синтеза эритропоэтина в клетках дрожжей.....	10
1.3.3 Возможность синтеза ЭПО в клетках бактерий.....	11
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	12
2.1 Объекты исследования	12
2.2 Среды и растворы	12
2.3 Методы исследования	15
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	19
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	28
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	29
ПРИЛОЖЕНИЕ А	30
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	33

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид	–IPTG
Колониеобразующие единицы эритроцитов	–CFU-E
Рекомбинантный человеческий эритропоэтин	–rHuEPO
Рецептор эритропоэтина	–EPO-R
Эритропоэтин	–ЭПО

ВВЕДЕНИЕ

Животноводство – одна из ключевых сельскохозяйственных отраслей, на долю которой приходится более 65% общей выручки от реализации продукции в аграрном секторе экономики и 96 – 97% от экспорта сельскохозяйственной продукции.

В Республике Беларусь остро стоит проблема повышения жизнеспособности молодняка свиней. Алиментарная анемия – одно из наиболее распространенных заболеваний молодняка.

Из сказанного выше следует, что особую актуальность в настоящее время приобретает поиск средств профилактики алиментарной анемии молодняка свиней.

В профилактике и лечении анемии человека уже длительное время используют эритропоэтин. Эритропоэтин – это гликопротеин млекопитающих с молекулярной массой 30-34кД, который регулирует продукцию красных кровяных телец гематopoэтическими тканями организма.

Так как эритропоэтин продуцируется всеми млекопитающими и эффективен при лечении анемии человека, разработка, создание и использование рекомбинантного свиного эритропоэтина может явиться решением в борьбе с алиментарной анемией поросят.

Цель данной работы: создание генетической конструкции для экспрессии гена эритропоэтина в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с использованием информационных технологий.

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

1. С помощью информатических подходов разработать нуклеотидную последовательность гена эритропоэтина свиньи, кодонный состав которой адаптирован для экспрессии в клетках дрожжей;
2. Синтезировать оптимизированную для экспрессии в клетках дрожжей кодирующую последовательность гена эритропоэтина свиней методом ПЦР;
3. На основе плазмид pET24b и pAS2 получить химерные генетические конструкции, несущие последовательность гена свиного эритропоэтина;
4. На основе *Escherichia coli* XL-1 Blue и *E. coli* BL21(DE3) получить штаммы, несущие химерные генетические конструкции pET24b-epo и pAS2-epo.
5. Исследовать экспрессию гена эритропоэтина свиней в полученных штаммах *E. coli* BL21(DE3)-pET24b-epo.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Выпускная работа включает 33 страницы, 13 рисунков, 4 таблицы и 13 источников литературы.

Ключевые слова: СВИНОЙ ЭРИТРОПОЭТИН, АЛИМЕНТАРНАЯ АНЕМИЯ, ГИБРИДНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ, ПЛАЗМИДЫ, ПЦР.

Целью работы явилось создание генетической конструкции для экспрессии гена эритропоэтина в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с использованием информационных технологий.

Объектом исследования выступала кодирующая последовательность гена эритропоэтина свиньи.

В работе использовались следующие штаммы и плазмиды: *Escherichia coli* XL-1Blue, *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, плаزمида pET-24b(+), плазмида pAS2.

С помощью метода ПЦР мы синтезировали полноразмерную кодирующую последовательность гена эритропоэтина (507 п.н.), которая была разработана при помощи программы Graphical Codon Usage Analyser v. 2.0. Фрагменты ДНК анализировались путём проведения электрофореза в 1% агарозном геле с бромистым этидием.

Полученная последовательность в составе вектора pET-24b (+) методом кальциевой трансформации была перенесена в клетки *E. coli* XL-1Blue и *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Наличие целевых гибридных последовательностей устанавливалось рестрикционным анализом, ПЦР и секвенированием по методу Сенгера и последующего анализа данных в программе BLAST по алгоритму Нидлмана-Вунша. В полученных трансформантах *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL провели индукцию экспрессии с использованием в качестве индуктора IPTG в конечной концентрации 1мМ. Проведение белкового ДСН-ПААГ электрофореза не выявило экспрессии целевого белка. Полученная последовательность гена ЭПО была включена в состав челночного вектора pAS2. Конструкция pAS2-еро была перенесена в клетки *E. coli* XL-1Blue.

В результате, на основе векторной молекулы pAS2 нами была получена генетическая конструкция, предназначенная для экспрессии гена эритропоэтина свиней в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.

ГЛАВА 1

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Роль эритропоэтина в процессе эритропоэза

1.1.1. Сущность эритропоэза

Кроветворение, или гемопоэз, – процесс, состоящий из серии клеточных дифференцировок, которые приводят к образованию зрелых форменных элементов крови. Одна из ветвей гемопоэза – эритропоэз, то есть образование красных кровяных телец [1].

Главная функция красных кровяных телец – перенос кислорода от легких к тканям и всем частям тела, а также транспорт углекислого газа обратно для процессов обмена [2].

В организме млекопитающих эритропоэз, как правило, протекает на низкой базальной скорости, заменяя стареющие красные кровяные тельца молодыми ретикулоцитами. Скорость эритропоэза может возрастать в несколько раз при обильных и быстрых кровопотерях, патологическом разрушении красных кровяных телец или при несоответствии между потребностью тканей в кислороде и его поступлением. В данных условиях в плазме крови появляется особый гормон – эритропоэтин, который является основным медиатором гипоксической индукции эритропоэза [3].

1.1.2 Механизм действия ЭПО

Эритропоэтин – гормон гликопротеиновой природы, который ускоряет пролиферацию предшественников эритроцитов (на стадии BFU-E) в костном мозгу, а также стимулирует дифференцировку CFU-E, что приводит к увеличению числа гемоглобин-образующих эритробластов (т.е. проэритробластов) [4].

Эритропоэтин оказывает свое действие при контакте с рецепторами ЭПО на клетках-мишенях. EPO-R представляет собой гликозилированный и фосфорилированный трансмембранный белок с молекулярной массой от 72 до 78 кД (55кД без посттрансляционных модификаций). EPO-R относится к суперсемейству рецепторов цитокинов, которые присутствуют на поверхности клеток в виде гомодимера даже в отсутствие лиганда. Цитокиновые рецепторы

передают сигнал при посредничестве цитоплазматических тирозиновых киназ, относящихся к семейству Янус-киназ (JAK), которые связаны с отдельными субъединицами рецептора (рисунок 1.1) [5; 6].

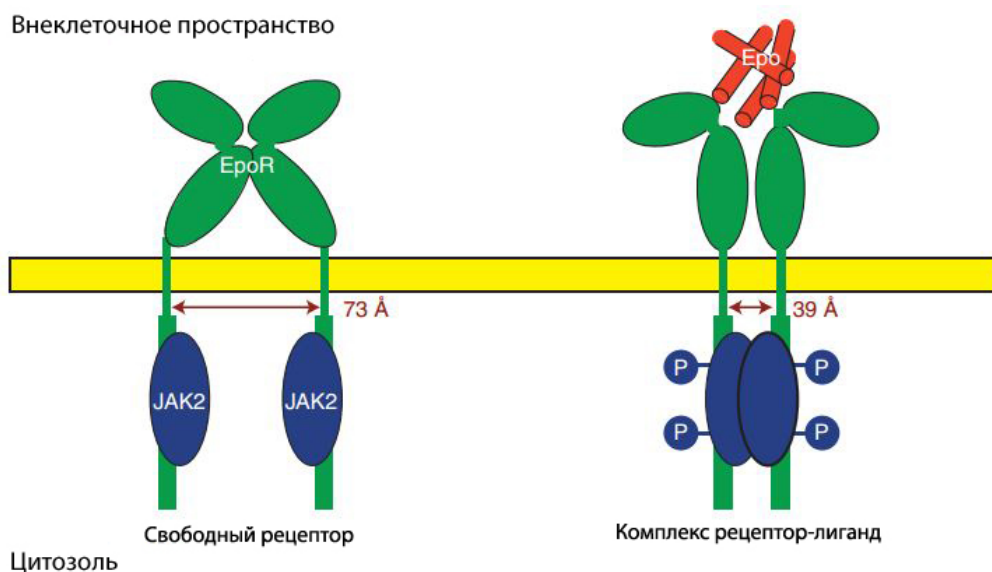


Рисунок 1.1 – Взаимодействие ЭПО с рецептором [9]

Таким образом, ЕРО действует на эритропоэз, в основном, за счет регулирования пула CFU-E, которые затем подвергаются окончательной дифференцировке в эритроциты.

1.1.3 Применение ЭПО для стимуляции кроветворения

Главный результат применения ЭПО – возможность восстановления собственного кроветворения и компенсация анемии без переливания донорской крови.

3 основные функции ЭПО заключаются в:

- активации эритропоэза для компенсации кровопотери;
- стимуляции неоангиогенеза для обеспечения посттравматической регенерации тканей;
- блокировании апоптоза для увеличения выживаемости клеток различных тканей с целью максимальных темпов восстановления [7].

1.2 Структурно-функциональная организация эритропоэтина

1.2.1 Ген эритропоэтина

Размер гена ЭПО свиней составляет 2429 п.н. Базовая организация гена ЭПО сходна у разных видов млекопитающих и состоит из 5 экзонов (кодируют 194 аминокислотных остатка в случае поросят) и 4 интронов.

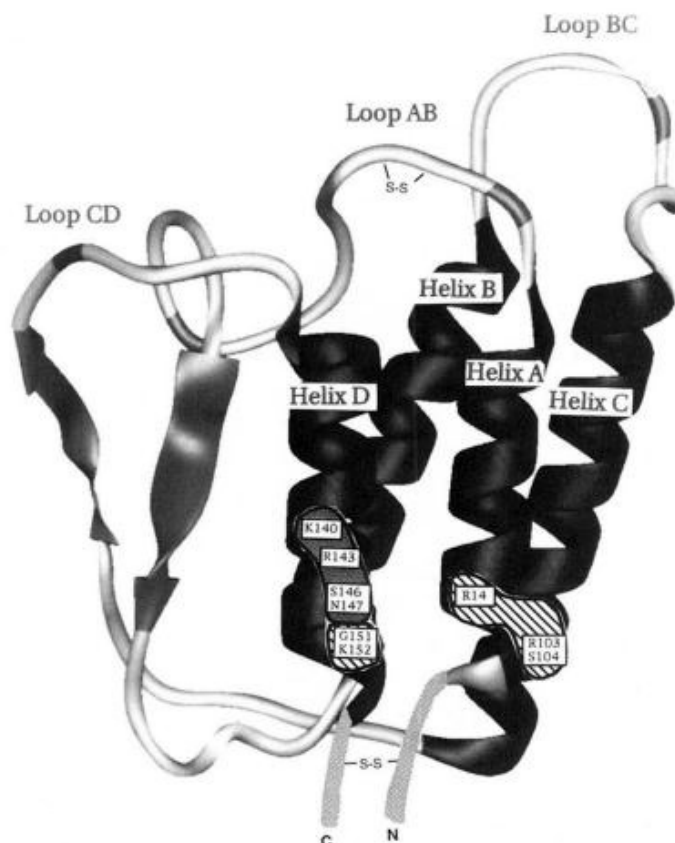
Эритропоэтин относится к обширному семейству цитокинов, к которому также относятся гормон роста, интерлейкины, пролактин и др. Хотя гомология между этими цитокинами слаба, все они имеют аналогичное количество экзонов, а также широко распространена корреляция между точками сплайсинга и вторичной структурой [8].

1.2.2 Молекула эритропоэтина

Все вышеуказанные цитокины в процессе фолдинга приобретают глобулярную трехмерную структуру, состоящую из 4 антипараллельных α -спиралей, соединенных петлями, не имеющими вторичной структуры, и стабилизированных дисульфидными связями (рисунок 1.2) [9; 10].

Свиной ЭПО состоит из 194 аминокислотных остатков, из которых 26 остатков приходится на сигнальный пептид, необходимый для транслокации белка. Молекулярная масса зрелого белка составляет 34кД [11].

Структура молекулы ЭПО высоко консервативна среди млекопитающих. Сравнение аминокислотных последовательностей показывает, что более чем 61% молекулы состоит из инвариантных аминокислотных остатков. Большинство наблюдаемых замен являются консервативными, с использованием аминокислот, схожих по химическим и физическим свойствам [12].



На спиралях выделены аминокислотные остатки, важные для связывания с рецептором.

Рисунок 1.2 – Трехмерная структура молекулы эритропоэтина [9]

ЭПО представляет собой мономерный белок с молекулярной массой 34кД, который несет 4 сайта гликозилирования, 2 из которых принципиально важны для стабильности и активности цитокина. Белок содержит 2 дисульфидные связи, но лишь одна из них (Cys7- Cys161) является необходимой для образования функционально активного гормона.

1.3 Возможности синтеза эритропоэтина

Для производства рекомбинантных продуктов могут быть использованы различные клетки-хозяева, но они, как правило, относятся к одной из следующих групп: клетки растений, бактерий, дрожжей, насекомых, млекопитающих.

В случае производства ЭПО, последовательность аминокислот, а также сайты гликозилирования в рекомбинантном белке должны соответствовать сайтам в природном типе молекулы, чтобы достичь желаемой эффективности *in vivo*.

Потенциальными продуцентами рекомбинантного свиного ЭПО могут быть клетки бактерий, дрожжей, а также клетки млекопитающих.

1.3.1 Производство rHuEPO

В настоящее время rHuEPO синтезируют, используя клетки млекопитающих, так как они способны продуцировать гликозилированную форму гормона с желаемым уровнем эффективности. Клетки млекопитающих выделяют rHuEPO во внешнюю среду, в которой они культивировались, сводя оставшиеся стадии производства к отделению продукта от других компонентов культуральной жидкости.

Анализируя возможность использования животных клеток для синтеза эритропоэтина можно заключить, что культивирование в клетках животных имеет ряд минусов, одним из которых является возможность наличия в культуре клеток вирусов, которые могут вызывать заболевания у животных. Стоит упомянуть, что среды для культивирования клеток дорогостоящи, а сам процесс производства трудоемок.

1.3.2 Возможность синтеза эритропоэтина в клетках дрожжей

Как известно, дрожжи являются эукариотическими организмами и обладают схожей с высшими эукариотами субклеточной организацией. Однако характер гликозилирования белков в дрожжах отличается от такового в клетках млекопитающих.

Создан генно-инженерный штамм *P. pastoris*, который обладает способностью осуществлять N-гликозилирование белков, характерное для клеток человека.

Таким образом, хотя дрожжи *P. pastoris* исходно не обладают подходящей системой гликозилирования, модифицированные дрожжевые клетки могут эффективно выступать в качестве системы экспрессии рекомбинантных белков. Положительной стороной использования дрожжей является их безопасность, а также простота организации (в сравнении с клетками млекопитающих).

1.3.3 Возможность синтеза ЭПО в клетках бактерий

Клетки бактерий не обладают способностью продуцировать гликозилированные формы белков. Таким образом, если ЭПО будет синтезирован в бактериальных клетках, он не будет обладать необходимой биологической активностью.

Однако был разработан метод синтеза гликопротеинов с помощью селективной реакции гликозил-иодацетамида с тиоловыми группами цистеиновых остатков, расположенных в сайтах гликозилирования при помощи сайт-направленного мутагенеза. Этот метод позволяет получить гомогенно гликозилированные белки, которые несут углеводные цепи на природных и не природных сайтах. Исследования показывают, что данный метод может быть использован и для синтеза ЭПО.

На основе полученных данных можно заключить, что синтез ЭПО может производиться и в бактериальных клетках с последующей модификацией белка. Плюсом данного метода является доступность, простота использования и более низкая цена бактериальных культур в сравнении с клетками животных.

Таким образом, в качестве продуцентов свиного эритропоэтина могут выступать клетки различных живых организмов. Использование каждого из рассмотренных продуцентов обладает как положительными сторонами, так и отрицательными. Выбор продуцента и способа производства зависит от поставленных перед биотехнологом задач.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования выступала последовательность гена эритропоэтина свиньи, кодонный состав которой был оптимизирован для экспрессии в клетках дрожжей с помощью программы Graphical Codon Usage Analyser v. 2.0 и таблиц частот встречаемости кодонов для организмов *E. coli* и *S. cerevisiae*, код доступа исходной нуклеотидной последовательности – GenBank: AAA31029.1 [11].

Штаммы и плазмиды

Использовали штамм *E. coli* XL-1Blue (F' proAB lacIq lacZΔM15 Tn10(Tcr)/recA1 endA1 gyrA96(Nalr) thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac), *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (F' ompT hsdS (rBmB) dcm+Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Camr] [argU ileY leuW Strep/Specr]) , плазмиду pET-24b(+) (Novagen), плазмиду pAS2. Данные штаммы были взяты из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета БГУ.

2.2 Среды и растворы

LB-бульон (Luria-Bertram)

Пептон	10 г/л
Дрожжевой экстракт	5 г/л
NaCl	10 г/л

Добавляли дистиллированную воду до необходимого объема, pH доводили с помощью NaOH до 6,8. Стерилизовали путем автоклавирования при 1,5 атм. 30 минут.

Питательный агар

Для приготовления питательного агара LB-бульон разливали по флаконам, в каждый из которых добавляли агар-агар в концентрации 15 г/л. Стерилизовали путем автоклавирования при 1,5 атм. 30 минут.

1xTAE-буфер с этидиум бромидом

50xTAE-буфер	20 мл
Этидиум бромид	50 мкл
Деионизированная вода	до 1 л

50xTAE-буфер

2М Трис	242 г
1М ледяная уксусная кислота	57,1 мл
50мМ ЭДТА	100 мл
Деионизированная вода	до 1л
pH	8,2–8,4.

Агарозный 1% гель для электрофореза

Агарозу в концентрации 1 г/л заливали TAE-буфером с этидиумом бромидом до необходимого объема.

TE буфер (буфер 1)

Трис-HCl (1M)	10 мл
EDTA (0,5M)	2 мл
Вода дистиллированная	до 1л
pH приготовленного буфера	8,0.

Лизирующий буфер (буфер 2)

SDS (10%)	0,2 мл
NaOH (5 M)	0,08 мл
Дистиллированная вода	до 2 мл

x2 загрузочный буфер для белкового электрофореза

x4 буфер для концентрирующего геля	1,25 мл
10 %-ый SDS	3 мл
Глицерин	1 мл
2-меркаптоэтанол	0,5 мл
0,1 %-ый бромфеноловый синий	2 мл
Вода дистиллированная	до 10 мл
Хранили при 4 °С.	

x4 буфер для разделяющего геля (1,5 моль/л Трис)

Трис-ОН	45,5 г
SDS	1 г
Вода дистиллированная	до 250 мл
Доводили pH до 8,8, хранили при 4 °С.	

Разделяющий гель (16 %-ный) для электрофореза белков

Акриламид	4 мл
x4 буфер для разделяющего геля	1,875 мл
Вода дистиллированная	1,625 мл
TEMED (tetramethylethylenediamine)	0,005 мл
Персульфат аммония (10 %-ый)	0,025 мл

Концентрирующий гель для электрофореза белков

Акриламид	325 мкл
x4 буфер для концентрирующего геля	625 мкл
Вода дистиллированная	1525 мкл
TEMED	12,5 мкл
Персульфат аммония (10 %-ый)	2,5 мкл

x1 трис-глициновый буфер для электрофореза белков

x10 трис-глициновый буфер	100 мл
10 %-ый ДСН	10 мл
Вода дистиллированная	до 1 л

Раствор уксусной кислоты (7 %-ый)

CH ₃ COOH (ледяная)	70 мл
Вода дистиллированная	до 1 л

Хранили при комнатной температуре.

Раствор красителя Кумасси для окраски полиакриламидного геля

CH ₃ COOH (ледяная)	90 мл
C ₂ H ₅ OH	450 мл
Краситель Кумасси R250	1 г
Вода дистиллированная	до 1 л

Хранили при комнатной температуре.

Раствор для отмывания ПААГ от красителя Кумасси

CH ₃ COOH (ледяная)	70 мл
C ₂ H ₅ OH	150 мл
Вода дистиллированная	до 1 л

Хранили при комнатной температуре.

2.3 Методы исследования

Были использованы следующие методы:

Полимеразная цепная реакция

Смесь для ПЦР:

- 10х буфер для амплификации
- 10х смесь нуклеотидов
- Праймеры, 10пм на реакцию (таблица 2.1)
- ДНК-полимераза, 1ед на реакцию
- Матрица

Таблица 2.1 – Использованные пары праймеров.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера
Forward 1	gaagcgattctgcagggccaggcgctgctggcgaacagcagccagccgagc
Reverse 1	caccgctttatccacatgcagctgcagcgcttcgctcggtggctgctgttc
Forward 2	atggaagtgtggcagggcctggcgctgctgagcgaagcgattctgcagggcc
Reverse 2	gcgcagcaggctggcaggtgcgcaggccgctcaccgctttatccacatgcagc
Forward 3	cgtggaacgaatggaagtgcagcagcaggcgatggaagtgtggcagggcc
Reverse 3	cggaatcgcttcttctgcgctcccagcgcgcgcagcaggctggtcag
Forward 4	accgtgccagataccaaagtgaactttatgcgtggaacgaatggaagtgc
Reverse 4	cggggctgcactgctcgggctcgcacccggcagcgggaatcgcttcttctgcg
Forward 5	atgggctgtgcggaaagctgcagcttagcgaacattaccgtgccagataccaaagtgc
Reverse 5	ttgcgaacagtttgacaggggtatccaccgcaaagggtgcgcagcggggctgcactgc
Forward 6	ggaacggtatattctggaagcgaaagaaggcgaaaacgcgaccatgggctgtgcggaag
Reverse 6	ggtatacagggtcagtttgccgcgcagaaagtgtctatagttgcgaacagtttgacagg
Forward 7	cgacatatggccccgccgcgcctgattgcgatagccgcgtgctggaacggtatattctggaagcg
Reverse 7	gtagaatc tcacgatcgcgctcgtcggcacgcttcgccggtatacagggtcagtttgcc
R_Xho	ttctcgagctatcgctcgcgctcgccgc
R_BamHI	ttcggatccctatcgctcgcgctcgccgc

Полимеразную цепную реакцию производили по заданной программе (таблица 2.2, 2.3) с использованием аппарата для ПЦР (ThermalCycler, BioRAD).

Таблица 2.2 – Использованные программы ПЦР для сборки гена эритропоэтина.

Этап плавления ДНК	95°C, 2–3 минуты						
Цикл амплификации							
Плавление	95°C, 20 секунд						
Отжиг	1 ПЦР	2 ПЦР	3 ПЦР	4 ПЦР	5 ПЦР	6 ПЦР	7 ПЦР
	50°C	55°C	52°C	55°C	54°C	52°C	54°C
	20 секунд						

Продолжение таблицы 2.2

Элонгация	–	20с	30с	40с	45с	60с	70с
	72°C						
Этап доамплификации	10 мин		7 мин				
	72°C						

Таблица 2.3 – Иные использованные программы ПЦР

Этап	1 реакция для устранения делеции	2 реакция для устранения делеции	3 реакция для устранения делеции	Для проверки трансформантов	Для замены сайтов рестрикции
Этап плавления ДНК	95°C, 2 мин	95°C, 2 мин	95°C, 2 мин	95°C, 2 мин	95°C, 2 мин
Цикл амплификации					
Плавление	95°C, 20 с	95°C, 20 с	95°C, 20 с	95°C, 20 с	95°C, 20 с
Отжиг	50°C, 30 с	65°C, 30 с	60°C, 30 с	60°C, 25 с	54°C, 30 с
Элонгация	72°C, 30 с	72°C, 40 с	72°C, 1мин 10с	72°C, 35 с	72°C, 1мин 10с
Этап доамплификации	72°C, 7 мин	72°C, 7 мин	72°C, 7 мин	72°C, 7 мин	72°C, 7 мин

Электрофорез в агарозном геле

В аппарат для электрофореза заливали 1xTAE буфер, в состав которого входил этидиум бромид.

Затем подключали электрофоретическую камеру к источнику питания и задавали напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10—15 В/см геля. Результаты прохождения реакций оценивали с помощью трансиллюминатора.

Выделение ДНК из агарозного геля

Выделение осуществляли с помощью набора NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Германия), QIAquick Gel Extraction Kit (50) (QIAGEN, Германия) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Выделение ДНК из реакционной смеси после ПЦР

Выделение производили с помощью набора NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (производитель Macherey-Nagel) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Выделение плазмиды pET-24b из бактерий E. coli XL-1 Blue

Выделение при помощи набора GeneJET Plasmid Minirep Kit (производитель ThermoScientific), QIAprep® Spin Miniprep Kit (50) (QIAGEN, Германия) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Рестрикция плазмидной ДНК и гена эритропоэтина.

Для рестрикции использовали рестриктазы EcoRI, NdeI и BamHI, а также необходимый для работы рестриктаз серии Fast Digest Green buffer (ThermoScientific).

Определение концентрации ДНК после рестрикции.

Концентрацию определяли спектрофотометрически с помощью аппарата DS-11 Microspectrophotometr (DeNovix).

Лигирование

Исходя из данных о концентрации плазмидной ДНК и концентрации вставки, вычисляли необходимое соотношение компонентов реакционной смеси. Соотношение подбирали таким образом, чтобы количество вставки превышало количество вектора в 3-5 раз. Смесь выдерживали на водяной бане 2 часа при 22°C.

Кальциевая трансформация

Ход работы:

1. Отсеивали ночную культуру
2. Разбавляли ночную культуру в 20 раз: добавляли 0,5 мл ночной культуры и 9,5 мл питательного бульона.
3. Через 1 час измеряли оптическую плотность, в качестве контроля использовали питательный бульон.
4. При достижении культурой оптической плотности 0,3–0,4, колбу с разбавленной ночной культурой ставили на ледяную баню на 10 минут. В 4 эппендорфа разливали содержимое колбы.
5. Центрифугировали 5 минут при 6500 об/мин. Все операции проделывали на холодагенте.
6. Супернатант сливали в стерильных условиях. В культуру клеток добавляли 0,8 мл 0,1М CaCl₂, ресуспендировали, выдерживали 15 минут, центрифугировали 5 минут при 6500 об/мин.
7. Сливали стерильно супернатант и доливали 100мкл 0,1М CaCl₂, ресуспендировали и оставляли на 45 минут на водяной бане.
8. Добавляли в эппендорфы по 20 мкл ДНК в случае продуктов лигирования или 2-3 мкл ДНК в случае плазмидной ДНК и выдерживали 10-15 минут на водяной бане.
9. Подвергали клетки тепловому шоку в течение 2 минут при 42°C. Охлаждали 1 минуту на ледяной бане.
10. Добавляли 1 мл бульона для индукции и оставляли на 1 час на качалке.
11. Производили высеивание на чашки по 0,1 мл культуры из каждого эппендорфа. Оставшуюся в эппендорфах культуру центрифугировали при 6000

об/мин в течение 5 минут (сгущение). Сливали супернатант, ресуспендировали осадок и высевали на чашки.

Индукция экспрессии в клетках E.coli BL21-еро

1. Готовили ночную культуру необходимого клона.
2. Разводили ночную культуру в 10 раз, распределив на 2 колбы (опыт и контроль) с добавлением антибиотиков: Km60, Cam30.
3. Растили культуру до оптической плотности 0,8-1,2. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 600нм.
4. Добавляли в опытную колбу 10 мкл ИПТГ.
5. Культивировали 4 часа.
6. Отбирали по 200 мкл культуры из опытной и контрольной колбы в эппендорфы, центрифугировали 1 минуту при 13000 об/мин, сливали супернатант, клетки замораживали.

Электрофорез белков в ПААГ

1. Подготовили аппарат для проведения электрофореза.
2. Приготовили разделяющий гель.
3. Залили разделяющий гель.
4. Наслоили бутанол.
5. Выждали 40 мин до застывания геля.
6. Промыли дистиллированной водой 5-7 раз.
7. Приготовили концентрирующий гель.
8. Залили концентрирующий гель.
9. Вставили гребенки и выждали до застывания геля.
10. Залили буфер и сняли гребенки.
11. Промыли лунки и внесли пробы.
12. Провели электрофорез при постоянной силе тока в 20 мА в течение 2х часов.

Окрашивали гель 0,25%-ным раствором Кумасси в термостате при 60°C в течение 40 минут. После этого проводили отмывку от красителя при помощи раствора 7%-ной уксусной кислоты и 15%-ного этанола в воде в течение часа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения работы, из имеющихся 7 пар праймеров, используя метод ПЦР, синтезировали кодирующую последовательность гена эритропоэтина, кодонный состав которой был оптимизирован для экспрессии гена в клетках дрожжей *S. cerevisiae* при помощи программы Graphical Codon Usage Analyser v. 2.0. Праймеры были разработаны при помощи программы PerlPrimer таким образом, что продукт каждой реакции нёс области комплементарности для праймеров следующего этапа (рисунок 3.1).

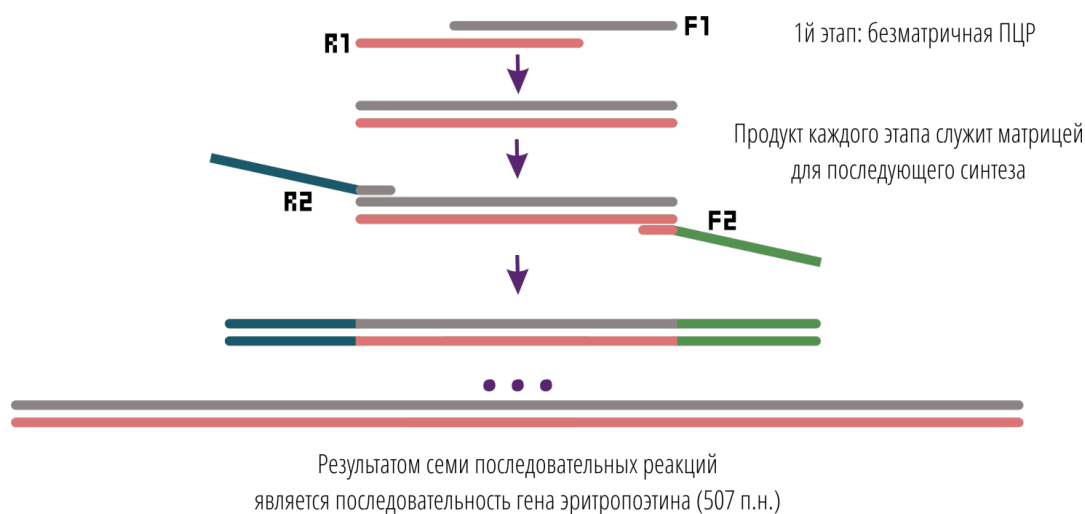


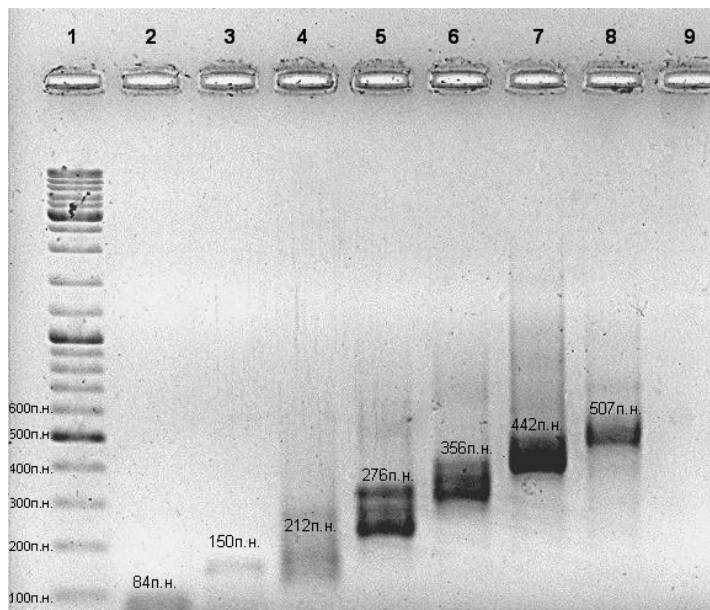
Рисунок 3.1– Модель сборки гена эритропоэтина свиньи методом ПЦР

Синтез гена осуществлялся в семь этапов с соответствующими парами праймеров (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Увеличение размера синтезированной цепи в ходе последовательных ПЦР.

Используемые праймеры	Продукт ПЦР, п.н.
F1, R1	84
F2,R2	150
F3,R3	212
F4, R4	276
F5,R5	359
F6,R6	442
F7,R7	507

На рисунке 3.2 представлена электрофореграмма продуктов ПЦР всех этапов синтеза. На каждом этапе был получен продукт, соответствующий по длине ожидаемому.



1 – маркер молекулярного веса;

2-8 – продукты последовательных ПЦР;

9 – отрицательный контроль

Рисунок 3.2– Процесс сборки гена эритропоэтина

В результате последовательных ПЦР была получена последовательность, соответствующая по длине гену эритропоэтина свиньи, фланкированная сайтами рестрикции для рестриктаз NdeI и EcoRI.

Последовательность, полученная в результате последней ПЦР, была очищена из реакционной смеси, подвергнута рестрикции по концевым сайтам для NdeI и EcoRI, лигирована по данным сайтам с вектором pET-24b, после чего полученной конструкцией трансформировали клетки *E. coli* XL-1 Blue.

Таким образом, мы получили клоны *E. coli* XL-1 Blue, содержащие химерную конструкцию pET-24b-еро.

Следующим этапом работы являлось выделение плазмиды pET-24b-еро из полученных клонов. После процедуры выделения, наличие плазмиды в смеси проверили методом электрофореза.

После выделения плазмид провели кальциевую трансформацию клеток *E. coli* BL21 (DE3).

В результате трансформации были получены клоны *E. coli* BL21(DE3)-еро.

Затем для клонов *E. coli* BL21(DE3)-еро № 5(2), 5(7), 6(9), 6(15) провели индукцию экспрессии с использованием IPTG в конечной концентрации 1мМ.

Так как экспрессия не была детектирована, плазмидная ДНК из имеющихся клонов была отправлена на секвенирование.

epo	1	-----gccccaccacgcctgatttgcgatagccgcgctgctg	36
		. .	
seq3	1	GAGATATACATATGGCCCCGCGCGCCTGATTTGCGATAGCCGCGTGCTG	50
epo	37	gaacgggtatatcttggaaagcgaagaaggcgaaaaacgcgaccatgggctg	86
seq3	51	GAACGGTATATTCTGGAAAGCGAAAGAAGCGGAAACCGGACCATGGGCTG	100
epo	87	tgcggaaagctgcagcttttagcgaaaaattaccgtgccagataccaaag	136
seq3	101	TGCGGAAAGCTGCGACCTTAGCGAAACATTACCTGCCAGATACCAAAG	150
epo	137	tgaacttttatgctgtggaacgaatggaagtgcagcagcaggcgatggaa	186
seq3	151	TGAACTTTTATGCTGTGAAACGAATGGAAATGCAGCAGCAGGCGATGGAA	200
epo	187	gtgtggcaggcgcttgccgctgctgagcgaagcattctgcagggccaggc	236
seq3	201	GTGTGGCAGGGCCTGGCGCTGCT-----	223
epo	237	gctgctggcgaacagcagccagccggagcgaagcgtgcagctgcattgtgg	286
seq3	224	-----GAGCGAAGCGCTGCAGCTGCATGTGG	249
epo	287	ataaagcggtagcggcctgcgcagcctgaccagcctgctgcgcgcctg	336
seq3	250	ATAAAGCGTGAGCGGCTGCGCAGCCTGACCAAGCTGCTGCGCGCGCTG	299
epo	337	ggagcgcgagaagaagcgatttcgtcggatgagcgagccgagcagtgctc	386
seq3	300	GGAGCGCAGAAAGAAGCGATTCCGCTGCCGGATGCGAGCCCGAGCAGTGC	349
epo	387	gaccccgctgctgcaccttttgcggtggataccctgtgcaaaactgtttcgca	436
seq3	350	GACCCCGCTGCGCACCTTTGCGGTGATACCTGTGCGAAACTGTTTCGCA	399
epo	437	actatagcaactttctgcgcgcaaaactgacctgtataccggcgaagcg	486
seq3	400	ACTATAGCAACTTTCTGCGCGCAAACTGACCTGTATACCGGCGAAGCG	449
epo	487	tggcgacgacgcgaacgat-ag--	507
seq3	450	TGCCGACGACGCGATCGATGAGAA	473

seq3 – нуклеотидная последовательность клона 3, полученная после секвенирования;

**Рисунок 3.3 – Выравнивание последовательностей гена ЭПО и ДНК
из клона 9**

21

нуклеотид, 3 замены азотистых оснований (A6→G6, A9→G9, A498→T498), а также инсерция одного нуклеотида после T502.

Чтобы выявить влияние данных замен на аминокислотную последовательность эритропоэтина, мы провели выравнивание белковых последовательностей, которые получили путем транслирования имеющихся нуклеотидных последовательностей (рисунок 3.4) [13].

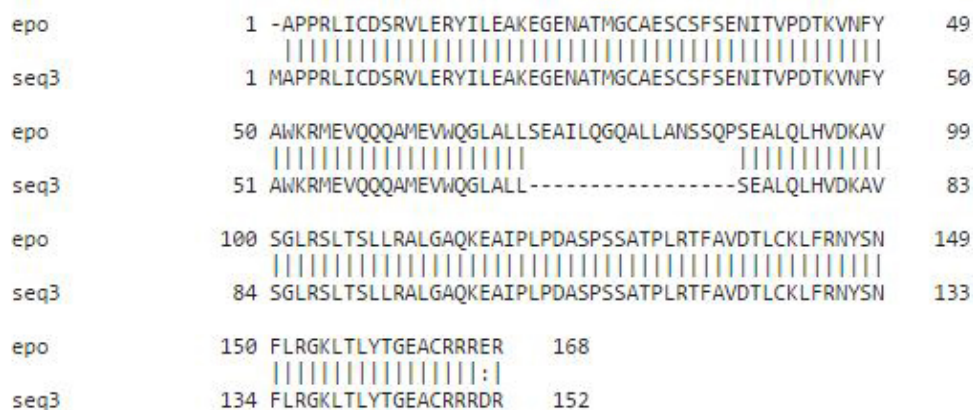


Рисунок 3.4 – Выравнивание белковых последовательностей гена эритропоэтина и последовательности, соответствующей клону 9

Из рисунка 3.6 следует, что 2 из нуклеотидных замен не привели к замене аминокислот в последовательности эритропоэтина. В третьем же случае произошла замена глутамата (E) на аспарат (D). Данные аминокислоты схожи по своим свойствам, что позволяет предполагать, что данная замена не оказывает существенного влияния на активность белка.

Инсерция одного нуклеотида после T502 не привела к удлинению полипептидной цепи, произошла лишь замена стоп-кодона: UAG→UGA (рисунок 3.4)

Таким образом, перед нами предстала задача устранить имеющуюся в полученной последовательности гена эритропоэтина делецию, а также инсерцию и нуклеотидные замены.

Для этого нами последовательно было проведено три полимеразные цепные реакции (рисунок 3.5).

Продукт первой реакции – фрагмент Forward2-Reverse1, состоящий из 117 п.н. и имеющий области перекрытия с геном эритропоэтина в составе плазмиды pET24b-epo', содержащей укороченный вариант гена эритропоэтина.

Продуктом второй реакции явился фрагмент Forward2-Reverse7 размером 281 п.н.

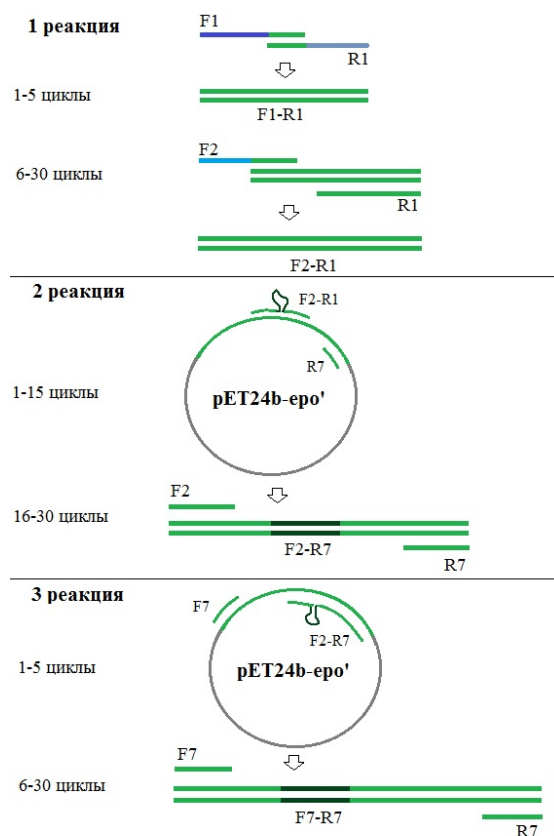
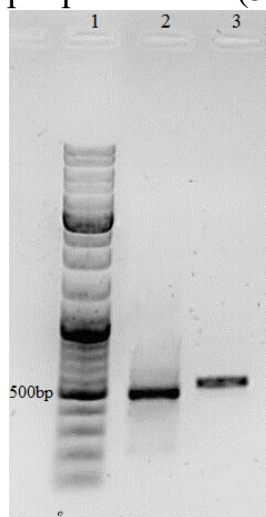


Рисунок 3.5 – Схема реакций для устранения делеции в гене эритропоэтина

Таким образом в ходе третьей реакции нами был получен полноразмерный вариант гена эритропоэтина (507 п.н) (рисунок 3.6).

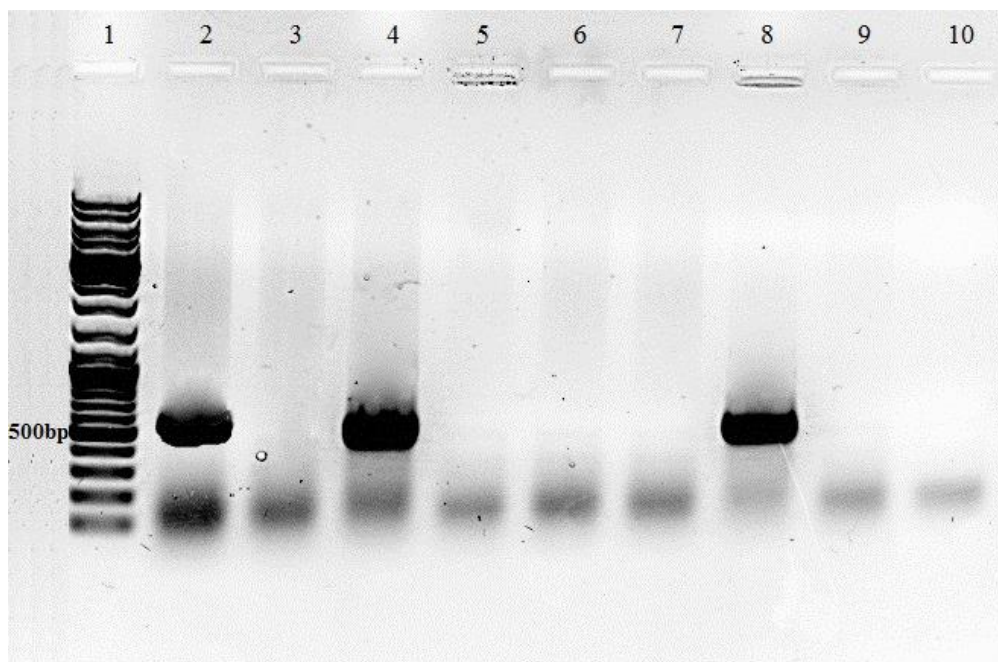


- 1 – маркер молекулярного веса;
- 2 – дефектная последовательность гена эритропоэтина
- 3 – последовательность гена после устранения делеции

Рисунок 3.6 – Сравнение полноразмерной и дефектной последовательности гена эритропоэтина

Из электрофореграммы, представленной на рисунке 3.6, следует, что с помощью метода ПЦР нам удалось устранить делецию в середине гена эритропоэтина.

Далее исправленный вариант последовательности по сайтам NdeI и EcoRI мы включили в состав плазмиды pET-24b и трансформировали данной конструкцией клетки бактерий *E. coli* XL-1 Blue. Наличие последовательности гена эритропоэтина в полученных трансформантах проверяли с помощью ПЦР (рисунок 3.7).



1—маркер молекулярного веса

2-9 – клоны 9-16

10– отрицательный контроль ПЦР

Рисунок 3.7 – Проверка клонов после трансформации на наличие последовательности ЭПО

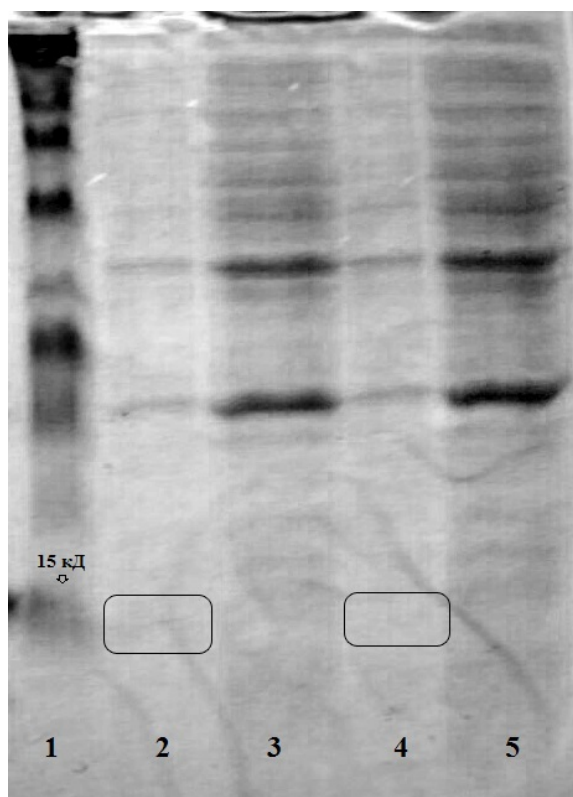
Таким образом было выявлено, что в трех из полученных трансформантов (клон 9, клон 11 и клон 15) присутствует целевая последовательность.

Далее плазмидами, выделенными из данных клонов, были трансформированы клетки *E. coli* BL21(DE3), а также данная плазмидная ДНК была отправлена на секвенирование.

В результате трансформации были получены клоны *E. coli* BL21(DE3)-еро.

Затем для клонов *E. coli* BL21(DE3)-еро провели индукцию экспрессии с использованием IPTG в конечной концентрации 1мМ. Результаты визуализировали путем проведения белкового электрофореза в

полиакриламидном геле. По результатам электрофореза было установлено, что экспрессия белка эритропоэтина свиньи в исследованных клонах не детектируется (рисунок 3.8).



1 – Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder

2 – *E. coli* BL21(DE3)-ero, клон 11.1+IPTG

3 – *E. coli* BL21(DE3)-ero, клон 11.1

4 – *E. coli* BL21(DE3)-ero, клон 11.7+IPTG

5 – *E. coli* BL21(DE3)-ero, клон 11.7

Рисунок 3.8 – Белковый электрофорез после индукции экспрессии

Результаты секвенирования показали, что клон 11 содержит полноразмерную последовательность гена эритропоэтина (рисунок 3.9) [27].

Однако мутации (3 замены азотистых оснований, а также инсерция одного нуклеотида), которые имелись у укороченной последовательности гена эритропоэтина (рисунок 3.5) методом ПЦР устранить не удалось. Кроме того, мутации остались на прежних местах, что позволило предположить, что данные мутации связаны с наличием ошибок в праймерах, которые использовались для сборки гена (Forward7 и Reverse7).

На уровне белков три из нуклеотидных замен не привели к замене аминокислот в последовательности эритропоэтина. В последнем случае в результате инсерции нуклеотида на уровне аминокислот произошла замена

глутамата (E) на аспартат (D), как и в клоне 9, полученном на предыдущих этапах работы.

```

epo_assembl 1 atggcccccgcgcctgatttgcgatagccgctgctggaacggtatat 50
epo_ref      1 ---gcccccgcgcctgatttgcgatagccgctgctggaacggtatat 47

epo_assembl 51 tctggaagcgaagaaggcgaaaacgcgacatgggctgtgcggaagct 100
epo_ref      48 tctggaagcgaagaaggcgaaaacgcgacatgggctgtgcggaagct 97

epo_assembl 101 gcagctttagcgaaaacattaccgtgccagataccaaagtgaacttttat 150
epo_ref      98 gcagctttagcgaaaacattaccgtgccagataccaaagtgaacttttat 147

epo_assembl 151 gcgtggaacgaatggaagtgcagcagcagcgatggaagtgtggcaggg 200
epo_ref      148 gcgtggaacgaatggaagtgcagcagcagcgatggaagtgtggcaggg 197

epo_assembl 201 cctggcgctgctgagcgaagcgattctgcagggccagcgctgctggcga 250
epo_ref      198 cctggcgctgctgagcgaagcgattctgcagggccagcgctgctggcga 247

epo_assembl 251 acagcagccagccgagcgaagcgctgcagctgcatgtgataaagcggtg 300
epo_ref      248 acagcagccagccgagcgaagcgctgcagctgcatgtgataaagcggtg 297

epo_assembl 301 agcggcctgcgcagcctgaccagcctgctgcgcgcgctgggagcgcaaa 350
epo_ref      298 agcggcctgcgcagcctgaccagcctgctgcgcgcgctgggagcgcaaa 347

epo_assembl 351 agaagcgattccgctgcgggatgcgagcccgagcagtgccacccgctgc 400
epo_ref      348 agaagcgattccgctgcgggatgcgagcccgagcagtgccacccgctgc 397

epo_assembl 401 gcacotttgcggtggataccctgtgcaaaactgtttcgcaactatagcaac 450
epo_ref      398 gcacotttgcggtggataccctgtgcaaaactgtttcgcaactatagcaac 447

epo_assembl 451 tttctgcgcggcaaaactgacctgtataccggcgaaagcgtgccgacgacg 500
epo_ref      448 tttctgcgcggcaaaactgacctgtataccggcgaaagcgtgccgacgacg 497

epo_assembl 501 cgaacgattgag 511
epo_ref      498 cgaacgattgag 507

```

epo_ref – нуклеотидная последовательность гена ЭПО;

epo_assembl – нуклеотидная последовательность клона 11, полученная после секвенирования

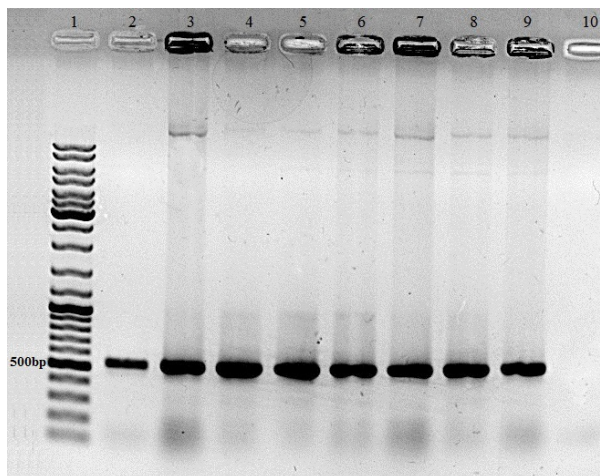
Рисунок 3.9 – Выравнивание последовательностей гена ЭПО и ДНК из клона 11

После анализа сиквенсов мы произвели замену сайта рестрикции на 3'-конце последовательности гена ЭПО с помощью ПЦР. В результате с использованием праймера R_VamHI имеющийся сайт для рестриктазы EcoRI был заменен на сайт для рестриктазы VamHI. Кроме того, ПЦР должна была устранить одну замену нуклеотида и устранить инсерцию одного нуклеотида на 3'-конце последовательности.

Таким образом, мы получили последовательность гена эритропоэтина, содержащую сайты рестрикции на 5'- и 3'-концах для рестриктаз NdeI и VamHI соответственно. По данным сайтам последовательность гена эритропоэтина была клонирована в челночный вектор pAS2. Конструкцией pAS2-epo мы трансформировали клетки *E. coli* XL-1 Blue [5].

Методами ПЦР и рестрикционного анализа было подтверждено, что все отобранные трансформанты содержат необходимую вставку (рисунок 3.10, рисунок 3.11).

Из электрофореграмм, представленных на рисунках 3.13 и 3.14 следует, что в ходе работы нам удалось получить штаммы *E. coli* XL-1-pAS2еро, которые несут генетическую конструкцию pAS2-еро.

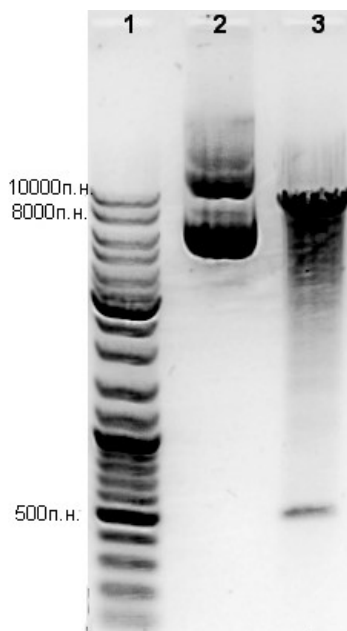


1- маркер молекулярного веса

2-9 – клоны от 1 до 8 соответственно

10 – отрицательный контроль ПЦР

Рисунок 3.10 – Проверка клонов *E. coli* XL-1-pAS2еро после трансформации



1 – DNA Ladder Mix

2 - pAS2

3 - pAS2-еро, выделенная из клона 1

Рисунок 3.11 – Рестрикционный анализ клона 1 *E. coli* XL-1-pAS2еро после трансформации

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. С помощью информатических подходов была разработана нуклеотидная последовательность гена эритропоэтина свиньи, кодонный состав которой адаптирован для экспрессии в клетках дрожжей.

2. Методом ПЦР была синтезирована модифицированная кодирующая последовательность гена эритропоэтина свиньи.

3. На основе бактериального вектора pET24b получены рекомбинантные конструкции pET24b-epo и pET24b-epo' несущие, соответственно, полную и усечённую кодирующие последовательности гена эритропоэтина свиней.

4. На основе *E. coli* XL-1 Blue и *E. coli* BL21(DE3) получены штаммы, *E. coli* XL-1-epo', *E. coli* XL-1-epo, *E. coli* XL-1-pAS2epo, *E. coli* BL21(DE3)-epo', *E. coli* BL21(DE3)-epo несущие химерные генетические конструкции pET24b-epo', pET24b-epo и pAS2-epo.

5. Штаммы *E. coli* BL21(DE3)-epo' и *E. coli* BL21(DE3)-epo, при культивировании в условиях индукции экспрессии не накапливали в достаточных для детекции количествах белковых продуктов сходных по массе с эритропоэтином.

6. На основе челночного вектора pAS2 получена рекомбинантная конструкция pAS2-epo, предназначенная для экспрессии гена свиного эритропоэтина в клетках *S. cerevisiae*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Orkin, S.H. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology / S.H. Orkin, L.I. Zon // *Cell*. – 2008. – Т. 132, № 4. – С. 631-644.
2. Hamasaki, N. Red blood cell function and blood storage / N. Hamasaki, M. Yamamoto // *Vox Sang.* – 2000. – Т. 79, № 4. – С. 191-197.
3. Ontogeny of erythropoietin mRNA expression in liver, kidneys and testes of the foetal and the neonatal pig / R.B. David [et al.] // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2002. – Т. 131, № 3. – С. 527-533.
4. Palis, J. Developmental biology of erythropoiesis / J. Palis, G.B. Segel // *Blood Rev.* – 1998. – Т. 12, № 2. – С. 106-114.
5. Watowich, S.S. Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization / S.S. Watowich, D.J. Hilton, H.F. Lodish // *Mol. Cell. Biol.* – 1994. – Т. 14, № 6. – С. 3535-3549.
6. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage / C.T. Noguchi [et al.] // *Expert Rev Mol Med.* – 2008. – Т. 10. – С. e36.
7. Dinarello, C.A. Historical Review of Cytokines / C.A. Dinarello // *Eur J Immunol.* – 2007. – Т. 37, № Suppl 1. – С. S34-S45.
8. The porcine erythropoietin gene: cDNA sequence, genomic sequence and expression analyses in piglets / R.B. David [et al.] // *Domest. Anim. Endocrinol.* – 2001. – Т. 20, № 2. – С. 137-147.
9. Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains / D. Wen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Т. 269, № 36. – С. 22839-22846.
10. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation / J.C. Cheetham [et al.] // *Nat. Struct. Biol.* – 1998. – Т. 5, № 10. – С. 861-866.
11. erythropoietin, partial [Sus scrofa] - Protein - NCBI [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/164446>. – Дата доступа: 06.12.2017.
12. Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals / D. Wen [et al.] // *Blood*. – 1993. – Т. 82, № 5. – С. 1507-1516.
13. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework / W. Li [и др.] // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Т. 43, № Web Server issue. – С. W580-W584.

Применение ИТ в получении химерной конструкции для экспрессии гена эритропоэтина свиней в клетках *Saccharomyces cerevisiae*

Диссертация на соискание степени магистра биологических наук

Соискатель – Колковская Е. В.
Научный руководитель – к.б.н. Валентович Л. Н.

Т
А
Ц
О
Г
Р
Н
П
С

Содержание

- Тема и руководитель
- Актуальность
- Поставленные цели и задачи
- Объект и предмет исследования
- Научная гипотеза
- Основные результаты
- Научная новизна
- Положения, выносимые на защиту
- Спасибо за внимание

Т
А
Ц
О
Г
Р
Н
П
С

Актуальность работы

Животноводство – одна из ключевых сельскохозяйственных отраслей, на долю которой приходится более 65% общей выручки от реализации продукции в аграрном секторе экономики и 96 – 97% от экспорта сельскохозяйственной продукции.

В Республике Беларусь остро стоит проблема повышения жизнеспособности молодняка свиней. Алиментарная анемия – одно из наиболее распространенных заболеваний молодняка.

В профилактике и лечении анемии человека уже длительное время используют эритропоэтин, рентабельность получения которого значительно выше при микробном синтезе. В ходе работы сконструирована векторная система для высокоэффективного синтеза эритропоэтина в клетках дрожжей.

Т
А
Ц
О
Г
Р
Н
П
С

Цели и задачи

Целью работы явилось создание генетической конструкции для экспрессии гена эритропоэтина в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с использованием информационных технологий.

Задачи:

- ✓ С помощью информатических подходов разработать нуклеотидную последовательность гена эритропоэтина свиньи, кодонный состав которой адаптирован для экспрессии в клетках дрожжей;
- ✓ Синтезировать оптимизированную для экспрессии в клетках дрожжей кодирующую последовательность гена эритропоэтина свиней методом ПЦР;
- ✓ На основе плазмид pET24b и pAS2 получить химерные генетические конструкции, несущие последовательность гена свиного эритропоэтина;
- ✓ На основе *Escherichia coli* XL-1 Blue и *E. coli* BL21(DE3) получить штаммы, несущие химерные генетические конструкции pET24b-epo и pAS2-epo;
- ✓ Исследовать экспрессию гена эритропоэтина свиней в полученных штаммах *E. coli* BL21(DE3)- pET24b-epo.

Т
А
Ц
О
Г
Р
Н
П
С

Объекты исследования

Объектом исследования выступала кодирующая последовательность гена эритропоэтина свиньи.

В работе использовались следующие штаммы и плазмиды: *Escherichia coli* XL-1Blue, *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, плазида pET-24b(+), плазида pAS2.

Т
А
Ц
О
Г
Р
Н
П
С

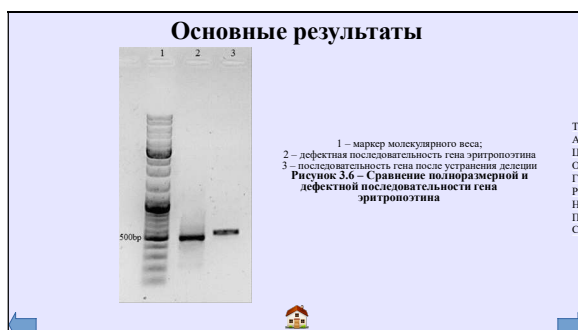
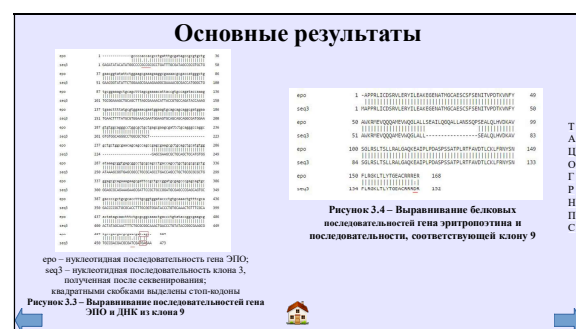
Научная гипотеза

Цитокин эритропоэтин способствует восстановлению собственного кроветворения и компенсирует анемию.

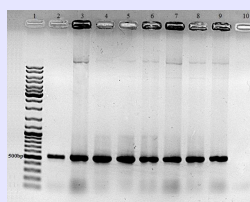
Так как эритропоэтин характерен для всех млекопитающих, он может быть использован как основа для создания препаратов не только в области фармацевтики, но и в области ветеринарии при создании профилактических и лечебных препаратов.

Создание и использование рекомбинантного свиного эритропоэтина с использованием генно-инженерных подходов может явиться решением в борьбе с алиментарной анемией поросят.

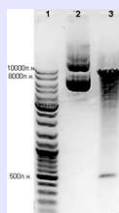
Т
А
Ц
О
Г
Р
Н
П
С



Основные результаты



1 - маркер молекулярного веса
2-9 - клоны от 1 до 8 соответственно
10 - отрицательный контроль ПЦР
Рисунок 3.10 - Проверка клонов
E. coli XL-1-pAS2ero после трансформации



1 - DNA Ladder Mix
2 - pAS2
3 - pAS2-ero, выделенная из клон 1
Рисунок 3.11 - Рестрикционный анализ
клон 1 *E. coli* XL-1-pAS2ero после
трансформации

Научная новизна

С помощью метода ПЦР мы синтезировали полноразмерную кодирующую последовательность гена эритропоэтина (507 п.н.), которая была разработана при помощи ПО.

Полученная последовательность в составе вектора pET-24b (+) методом кальциевой трансформации была перенесена в клетки *E. coli* XL-1Blue и *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RPL. Наличие целевых гибридных последовательностей устанавливалось рестрикционным анализом, ПЦР и секвенированием по методу Сенгера и последующего анализа данных в программе. В полученных трансформантах *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RPL провели индукцию экспрессии с использованием в качестве индуктора IPTG в конечной концентрации 1мМ. Проведение белкового ДСН-ПААГ электрофореза не выявило экспрессии целевого белка. Полученная последовательность гена ЭПО была включена в состав челночного вектора pAS2. Конструкция pAS2-ero была перенесена в клетки *E. coli* XL-1Blue.

В результате, на основе векторной молекулы pAS2 нами была получена генетическая конструкция, предназначенная для экспрессии гена эритропоэтина свиней в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.

Положения, выносимые на защиту

1. С помощью информатических подходов была разработана нуклеотидная последовательность гена эритропоэтина свиньи, кодонный состав которой адаптирован для экспрессии в клетках дрожжей.

2. Методом ПЦР была синтезирована модифицированная кодирующая последовательность гена эритропоэтина свиньи.

3. На основе бактериального вектора pET24b получены рекомбинантные конструкции pET24b-ero и pET24b-ero' несущие, соответственно, полную и усеченную кодирующие последовательности гена эритропоэтина свиньи.

4. На основе *E. coli* XL-1 Blue и *E. coli* BL21(DE3) получены штаммы, *E. coli* XL-1-ero', *E. coli* XL-1-ero, *E. coli* XL-1-pAS2ero, *E. coli* BL21(DE3)-ero', *E. coli* BL21(DE3)-ero несущие химерные генетические конструкции pET24b-ero', pET24b-ero и pAS2-ero.

Положения, выносимые на защиту (продолжение)

5. Штаммы *E. coli* BL21(DE3)-ero' и *E. coli* BL21(DE3)-ero, при культивировании в условиях индукции экспрессии не накапливали в достаточных для детекции количествах белковых продуктов сходных по массе с эритропоэтином.

6. На основе челночного вектора pAS2 получена рекомбинантная конструкция pAS2-ero, предназначенная для экспрессии гена свиного эритропоэтина в клетках *S. cerevisiae*.

Спасибо за внимание


О себе

Публикации

Файлы

Контакты

Охремчук Екатерина Владимировна



Родилась 24 августа 1995 года в г. Бобруйске, где в 2012 году закончила среднюю школу №6. В 2017 году закончила биологический факультет БГУ (кафедра микробиологии) с дипломной работой «Получение химерной рекомбинантной конструкции для экспрессии гена эритропоэтина свиней в клетках *Saccharomyces cerevisiae*» [1][2], после чего поступила в магистратуру БГУ. Область научных интересов: генная инженерия, молекулярная биология. Научный руководитель: к.б.н., доцент, зав. лабораторией ЦАГИИ ИМ НАН РБ Валентович Леонид Николаевич [3].

Ссылка на сайт: <https://katerinaohr.github.io/masterbio/>