

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**  
**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
**Кафедра микробиологии**

**КОЛКОВСКАЯ**  
Екатерина Владимировна

**ПОЛУЧЕНИЕ ХИМЕРНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ  
ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЭРИТРОПОЭТИНА СВИНЕЙ В  
КЛЕТКАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Дипломная работа

Научный руководитель:  
научный сотрудник С.Г. Голенченко

Допущена к защите  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.  
Зав. кафедрой микробиологии

Доктор биологических наук, профессор  
\_\_\_\_\_ В.А. Прокулевич

Минск, 2017

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат.....	3
Перечень условных обозначений.....	6
Введение.....	7
Глава 1. Аналитический обзор литературы.....	9
1.1 Роль эритропоэтина в процессе эритропоэза.....	9
1.1.1. Сущность эритропоэза.....	9
1.1.2 Механизм действия ЭПО.....	10
1.1.3 Применение ЭПО для стимуляции кроветворения.....	12
1.2 Структурно-функциональная организация эритропоэтина.....	13
1.2.1 Ген эритропоэтина.....	13
1.2.2 Молекула эритропоэтина.....	14
1.3 Возможности синтеза эритропоэтина.....	17
1.3.1 Производство rHuEPO.....	18
1.3.2 Возможность синтеза эритропоэтина в клетках дрожжей.....	20
1.3.3 Возможность синтеза ЭПО в клетках бактерий.....	21
Глава 2. Материалы и методы.....	23
2.1 Объекты исследования.....	23
2.2 Среды и растворы.....	23
2.3 Методы исследования.....	26
Результаты и их обсуждение.....	33
Выводы.....	46
Список использованных источников.....	47
Публикации.....	50

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа включает 49 страниц, 19 рисунков, 4 таблицы и 29 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*.

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.

С помощью метода ПЦР мы синтезировали полноразмерную кодирующую последовательность гена эритропоэтина (507 п.н.). 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. 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*.

## РЭФЕРАТ

Дыпломная праца ўключае 49 старонак, 19 малюнкаў, 4 табліцы, 29 крыніц літаратуры.

Ключавыя словы: СВІНЫ ЭРЫТРАПАЭТЫН, АЛІМЕНТАРНАЯ АНЕМІЯ, ГІБРЫДНЫЯ ГЕНЕТЫЧНЫЯ КАНСТРУКЦЫІ, ПЛАЗМІДЫ, ПАЛІМЕРАЗНАЯ ЛАНЦУГОВАЯ РЭАКЦЫЯ.

Мэтай дыпломнай працы з'явілася стварэнне генетычнай канструкцыі для экспрэсіі гена эрытрапаэтына свіней у клетках дражджэй *Saccharomyces cerevisiae*.

Аб'ектам даследавання з'яўлялася паслядоўнасць гена эрытрапаэтына свінні.

У працы выкарыстоўваліся наступныя штамы і плазміды: *Escherichia coli* XL-1Blue, *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, плазміда pET-24b(+), плазміда pAS2.

Метадам ПЛР мы сінтэзавалі поўнапамерную кадавальную паслядоўнасць гена эрытрапаэтына (507 п.н.). Фрагменты ДНК аналізаваліся шляхам правядзення электрофарэзу ў 1% агарозавым гелі з бромістым этыдыем.

Паслядоўнасць гена эрытрапаэтына ў складзе вектара pET-24b (+), была перанесена ў клеткі быктэрыі *E. coli* XL-1Blue і *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL метадам кальцыевай трансфармацыі. Наяўнасць мэтавых гібрыдных генетычных канструкцый вызначалася наступнымі метадамі: рыстрыкцыйны аналіз, ПЛР, секвенаванне па метадазе Сэнгера. У клетках *E. coli* BL21-Codon-Plus(DE3)-RIPL-еро мы індуктавалі экспрэсію. Для гэтага ў якасці індуктара выкарыстоўвалі IPTG у канчатковай канцэнтрацыі 1мМ. Правядзенне бялковага ДСН-ПААГ электрофарэзу не выявіла экспрэсіі мэтавага бялку. Паслядоўнасць гена эрытрапаэтына мы таксама ўлучылі ў чоўнавы вектар pAS2, і канструкцыя pAS2- еро была перанесена ў *E. coli* XL-1Blue.

Такім чынам, на аснове вектранай малекулы pAS2 намі была атрымана генетычная канструкцыя, якая прызначана для экспрэсіі гена эрытрапаэтына свіней ў клетках дражджэй *S. cerevisiae*.

## THE ABSTRACT

Diploma work includes 49 pages, 19 pictures, 4 tables, 29 sources.

Keywords: ERYTHROPOIETIN, ALIMENTARY ANEMIA, HYBRID GENETIC CONSTRUCTS, PLASMIDS, PCR.

The purpose of the diploma work is to make a recombinant genetic construct for expression pig erythropoietin in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells.

The object of study was the coding sequence of the porcine erythropoietin gene.

Strains and plasmids: *Escherichia coli* XL-1Blue, *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL.

The coding sequence of porcine erythropoietin was synthesized by PCR (507 bp). The DNA fragments were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis (with EtBr).

The erythropoietin gene was cloned into pET-24b bacterial vector and was introduced into *E. coli* XL-1Blue and *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Competent cells for bacterial transformation were prepared by the calcium chloride. The presence of the target sequence was detected by restriction analysis, PCR and Sanger sequencing. 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. The coding sequence of porcine erythropoietin also was cloned into pAS2 shuttle vector and was introduced into *E. coli* XL-1Blue.

In the result, we made recombinant genetic constructs: pET-24b-epo and pAS2-epo that can be used for porcine erythropoietin expression in *E. coli* and *S. cerevisiae* cells respectively.

## ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

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

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных задач сельского хозяйства нашей Республики является производство продуктов питания для удовлетворения потребностей населения и поставок на экспорт. 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 [7].

В Республике Беларусь остро стоит проблема повышения жизнеспособности молодняка свиней. Алиментарная анемия – одно из наиболее распространенных заболеваний молодняка. Третья часть убытков в свиноводстве происходит от данного заболевания.

Алиментарная анемия заключается в снижении числа эритроцитов, а также снижении активности железосодержащих ферментов. У поросят с данным заболеванием нарушаются окислительные процессы и развивается кислородное голодание тканей. Алиментарная анемия сопровождается развитием вторичной иммунной недостаточности, что в свою очередь угнетает эритропоэз, вследствие чего наблюдается ещё более тяжёлое течение анемии. На фоне понижения иммунного статуса возникают вторичные болезни органов пищеварительной и дыхательной системы [6].

В настоящее время для профилактики алиментарной анемии поросят в Республике Беларусь новорожденным животным инъектируют препараты железа (ферродекс, импозил, миофер, ферроглюкин и др.). Данные препараты относятся к железодекстрановым препаратам, которые вводятся поросятам путем внутримышечных инъекций в возрасте 2–3 дней.

Недостатком данного способа профилактики является его низкая эффективность, а также повышенная чувствительность поросят к данным препаратам на фоне авитаминоза Е. Также препараты железа ухудшают всасывание антибиотика тетрациклина, применяемого при заболеваниях желудочно-кишечного тракта поросят. Более того, данный способ профилактики производится на раннем этапе постнатального развития поросят и, в перспективе, такое лечение не служит гарантией профилактики развития вторичной гипопластической анемии [8].

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. Гормон действует на кроветворные органы путем ингибирования апоптоза эритроидных предшественников и стимулирования их пролиферации и дифференцировки, что приводит к повышению их жизнеспособности и численности [1; 25].

Доказано действие эритропоэтина на скорость утилизации железа, синтеза глобина и порфиринов, а также на скорость выхода ретикулоцитов из костного мозга в кровь и превращение их в зрелые эритроциты.

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.

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

Для выполнения цели были поставлены следующие **задачи**:

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



# 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 [6].

Главная функция красных кровяных телец – перенос кислорода от легких к тканям и всем частям тела, а также транспорт углекислого газа обратно для процессов обмена [1].

Эритроциты образуются в красном костном мозгу, в котором содержатся плюрипотентные стволовые клетки – общие предшественники всех клеток крови. Из плюрипотентных стволовых клеток развиваются либо лимфатические, либо миелоидные стволовые клетки. Миелоидные стволовые клетки (колониеобразующие единицы, или CFU-GEMM) дают начало гематopoэтическим линиям, формирующим эритроциты, моноциты, мегакариоциты и гранулоциты (рисунок 1.1).

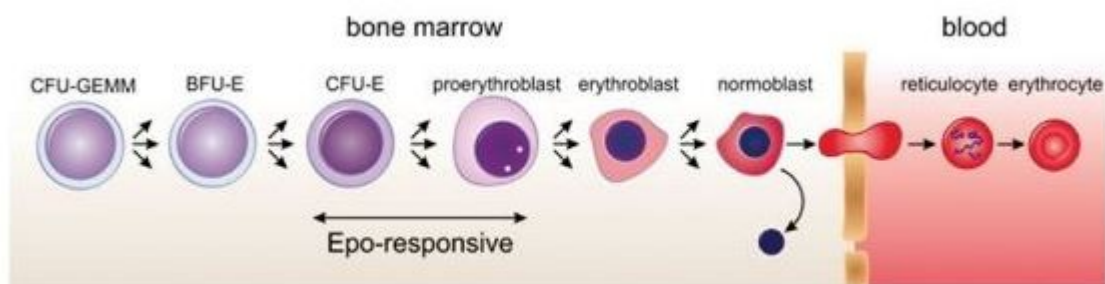


Рисунок 1.1 – Мишени эритропоэтина в ходе эритропоэза [15]

В случае эритропоэза, CFU-GEMM являются предшественниками эритроцитарных бурсообразующих единиц (БОЭ, или BFU-E), которые, в свою очередь, дают начало колониеобразующим единицам эритроцитов (КОЕ-Э, или CFU-E). Следующей стадией эритропоэза является образование проэритробластов, которые позже развиваются в базофильные эритробласты, а они, в свою очередь, – в полихроматофильные нормобласты. Полихроматофильные нормо-

бласты превращаются в оксифильные нормобласты, которые преобразуются в ретикулоциты и покидают костный мозг. Попадая в кровеносное русло, ретикулоциты в течение нескольких часов превращаются в зрелые эритроциты. В нормальных условиях количество ретикулоцитов составляет от 1 до 10% от общего числа эритроцитов [1; 14; 6].

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 [22].

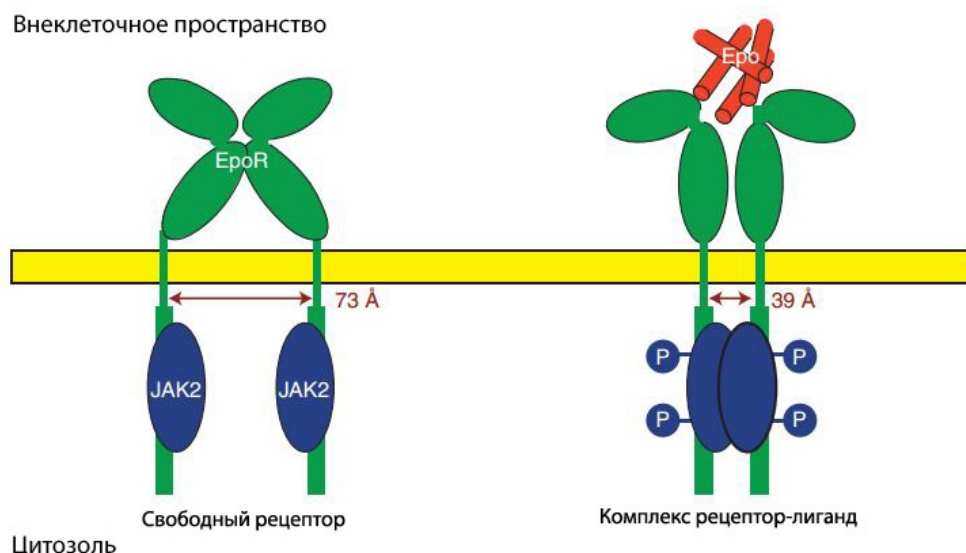
### 1.1.2 Механизм действия ЭПО

Эритропоэтин – гормон гликопротеиновой природы, который ускоряет пролиферацию предшественников эритроцитов (на стадии BFU-E) в костном мозгу (рисунок 1.1), а также стимулирует дифференцировку CFU-E, что приводит к увеличению числа гемоглобин-образующих эритробластов (т.е. проэритробластов). ЭПО инициирует ряд событий, включая синтез цепей глобина, гемоглобина, рецептора трансферрина, интегральных мембранных белков эритроцитов. Также эритропоэтин предотвращает апоптоз CFU-E. Гормон не воздействует на ретикулоциты и зрелые эритроциты [14].

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). Наибольшее количество EPO-R обнаруживается на эритроидных предшественниках на стадии CFU-E. Тем не менее, в сравнении с другими рецепторами, находящимися на клеточной поверхности, CFU-E синтезируют небольшое количество EPO-R: от 800 до 1200 сайтов связывания на клетку. 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 [10; 25].

При связывании с ЭПО рецептор претерпевает конформационные изменения, что приводит к контакту внутриклеточных доменов, благодаря чему осуществляется фосфорилирование JAK2-киназы, которая ассоциирована с ци-

топлазматической частью рецептора, и происходит инициация каскада внутриклеточной передачи сигнала (рисунок 1.2). В результате происходит усиление экспрессии антиапоптозных факторов, что приводит к усилению эритропоэза. Внутриклеточная передача сигнала завершается дефосфорилированием JAK2, интернализацией и деградацией EPO-R [15; 12].



**Рисунок 1.2 – Взаимодействие ЭПО с рецептором [12]**

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

Идея о том, что продукция ЭПО активируется при гипоксии и это стимулирует эритропоэз, привела к общепринятой парадигме о регуляции по принципу обратной связи, аналогичной тем, которые лежат в основе регулирования уровня глюкозы в крови с помощью инсулина и др.

Гипоксия индуцирует повышение экспрессии гормона эритропоэтина, который затем циркулирует в плазме крови и связывается с рецепторами на эритроидных клетках-предшественниках, способствуя тем самым повышению жизнеспособности, пролиферации и окончательной дифференцировке предшественников, что в итоге приводит к увеличению количества эритроцитов в крови. Тем самым увеличивается и кислородная емкость крови и, соответственно, повышается концентрация кислорода в тканях, завершая этим цикл обратной связи и подавляя дальнейшую экспрессию ЭПО [23].

Основным местом синтеза ЭПО у взрослых особей млекопитающих являются почки. Так как кровоток в корковом веществе почек точно соответствует уровню потребления кислорода, Эрслев и др. (1985) предположили, что

проксимальные каналы нефронов почек являются идеальным местом для синтеза эритропоэтина. Проведенные исследования подтверждают, что синтез мРНК ЭПО происходит в перитубулярных фибробластах в корковой области почек, вблизи границы с мозговым веществом [22].

Меньшее количество гормона продуцируется в печени. В печени ЭПО экспрессируется как в гепатоцитах, так и в интерстициальных клетках. Также в малых количествах гормон синтезируется в семенниках, селезенке, яичниках, плаценте [28].

Серия исследований, проведенных на свиньях (*Sus scrofa*), показала, что у новорожденных почки и печень вносят равный вклад в общее количество мРНК эритропоэтина. Однако уже в возрасте двух дней вклад почек превосходит вклад печени в 6 раз. На 14 день результаты существенно не изменяются, а на 35 день количество мРНК, синтезированное почками, значительно больше, чем синтезированное печенью [22].

В ходе многочисленных физиологических исследований была отмечена распространенная, хотя и не полная перекрестная реактивность между эритропоэтином человека и ЭПО ряда других млекопитающих, включая мышей, крыс, овец и кроликов. Было отмечено, что амфибии, птицы и рыбы продуцируют эритропоэтические гормоны, которые не способны к перекрестной реактивности с эритроидными клетками млекопитающих и наоборот [18].

### 1.1.3 Применение ЭПО для стимуляции кроветворения

Генно-инженерный эритропоэтин — один из первых цитокинов, вошедших в повседневную клиническую практику, и наиболее широко используемый в настоящее время. Лечение эритропоэтином эффективно при анемии у больных с хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе, когда помимо очистительной функции почек нарушается также способность почечного эпителия синтезировать ЭПО. Главный результат применения ЭПО — возможность восстановления собственного кроветворения и компенсация анемии без переливания донорской крови. ЭПО также эффективен при травмах, в хирургической и акушерской практике, а также в других областях медицины, где требуется стимуляция кроветворения, например, для лечения анемий, часто сопровождающих онкологические заболевания. Применение ЭПО позволяет поддерживать уровень гемоглобина в крови пациентов на нормальном уровне, повышает их активность и общее качество жизни.

Рецепторы ЭПО обнаружены не только на мембранах эритроидных предшественников, но и на клетках эндотелия, гладкомышечных клетках, нейронах, астроцитах, клетках почек и слизистой оболочки желудка. Известно, что ЭПО также активирует систему фактора роста сосудистого эндотелия и его рецепто-

ров, что стимулирует рост сосудов. Кроме того, ЭПО оказывает тормозящее действие на апоптоз клеток путем активации Bcl-2 и инактивации каспаз [29; 2].

Таким образом, 3 основные функции ЭПО заключаются в:

1. активации эритропоэза для компенсации кровопотери;
2. стимуляции неоангиогенеза для обеспечения посттравматической регенерации тканей;
3. блокировании апоптоза для увеличения выживаемости клеток различных тканей с целью максимальных темпов восстановления [2].

Эритропоэтиновый допинг активно используют в видах спорта с преимущественным проявлением выносливости (бег, плавание, лыжные гонки, конькобежный спорт, гребля, велосипедный спорт и др.), когда расходуется большое количество энергии, а сама работа выполняется с очень высокой интенсивностью, так как гормон повышает кислородную емкость крови. Максимальный эффект наблюдается через 12-18 часов после инъекции ЭПО. Однако существует серьезная опасность при использовании ЭПО в виде допинга, которая состоит в том, что при высокой концентрации эритроцитов возможно сгущение крови (т.е. агрегация эритроцитов вследствие уменьшения величины отрицательного заряда их мембраны с дальнейшей агрегацией на эритроцитарных сгустках тромбоцитов и лейкоцитов), увеличение ее вязкости, тромбообразование. Все эти факторы усиливают нагрузку на сердце, а в худшем случае происходит тромбоэмболия с летальным исходом [4].

Однако ряд исследований показывает, что с использованием генно-инженерных подходов можно повысить специфичность действия гормона, таким образом снизив проявление побочных эффектов от применения ЭПО [26].

Обобщая данную информацию можно сделать вывод о том, что эритропоэтин является важнейшим регулятором эритропоэза в организме животных. ЭПО действует на CFU-E, тонко регулируя кислородную емкость крови. Также ЭПО обладает рядом внеэритроидных функций, что улучшает состояние организма в целом, благодаря чему гормон получил широкое распространение в медицинской практике.

## **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. Сравнение свиной

нуклеотидной последовательности с соответствующими последовательностями у человека и мыши выявило идентичность на 80% и 73% соответственно, что указывает на высокую степень гомологии последовательностей даже в некодирующих областях. Наиболее консервативная область находится непосредственно перед сайтом начала транскрипции. Первый интрон также гомологичен у большинства видов. Однако интроны 2, 3 и 4 сильно варьируют по размеру и нуклеотидному составу у разных видов [16; 18; 20].

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 [28].

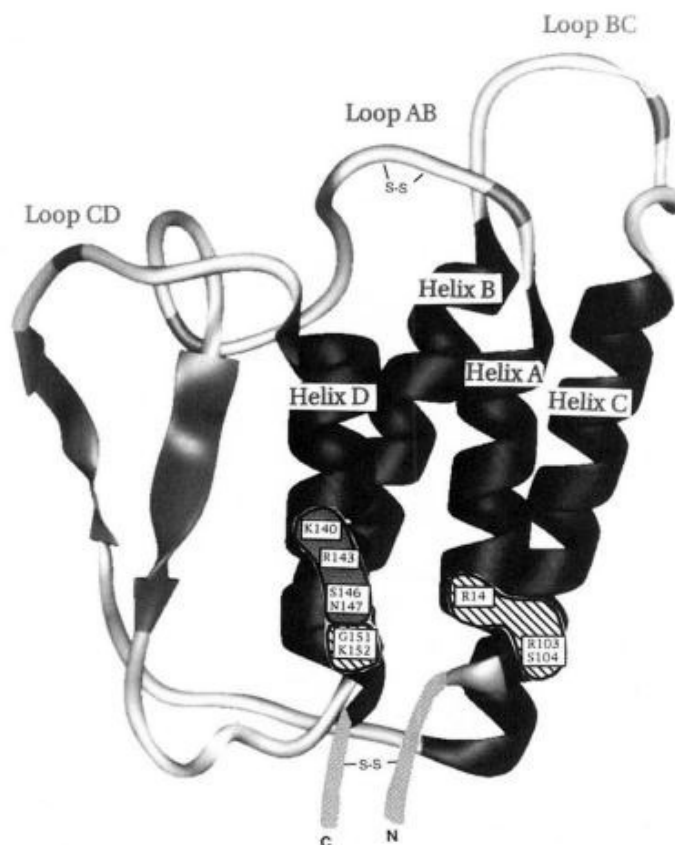
### 1.2.2 Молекула эритропоэтина

Все вышеуказанные цитокины в процессе фолдинга приобретают глобулярную трехмерную структуру, состоящую из 4 антипараллельных  $\alpha$ -спиралей, соединенных петлями, не имеющими вторичной структуры, и стабилизированных дисульфидными связями (рисунок 1.3). Предполагается, что петли не имеют значения для связывания с рецептором, а также для биологической активности цитокина. Данное предположение было подтверждено в опытах: при делеции в неспиральных областях С-конца и N-конца белка, а также в петлях между спиралями синтезируется функционально активный гормон. Кроме того, аминокислотный состав данных участков не консервативен среди млекопитающих [28; 11].

Функционально важные сайты для контакта с рецептором на поверхности эритроидных предшественников находятся на  $\alpha$ -спиралях молекулы ЭПО. А так как  $\alpha$ -спирали в эритропоэтине амфипатические, они контактируют между собой гидрофобными поверхностями, и функционально важные сайты для связывания с рецептором располагаются на наружных поверхностях спиралей [17; 21].

Свиной ЭПО состоит из 194 аминокислотных остатков, из которых 26 остатков приходится на сигнальный пептид, необходимый для транслокации белка. Молекулярная масса зрелого белка составляет 34 кД [16].

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 [18].



**Рисунок 1.3 – Трехмерная структура молекулы эритропоэтина [17];**

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

Около 40% от молекулярной массы свиного эритропоэтина составляют углеводные фрагменты. ЭПО имеет 4 сайта гликозирования: три сайта N-гликозирования (в положениях 24, 38, 83) и один сайт O-гликозирования (в 126 положении) [19].

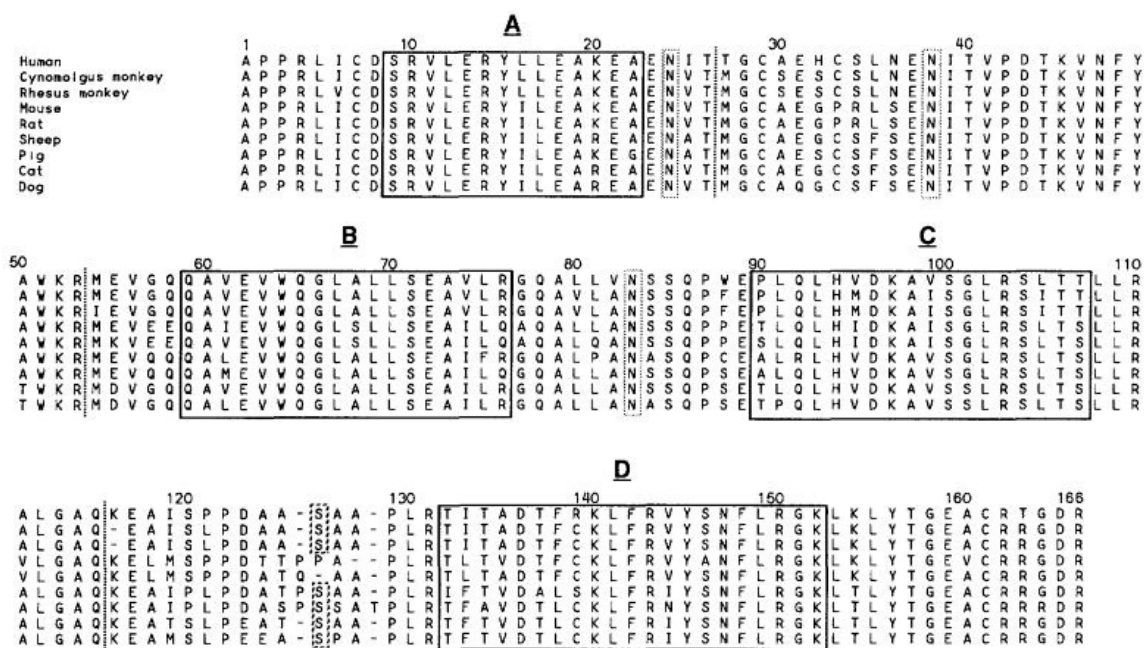


Рисунок 1.4 – Сравнение аминокислотных последовательностей ЭПО млекопитающих [18];

A, B, C, D –  $\alpha$ -спирали;

пунктирная линия отражает сайты гликозилирования;

вертикальными линиями обозначены границы между экзонами

Стопроцентная консервативность характерна для всех трех остатков аспарагина, ответственных за N-гликозидные связи (рисунок 1.4). Несмотря на то, что эритропоэтин, лишенный углеводных компонентов (путем ферментативного отщепления либо из-за синтеза гормона в клетках бактерий), полностью активен *in vitro*, в организме животного его активность полностью зависит от наличия N-гликозидных связей в молекуле. В отличие от вышесказанного, сайт O-гликозилирования (Ser126) не имеет существенного значения для функциональной активности при промышленном производстве гормона. Сайт O-гликозилирования отсутствует вовсе в молекуле ЭПО мышей и крыс [18].

Серия экспериментов, проведенных с использованием олигонуклеотид-направленного мутагенеза, выявила функциональную значимость сайтов гликозилирования в молекуле ЭПО. Было установлено, что потеря гликозилирования в 24 положении не приводит к потере функциональной активности, однако сайты N-гликозилирования в 38 и 83 положении необходимы для процессов фолдинга и секреции гормона аппаратом Гольджи (секреция ЭПО снижается до 10% при отсутствии N-гликозилирования). Также было показано, что при поте-



ре углеводных компонентов в положениях 38 и 83 гормон, находясь в кровотоке, быстро деградирует, что позволяет предположить, что данные сайты обеспечивают защиту молекулы от протеолиза. Исследование сайта О-гликозилирования позволило предположить, что данный сайт может служить для стабилизации складчатой структуры молекулы [17].

Таким образом, для поддержания функциональной активности молекуле ЭПО необходимы два из четырех сайта гликозилирования (38 и 83). Сайт N-гликозилирования в положении 24, а также сайт О-гликозилирования не имеют существенного значения для промышленного производства ЭПО.

В состав эритропоэтина входит 5 остатков цистеина, что предполагает наличие двух дисульфидных связей в молекуле. Наблюдается стопроцентная консервативность Cys7 на N-концевом участке полипептида и Cys161 вблизи С-конца. Эта дисульфидная связь необходима для формирования стабильной и функционально активной формы цитокина. Потеря данной дисульфидной связи приводит к полной утрате биологической активности. В то время как Cys29 является инвариантным аминокислотным остатком, Cys33 присутствует только в гормоне приматов, овец, свиней и кошек, но не у грызунов (крыс, мышей), у которых в 33 положении находится остаток пролина. Отсутствие функциональной значимости в этой короткой дисульфидной петле подтверждено исследованиями мутеинов (мутантные белки, продукты мутантных генов), в которых аминокислотный остаток в 33 положении заменен на остаток тирозина. Данная замена не оказывает эффекта на биологическую активность эритропоэтина [16; 18].

Следовательно, лишь одна из двух имеющихся в молекуле ЭПО дисульфидных связей имеет значение для формирования активной формы цитокина.

Таким образом можно заключить, что 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 сай-

там 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.

Процесс производства включает ряд последовательных стадий, которому предшествует создание клеточных линий, их селекция и скрининг, а также создание банка клеток, который содержит исходный материал для производства (рисунок 1.5). После создания банка клеток проводится оценка безопасности. В ходе проверки осуществляется сравнение желаемой нуклеотидной последовательности с последовательностью в составе генома модифицированных клеток, а также соответствие аминокислотной последовательности гормона. Так как клетки млекопитающих теоретически могут выступать в качестве хозяев вирусов и микроорганизмов, клетки проверяют на наличие микоплазм и других бактерий, грибов, вирусов.

Первый этап производства – культивирование клеток. Способность синтезировать клетками продукт зависит от таких параметров, как состав питательной среды, температура, pH и др. Культивирование может осуществляться одним из следующих методов: методом периодических культур, методом периодических культур с подпиткой, перфузионным методом.



**Рисунок 1.5 – Схема получения продуцента и производства эритропоэтина**

Далее следует этап концентрации и диафильтрации полученного продукта. На данном этапе происходит удаление буферных солей и других компонентов с высокой проводимостью или низким молекулярным весом, которые могут помешать в ходе очистки (например, при ионообменной хроматографии). Концентрирование осуществляется при помощи ультрафильтрационных мембран.

После фильтрации следует хроматография, благодаря которой можно удалить ДНК, белки клетки хозяина, эндотоксины и др. Для отделения гHuEPO от других компонентов используют обращенно-фазовую хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию [13].

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. Также при данном методе необходим четкий контроль и отбор клеточных линий, которые будут продуцировать необходимую форму гормона. Плюсом данного метода является то, что клетки млекопитающих обладают необходимыми системами посттрансляционной модификации, что позволяет получить гликозилированную форму продукта без дополнительных манипуляций.

### 1.3.2 Возможность синтеза эритропоэтина в клетках дрожжей

Как известно, дрожжи являются эукариотическими организмами и обладают схожей с высшими эукариотами субклеточной организацией. А значит, имеют систему гликозилирования белков, в отличие от клеток бактерий. В биотехнологии для получения рекомбинантных белков уже длительное время используются следующие представители дрожжей: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* и *Schizosaccharomyces pombe*. Из чего следует, что теоретически дрожжевые клетки могут использоваться для синтеза свиного эритропоэтина. Однако характер гликозилирования белков в дрожжах отличается от такового в клетках млекопитающих.

*P. pastoris* – вид метилотрофных дрожжей, который на протяжении десятилетий широко используется для фундаментальных и прикладных исследований. Создан генно-инженерный штамм *P. pastoris*, который обладает способностью осуществлять N-гликозилирование белков, характерное для клеток человека. Первый этап гликозилирования, протекающий в ЭПР, идентичен для клеток дрожжей и человека. На данном этапе белки, которые поступают в АГ, содержат коровий гликан Man8GlcNAc2. У человека эта структура обрезается до Man3GlcNAc2, после чего модифицируется в GlcNAc2Man3GlcNAc2, а затем галактозилируется и сиалируется до Sia2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2. В дрожжевых клетках же Man8GlcNAc2 не обрезается, но далее маннозилируется, что приводит к образованию гликанов более чем с 30 маннозными остатками.

Для преобразования пути гликозилирования была совершена делеция гена *och1*, кодирующего  $\alpha$ -1,6-маннозилтрансферазу, которая осуществляет перенос новых остатков маннозы на интермедиат Man8GlcNAc2. В результате данной операции образуется субстрат для других маннозилтрансфераз. Одновременная делеция генов *och1* и *mnn1* (кодирует  $\alpha$ -1,3-маннозилтрансферазу) позволила группе исследователей получить штамм, в котором синтезируется только гликан. Следующим этапом модификации штамма явилось введение генов гликозидаз и галактозилтрансфераз (MnsI, GnTI, GnTII, SiaT).

В результате данных манипуляций был получен штамм, способный к продукции интермедиата Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2.

Последний этап гликозилирования (перенос сиаловой кислоты) осложнен тем, что этот сахар не синтезируется в дрожжевых клетках. Поэтому в модифицированный штамм *P. pastoris* был перенесен ген фермента, необходимого для биосинтеза сиаловой кислоты, а также ген сиалилтрансферазы.

Использование данного штамма позволило получить N-гликозилированную форму эритропоэтина, где сайты гликозилирования соот-

ветствовали сайтам в естественной молекуле гормона. Также для протекания О-гликозилирования в дрожжи были введены пути присоединения остатков муцина и фукозина [9].

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.

В опытах были использованы дикий тип рекомбинантного ЭПО (WThEPO) и три мутантные формы, в которых сайты гликозилирования были замещены на остатки цистеина (His<sub>10</sub>-WThEPO, His<sub>10</sub>-Asn<sup>24</sup>Cys, His<sub>10</sub>-Asn<sup>38</sup>Cys, His<sub>10</sub>-Asn<sup>83</sup>CyshEPO), данные варианты гормона были экспрессированы в клетках *Escherichia coli* и очищены с выходом 13 мг\*л<sup>-1</sup>. Химическое гликозилирование с гликозил-L-N-иодацетамидом можно выявить при помощи масс-спектрометрии. Побочных реакций с четырьмя другими остатками Cys (которые участвуют в образовании дисульфидных мостиков) не наблюдалось ни в молекуле дикого типа, ни в трех мутантных. Выход гликозилированного белка составил приблизительно 50%, а очистка гликозилированной формы от не гликозилированной была осуществлена с помощью лектин-аффинной хроматографии. Анализ динамического рассеивания света очищенных гликопротеинов подтвердил, что гликопротеин приобретает трехмерную структуру, идентичную ЭПО дикого типа.

Таким образом, ЭПО, экспрессированный в *E. coli* и несущий мутации в естественных сайтах гликозилирования, может быть гликозилирован с помощью гликозил-L-N-иодацетамида даже в присутствии двух дисульфидных связей [24].

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, код доступа – GenBank: AAA31029.1 [16].

#### Штаммы и плазмиды

Использовали штамм *E. coli* XL-1Blue ( $F'$  *proAB lacI<sup>q</sup> lacZAM15* Tn10(Tc<sup>r</sup>)/*recA1 endA1 gyrA96*(Nal<sup>r</sup>) *thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac*), *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL ( $F'$  *ompT hsdS* (r<sub>BMВ</sub>) *dcm*+Tet<sup>r</sup> *gal*  $\lambda$  (DE3) *endA* Hte [*argU proL* Cam<sup>r</sup> ] [*argU ileY leuW* Strep/Spec<sup>r</sup>]) , плазмиду pET-24b(+) (Novagen), плазмиду pAS2. Данные штаммы были взяты из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета БГУ.

#### Ферменты

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

### 2.2 Среды и растворы

#### 1. LB-бульон (Luria-Bertram)

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

Добавляли дистиллированную воду до необходимого объема.

pH довели с помощью NaOH до 6,8.

Стерилизовали путем автоклавирования при 1,5 атм. 30 минут.

#### 2. 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.

#### 3. 1хТАЕ-буфер с этидиум бромидом

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

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

5. Агарозный 1% гель для электрофореза  
Агарозу в концентрации 1 г/л заливали TAE-буфером с этидиумом бромидом до необходимого объема.

6. <u>TE буфер (буфер 1)</u>	
Трис-HCl (1M)	10 мл
EDTA (0,5M)	2 мл
Вода дистиллированная	до 1л
pH приготовленного буфера 8,0.	

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

8. ИПТГ (1 моль/л)  
Для приготовления ИПТГ в концентрации 1 моль/л 283,3 мг ИПТГ заливали деионизированной водой до 1мл.  
Хранили при –20 °С.

9. 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.	



10. х4 буфер для концентрирующего геля (0,5 моль/л Трис)  
Трис-ОН 15,25 г  
SDS 1 г  
Объем доводили до 250 мл с помощью дистиллированной воды.  
Доводили рН до 6,8, хранили при 4 °С.

11. х4 буфер для разделяющего геля (1,5 моль/л Трис)  
Трис-ОН 45,5 г  
SDS 1 г  
Вода дистиллированная до 250 мл  
Объем доводили до 250 мл с помощью дистиллированной воды.  
Доводили рН до 8,8, хранили при 4 °С.

12. Разделяющий гель (16 %-ный) для электрофореза белков  
Акриламид 4 мл  
х4 буфер для разделяющего геля 1,875 мл  
Вода дистиллированная 1,625 мл  
TEMED (tetramethylethylenediamine) 0,005 мл  
Персульфат аммония (10 %-ый) 0,025 мл

13. Концентрирующий гель для электрофореза белков  
Акриламид 325 мкл  
х4 буфер для концентрирующего геля 625 мкл  
Вода дистиллированная 1525 мкл  
TEMED 12,5 мкл  
Персульфат аммония (10 %-ый) 2,5 мкл

14. х10 трис-глициновый буфер для электрофореза белков  
Трис-ОН 30,2 г/л  
Глицин 144 г/л  
Объем доводили до необходимого с помощью дистиллированной воды.  
Хранили при температуре 4 °С.

15. Акриламид (30/0,8%)  
Акриламид 30 г  
Бисакриламид 0,8 г  
Объем доводили до 69,2 мл с помощью дистиллированной воды

16. х1 трис-глициновый буфер для электрофореза белков

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

17. 10 %-ый раствор персульфата аммония  
100мг персульфата аммония растворяли в 1 мл дистиллированной воды.  
Хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

18. Раствор уксусной кислоты (7 %-ый)	
$\text{CH}_3\text{COOH}$ (ледяная)	70 мл
Вода дистиллированная	до 1л
Хранили при комнатной температуре.	

19. Раствор красителя Кумасси для окраски полиакриламидного геля	
$\text{CH}_3\text{COOH}$ (ледяная)	90 мл
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	450 мл
Краситель Кумасси R250	1 г
Вода дистиллированная	до 1л
Хранили при комнатной температуре.	

20. Раствор для отмывания ПААГ от красителя Кумасси	
$\text{CH}_3\text{COOH}$ (ледяная)	70 мл
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	150 мл
Вода дистиллированная	до 1л
Хранили при комнатной температуре.	

21. 0,1 М $\text{CaCl}_2$	
$\text{CaCl}_2$	1,1 г
Дистиллированная вода	до 100 мл
Стерилизовали автоклавированием 30 мин при давлении 1,5 атм. Хранили при $4^{\circ}\text{C}$	

## 2.3 Методы исследования

Были использованы следующие методы:

### 1. Полимеразная цепная реакция

Смесь для ПЦР:

- 1) 10x буфер для амплификации
- 2) 10x смесь нуклеотидов
- 3) Праймеры, 10пм на реакцию (таблица 2.1)

Таблица 2.1 – Использованные пары праймеров.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера, 5'→3'
Forward 1	gaagcgattctgcagggccaggcgctgctggcgaacagcagccagccgagc
Reverse 1	caccgctttatccacatgcagctgcagcgcttcgctcggctggctgctgttc
Forward 2	atggaagtgtggcagggcctggcgctgctgagcgaagcgattctgcagggcc
Reverse 2	gcgagcaggctggcaggctgcgcaggccgctcaccgctttatccacatgcagc
Forward 3	cgtggaaacgaatggaagtgcagcagcaggcgatggaagtgtggcagggcc
Reverse 3	cggaatcgcttctttctgcgctcccagcgcgcgagcaggctggtcag
Forward 4	accgtgccagataccaaagtgaacttttatgcgtggaaacgaatggaagtgc
Reverse 4	cggggtcgcactgctcgggctcgcacccggcagcggaatcgcttctttctgcg
Forward 5	atgggctgtgcggaagctgcagctttagcgaacattaccgtgccagataccaaagtgc
Reverse 5	ttgcgaaacagtttgacagggatatccaccgcaaagggtgcgcagcggggtcgcactgc
Forward 6	ggaacgggtatattctggaagcgaaagaaggcgaaaacgcgaccatgggctgtgcggaag
Reverse 6	ggtatacagggtcagtttgccgcgagaaagtgtctatagttgcgaaacagtttgacagg
Forward 7	cgacatatggccccgcccgcgctgatttgcgatagccgctgctggaacgggtatattctggaagcg
Reverse 7	gtagaattc tcacgatcgcgctgcggcacgcttcgccggtatacagggtcagtttgcc
R_Xho	ttcctcgagctatcgttcgctcgtcggc
R_BamHI	ttcggatccctatcgttcgctcgtcggc

4) pfu-полимераза (для сборки и коррекции гена ЭПО)/Taq-полимераза( для проверки клонов на наличие целевой вставки)1ед на реакцию.

5) Матрица.

Однако первая ПЦР для сборки последовательности гена эритропоэтина протекала безматрично, так как прямой и обратный праймеры имели комплементарный участок.

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

Количество циклов амплификации во всех случаях, кроме первой реакции в случае сборки гена эритропоэтина, составляло 20 циклов. В случае безматричной реакции – 5 циклов.

Таблица 2.2 – Используемые 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						
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 де- леции	2 реакция для устранения де- леции	3 реакция для устранения де- леции	Для проверки транс- форман- тов	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

Количество циклов амплификации составляло 30 циклов.

## 2. Выделение ДНК кипячением

200 мкл ночной культуры осаждали центрифугированием, ресуспензировали в 50 мкл ТЕ-буфера, кипятили 5 мин. Осаждали клетки при 13000 об./мин. Супернатант использовали в качестве матрицы для ПЦР реакции.

## 3. Электрофорез в агарозном геле

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

Расплавленную агарозу заливали в планшет для заливки геля. Для получения в агарозном геле карманов для внесения образцов устанавливали на планшет гребенку, используя зажим. После застывания агарозы осторожно вынимали гребенку из геля и переносили планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза. В карманы геля вносили по 3мкл пробы, предварительно смешанных с 0.05% раствором бромфенолового синего в количестве 2 мкл, и маркер молекулярного веса ДНК (Gene Ruler DNA ladder Mix 10kb, Thermo Scintific) в растворе для нанесения на гель в количестве 2 мкл.

Затем подключали электрофоретическую камеру к источнику питания и задавали напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10—15 В/см геля. Контроль над электрофоретическим разделением осуществляли визуально по движению полосы красителя. Результаты прохождения реакций оценивали с помощью трансиллюминатора.

#### **4. 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.

#### **5. 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.

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

##### Методика 1:

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

##### Методика 2:

1. Центрифугировали 3мл культуры клеток при 8000об/мин в течение 2 минут;
2. Слили супернатант, осадок ресуспендировали в 100мкл TE;
3. Добавили 1 мкл РНКазы А;
4. Прилили 200 мкл лизирующего буфера;
5. Добавили 150 мкл ацетата калия;
6. Центрифугировали 10 минут на 13000 об/мин, после перелили супернатант в новый эппендорф, добавили двойной объем 96% спирта;

7. Центрифугировали 10 минут на 13000 об/мин, затем слили спирт, наслоили 500 мкл 70% спирта;
8. Центрифугировали 5 минут на 13000 об/мин;
9. Слили спирт, просушили осадок;
10. Осадок ресуспендировали в 50 мкл деионизированной воды.

#### **7. Рестрикция плазмидной ДНК и гена эритропоэтина.**

Для рестрикции использовали рестриктазы *EcoR* I, *Nde* I и *BamH* I, а также необходимый для работы рестриктаз серии Fast Digest Green buffer (Thermo-Scientific).

Рестрикционную смесь, согласно инструкции по использованию рестриктаз, выдерживали при температуре 37°C в течение 2 часов на водяной бане в случае рестрикции продуктов ПЦР или в течение 5-10 минут в случае плазмидной ДНК. После проведения рестрикции инактивировали рестриктазы в течение 5 минут при 80°C.

#### **8. Определение концентрации ДНК после рестрикции.**

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

#### **9. 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. В качестве отрицательного контроля использовали ту же реакционную смесь, но вместо вставки добавляли равный объем воды (К-).

Смесь выдерживали на водяной бане 2 часа при 22°C.

#### **10. 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 эпепендорфа разливали содержимое колбы.

5. Центрифугировали 5 минут при 6500 об/мин. Все операции проделывали на хладагенте.

6. Супернатант сливали в стерильных условиях. В культуру клеток добавляли 0,8 мл 0,1М  $\text{CaCl}_2$ , ресуспендировали, выдерживали 15 минут, центрифугировали 5 минут при 6500 об/мин.

7. Сливали стерильно супернатант и доливали 100мкл 0,1М  $\text{CaCl}_2$ , 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 высев 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.

В качестве положительного контроля проводили трансформацию клеток исходной плазмидной ДНК, не подвергавшейся рестрикции и лигированию ( $\text{K}^+$ ).

Для отрицательного контроля использовали  $\text{K}^-$ , полученный в ходе лигирования.

### **11. 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.

### **12. Подготовка проб для белкового электрофореза**

Бактериальные клетки из культуральной жидкости в опытной и контрольной колб после индукции перенесли в соответствующие эппендорфы и осажда-

ли центрифугированием (6500 об/мин, 5 мин), ресуспендировали в х2 загрузочном буфере для белкового электрофореза и кипятили на водяной бане в течение 5 мин. Осколки клеток осаждали центрифугированием 1 мин, 13000 об/мин. Супернатант использовали для белкового электрофореза.

### **13. Электрофорез белков в ПААГ**

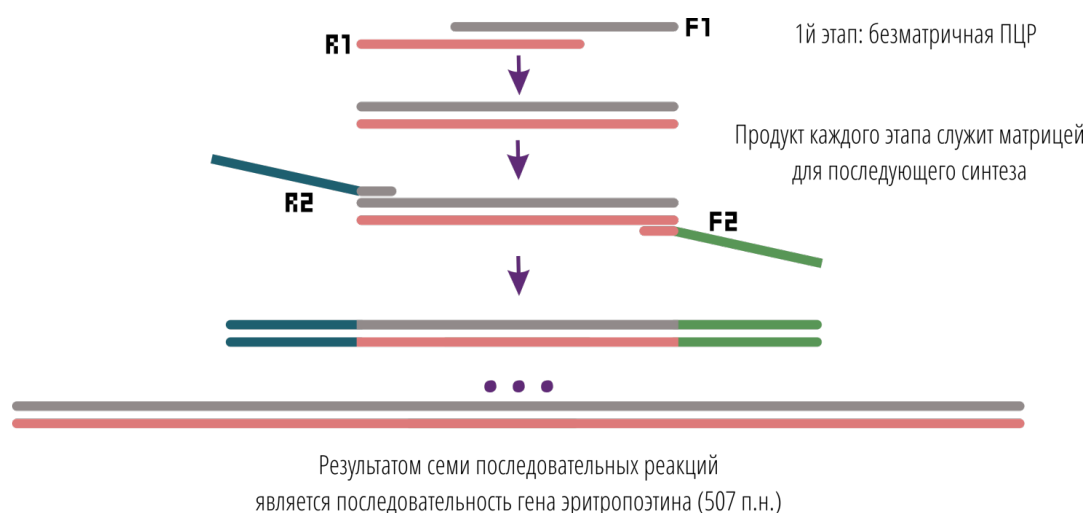
1. Подготовили аппарат для проведения электрофореза.
2. Приготовили разделяющий гель.
3. Залили разделяющий гель.
4. Наслоили бутанол.
5. Выждали 40 мин до застывания геля.
6. Промыли дистиллированной водой 5-7 раз.
7. Приготовили концентрирующий гель.
8. Залили концентрирующий гель.
9. Вставили гребенки 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 mA 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*. Праймеры были разработаны таким образом, что продукт каждой реакции нёс области комплементарности для праймеров следующего этапа. Таким образом, синтез осуществлялся двунаправленно от центра к концам последовательности (рисунок 3.1).



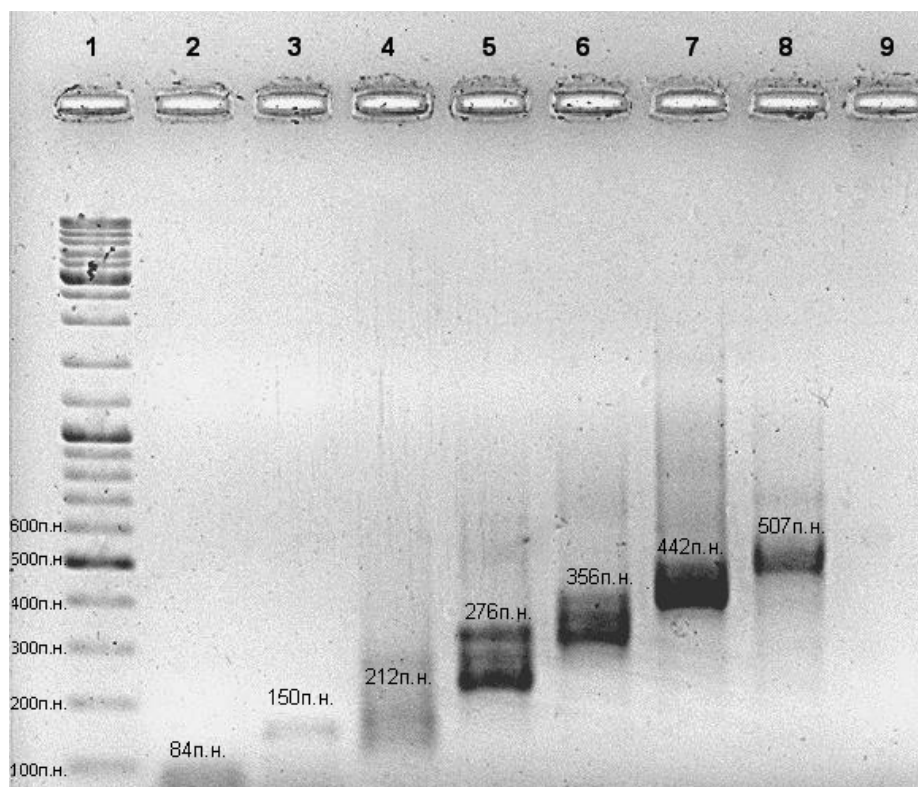
**Рисунок 3.1– Модель сборки гена эритропоэтина свиньи методом ПЦР**

Синтез гена осуществлялся в семь этапов с соответствующими парами праймеров (таблица 3.1), с увеличением продукта на каждом этапе на 62 – 74 п.н.

**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

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



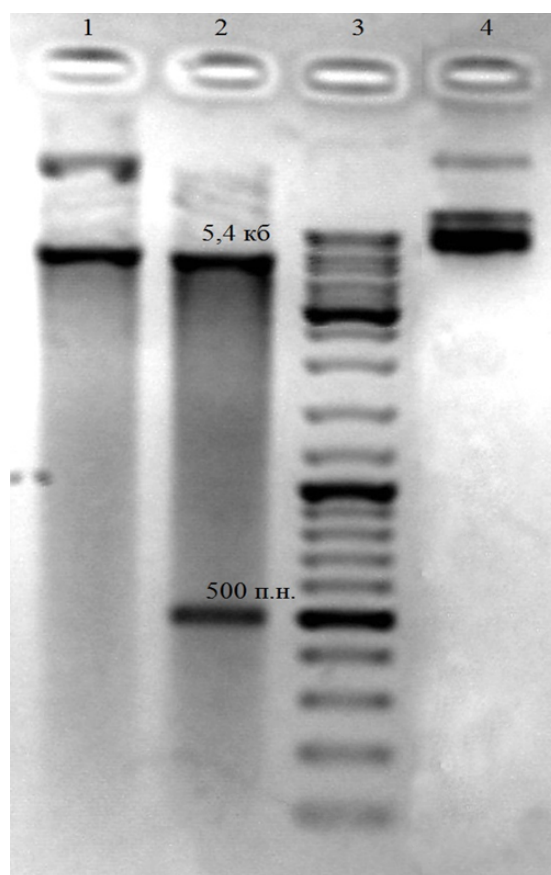
**Рисунок 3.2– Процесс сборки гена эритропоэтина**

- 1 – маркер молекулярного веса;  
 2-8 – продукты последовательных ПЦР;  
 9 – отрицательный контроль

Реакционные смеси после стадий 1,2,5 и 6 непосредственно использовались в последующих реакциях как носители матриц. В реакциях 3 и 4, помимо целевого, накапливались неспецифические продукты. Поэтому, чтобы избежать образования нежелательных продуктов в последующих реакциях, полоса, соответствующая целевому продукту, вырезалась из геля, ДНК очищалась по соответствующей методике и только затем использовалась в качестве матрицы.

В результате последовательных ПЦР была получена последовательность, соответствующая по длине гену эритропоэтина свиньи, фланкированная сайтами рестрикции для рестриктаз *Nde* I и *Eco*R I.

Последовательность, полученная в результате последней ПЦР, была очищена из реакционной смеси, подвергнута рестрикции по концевым сайтам для *Nde* I и *EcoR* I, лигирована по данным сайтам с вектором рЕТ-24b, после чего полученной конструкцией трансформировали клетки *E. coli* XL-1 Blue. Полученные в результате трансформации клоны проверяли на наличие вставки путем рестрикции выделенных из клонов плазмид по сайтам *Nde* I и *EcoR* I. На рисунке 3.3 представлена электрофореграмма продуктов рестрикции плазмид, выделенных из клонов № 1 и 5.



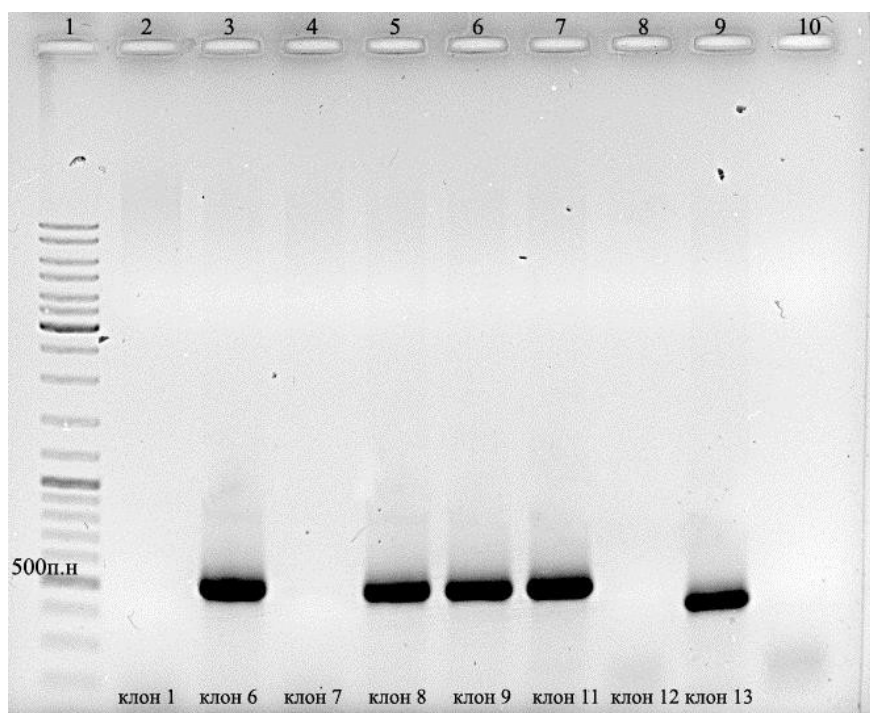
**Рисунок 3.3 – Электрофорез для подтверждения успешности трансформации**

- 1 – клон 1;
- 2 – клон 5;
- 3 – маркер молекулярного веса;
- 4 – рЕТ-24b (не подвергалась рестрикции)

На дорожке 2 (клон №5) помимо полосы, соответствующей по размеру рЕТ-24b, присутствует продукт, соответствующий ожидаемому для гена

эритропоэтина (507 п.н.), что свидетельствует о том, что данный клон несёт целевую вставку.

Используя метод ПЦР и рестрикционный анализ, проверили другие имеющиеся клоны *E.coli* XL1-Blue на наличие последовательности гена эритропоэтина свиньи. Результаты ПЦР визуализировали путем проведения электрофореза в агарозном геле.



**Рисунок 3.4 – Продукты ПЦР с праймерами FR7**

- 1 – маркер молекулярного веса;
- 2-9 – ДНК из клонов *E. coli* XL-1 Blue;
- 10 – отрицательный контроль ПЦР

Из электрофореграммы следует, что необходимая вставка имеется в клон-нах 6, 8, 9, 11 и 13.

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

Следующим этапом работы являлось выделение плазмиды рЕТ-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. Результаты визуализировали путем проведения белкового электрофореза в полиакриламидном геле. Результаты электрофореза свидетельствуют о том, что данным методом экспрессию белка эритропоэтина свиньи в исследованных кло-нах детектировать не удалось.

Так как экспрессия не была детектирована, плазмидная ДНК из имеющих-ся клонов была отправлена на секвенирование.

После получения результатов секвенирования провели выравнивание по-следовательностей желаемой ДНК и ДНК из полученных клонов (рисунок 3.5) [27].

epo	1	-----gccccaccacgcctgatttgcgatagccgcgtgctg	36
		.   .	
seq3	1	GAGATATACATATGCCCCGCCGCGCTGATTTGCGATAGCCGCGTGCTG	50
epo	37	gaacgggtatattctggaagcgaagaaggcgaacgcgaccatgggctg	86
seq3	51	GAACGGTATATTCTGGAAGCGAAAAGGCGAAAACGCGACCATGGGCTG	100
epo	87	tgcggaaagctgcagcttttagcgaacattaccgtgccagataccaaag	136
seq3	101	TGCGGAAAGCTGCAGCTTTAGCGAAAACATTACCGTGCCAGATACCAAAG	150
epo	137	tgaactttttatgctggaaacgaatggaagtgcagcagcaggcgatggaa	186
seq3	151	TGAACTTTTATGCGTGGAAACGAATGGAAGTGCAGCAGCAGGCGATGGAA	200
epo	187	gtgtggcagggcctggcgtgctgagcgaagcgattctgcagggccaggc	236
seq3	201	GTGTGGCAGGGCTGGCGCTGCT-----	223
epo	237	gctgctggcgaacagcagccagccgagcgaagcgtgcagctgcatgtgg	286
seq3	224	-----GAGCGAAGCGCTGCAGCTGCATGTGG	249
epo	287	ataaagcggtagcggcctgcccagcctgaccagcctgctgcgcgcgctg	336
seq3	250	ATAAAGCGGTGAGCGGCCTGCGCAGCCTGACCAGCCTGCTGCGCGCGCTG	299
epo	337	ggagcgcagaaagaagcgattccgctgccggatgcgagcccgagcagtg	386
seq3	300	GGAGCGCAGAAAGAAGCGATTCCGCTGCCGGATGCGAGCCCGAGCAGTGC	349
epo	387	gaccccgctgcgcacctttgcggtggataccctgtgcaaaactgtttcgca	436
seq3	350	GACCCCGCTGCGCACCTTTGCGGTGGATACCTGTGCAAACTGTTTCGCA	399
epo	437	actatagcaactttctgcgcggcaaaactgacctgtataccggcgaagcg	486
seq3	400	ACTATAGCAACTTTCTGCGCGGCAAACTGACCTGTATACCGGCGAAGCG	449
epo	487	tgccgacgacgcaacgat-ag--	507
		.   .	
seq3	450	TGCCGACGACGCGATCGATGAATAA	473

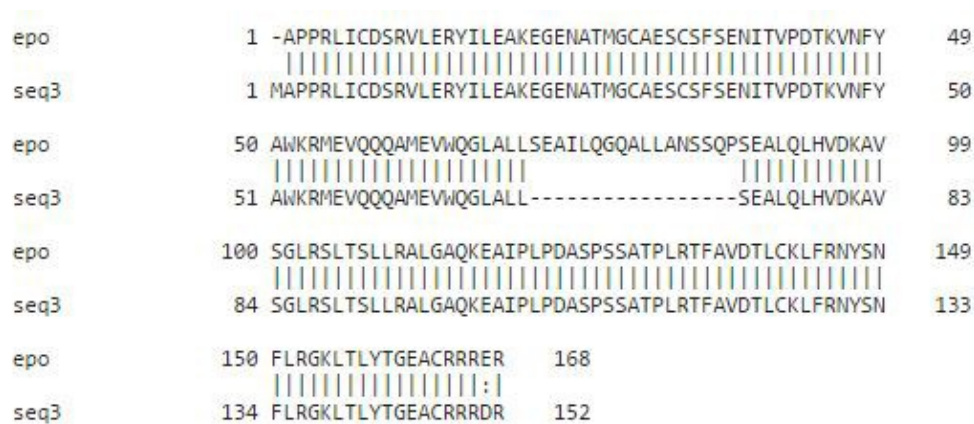
Рисунок 3.5 – Выравнивание последовательностей гена ЭПО и ДНК из клона 9

еро – нуклеотидная последовательность гена ЭПО;

seq3 – нуклеотидная последовательность клона 3, полученная после секвенирования;  
 квадратными скобками выделены стоп-кодоны

На основании результатов секвенирования было установлено, что в полученной последовательности присутствует делеция размером в 51 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 3.6) [27].



**Рисунок 3.6 – Выравнивание белковых последовательностей гена эритропоэтина и последовательности, соответствующей клону 9**

Из рисунка 3.7 следует, что 2 из нуклеотидных замен не привели к замене аминокислот в последовательности эритропоэтина. В третьем же случае произошла замена глутамата (E) на аспартат (D). Данные аминокислоты схожи по своим свойствам, что позволяет предполагать, что данная замена не оказывает существенного влияния на активность белка.

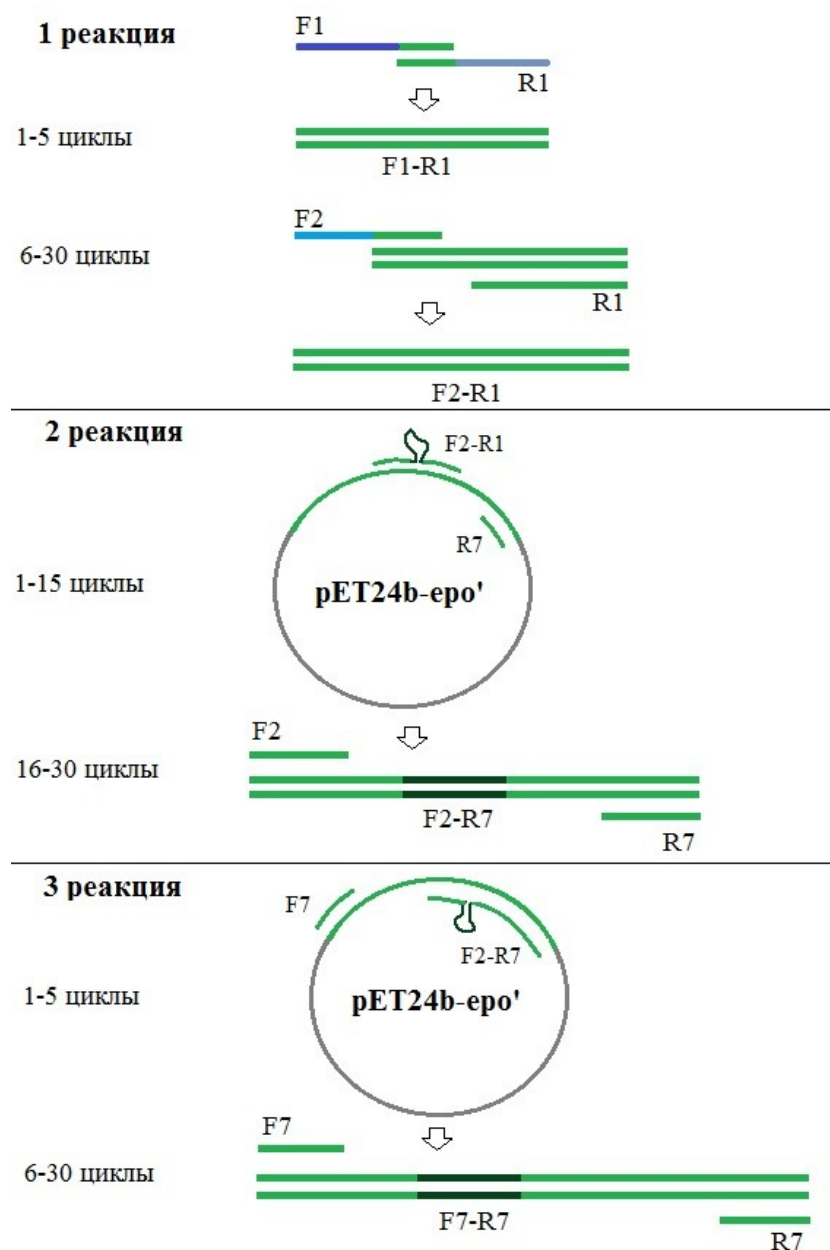
Инсерция одного нуклеотида после T502 не привела к удлинению полипептидной цепи, произошла лишь замена стоп-кодона: UAG → UGA (рисунок 3.5)

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 3.7).



В ходе первой реакции использовались праймеры Forward 1 и Reverse 1, а также Forward 2 (добавляли в реакционную смесь после 5 циклов ПЦР). Реакция протекала безматрично, так как данные праймеры имеют комплементарный участок. Продукт реакции – фрагмент Forward 2-Reverse 1, состоящий из 117 п.н. и имеющий области перекрывания с геном эритропоэтина в составе плазмиды pET24b-epo', содержащей укороченный вариант гена эритропоэтина.

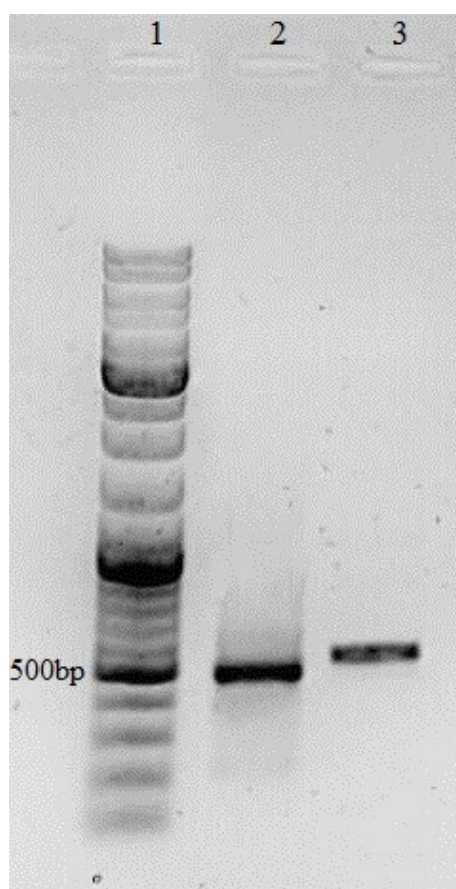


**Рисунок 3.7 – Схема реакций для устранения делеции в гене эритропоэтина**

После выделения фрагмента Forward 2-Reverse 1 из агарозного геля и его очистки по соответствующей методике, нами была проведена вторая реакция ПЦР, где в качестве матрицы выступала плазмида, содержащая укороченный ва-

риант последовательности гена эритропоэтина. В качестве праймеров использовался полученный на предыдущем этапе фрагмент Forward 2-Reverse 1 и Reverse 7. Кроме того, для увеличения выхода целевого продукта после 15 цикла ПЦР мы вносили в реакционную смесь праймер Forward 2. Продуктом данной реакции явился фрагмент Forward 2-Reverse 7 размером 281 п.н.

В ходе третьей реакции ПЦР в качестве матрицы также использовалась плаزمида, содержащая укороченный вариант последовательности гена эритропоэтина. В качестве праймеров использовали Forward 2-Reverse 7, Forward 7, а также Reverse 7 (который вносили в реакционную смесь после пятого цикла ПЦР). Таким образом нами был получен полноразмерный вариант гена эритропоэтина ( 507 п.н) (рисунок 3.8).



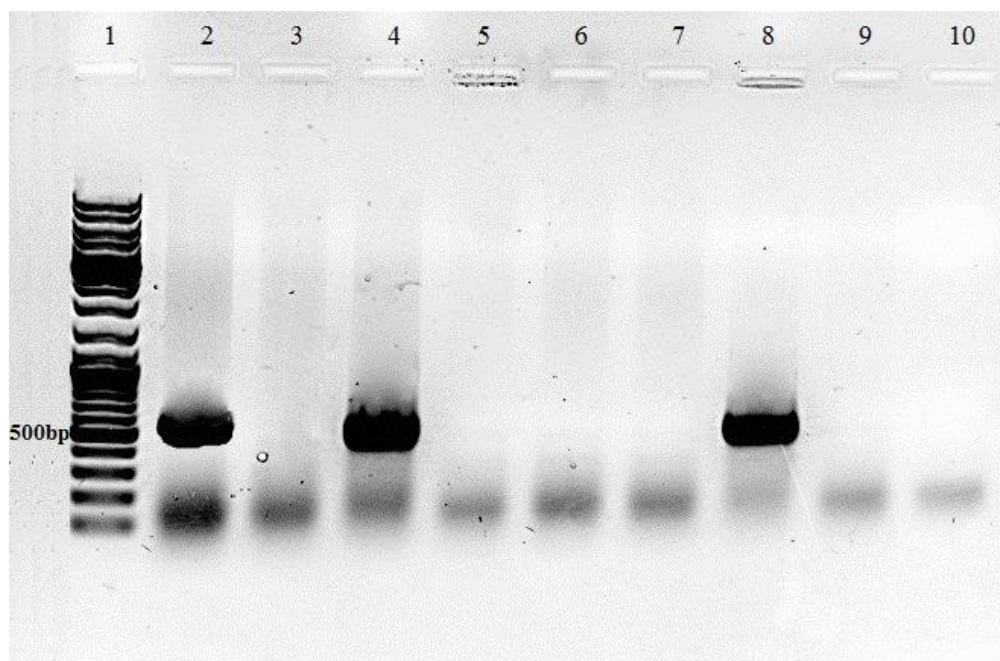
**Рисунок 3.8 – Сравнение полноразмерной и дефектной последовательности гена эритропоэтина**

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



Из электрофореграммы, представленной на рисунке 3.8, следует, что с помощью метода ПЦР нам удалось устранить делецию в середине гена эритропоэтина.

Далее исправленный вариант последовательности по сайтам *Nde* I и *EcoR* I 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 3.9).



**Рисунок 3.9 – Проверка клонов после трансформации на наличие последовательности ЭПО**

1—маркер молекулярного веса

2-9 – клоны 9-16

10— отрицательный контроль ПЦР

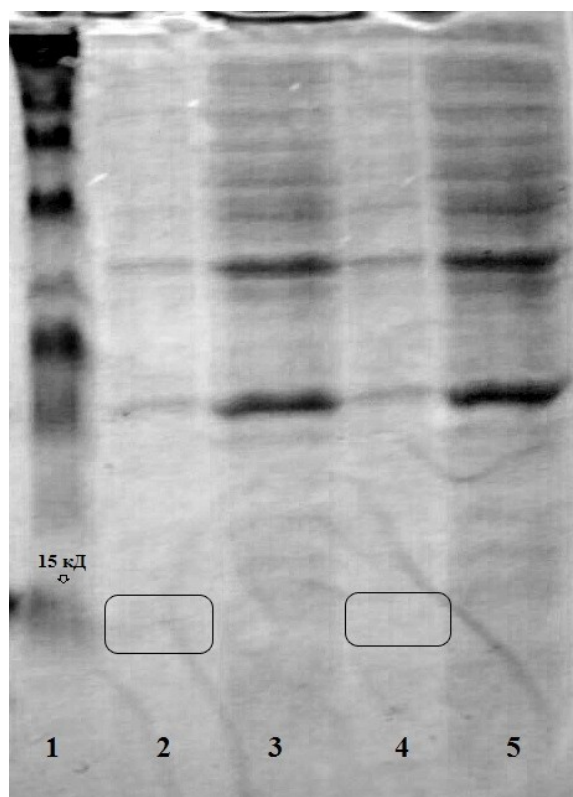
Таким образом было выявлено, что в трех из полученных трансформантов (клон 9, клон 11 и клон 15) присутствует целевая последовательность.

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 визуализиро-

вали путем проведения белкового электрофореза в полиакриламидном геле. По результатам электрофореза было установлено, что экспрессия белка эритропоэтина свиньи в исследованных клонах не детектируется (рисунок 3.10).



**Рисунок 3.10 – Белковый электрофорез послу индукции экспрессии**

- 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

Результаты секвенирования показали, что клон 11 содержит полноразмерную последовательность гена эритропоэтина (рисунок 3.11) [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 (Forward 7 и Reverse7).

```

epo_assembl      1 atggcccgcgcgcctgatttgcgatagcgcgtgctggaacggtatat 50
                  |||||..|||
epo_ref          1 ---gccccacccgcctgatttgcgatagcgcgtgctggaacggtatat 47

epo_assembl      51 tctggaagcgaaagaaggcgaaaacgcgaccatgggctgtgcggaagct 100
                  |||||
epo_ref          48 tctggaagcgaaagaaggcgaaaacgcgaccatgggctgtgcggaagct 97

epo_assembl      101 gcagcttttagcgaaaacattaccgtgccagataccaaagtgaacttttat 150
                  |||||
epo_ref          98 gcagcttttagcgaaaacattaccgtgccagataccaaagtgaacttttat 147

epo_assembl      151 gcgtggaacgaaatggaagtgcagcagcaggcgatggaagtgtggcaggg 200
                  |||||
epo_ref          148 gcgtggaacgaaatggaagtgcagcagcaggcgatggaagtgtggcaggg 197

epo_assembl      201 cctggcgctgctgagcgaaagcgatttctgcagggccaggcgctgtggcga 250
                  |||||
epo_ref          198 cctggcgctgctgagcgaaagcgatttctgcagggccaggcgctgtggcga 247

epo_assembl      251 acagcagccagccgagcgaaagcgctgcagctgcatgttgataaagcgggtg 300
                  |||||
epo_ref          248 acagcagccagccgagcgaaagcgctgcagctgcatgttgataaagcgggtg 297

epo_assembl      301 agcggcctgcgcgagcctgaccagcctgtgcgcgctgggagcgagaa 350
                  |||||
epo_ref          298 agcggcctgcgcgagcctgaccagcctgtgcgcgctgggagcgagaa 347

epo_assembl      351 agaagcgattccgctgccggatgcgagcccgagcagtgcgaccccgctgc 400
                  |||||
epo_ref          348 agaagcgattccgctgccggatgcgagcccgagcagtgcgaccccgctgc 397

epo_assembl      401 gcacctttgcggtggataccctgtgcaaactgtttcgcaactatagcaac 450
                  |||||
epo_ref          398 gcacctttgcggtggataccctgtgcaaactgtttcgcaactatagcaac 447

epo_assembl      451 tttctgcgcggcaaaactgaccctgtataccggcgaaagcgtgccgacgacg 500
                  |||||
epo_ref          448 tttctgcgcggcaaaactgaccctgtataccggcgaaagcgtgccgacgacg 497

epo_assembl      501 cgatcgatgag 511
                  |||..|||
epo_ref          498 cgaccgat-ag 507

```

**Рисунок 3.11 – Выравнивание последовательностей гена ЭПО и ДНК из клона 11**

epo\_ref – нуклеотидная последовательность гена ЭПО;

epo\_assembl – нуклеотидная последовательность клона 11, полученная после секвенирования

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 (рисунок 3.12) [27].

epo	1	-APPRLICDSRVLEERYILEAKEGENATMGCAESCSFSENITVPDTKVNFY	49
prot2	1	MAPPRLICDSRVLEERYILEAKEGENATMGCAESCSFSENITVPDTKVNFY	50
epo	50	AWKRMEVQQQAMEVWQGLALLSEAILQGQALLANSSQPSEALQLHVDKAV	99
prot2	51	AWKRMEVQQQAMEVWQGLALLSEAILQGQALLANSSQPSEALQLHVDKAV	100
epo	100	SGLRSLTSLLRALGAQKEAIPDASPSSATPLRTFAVDTLCKLFRNYSN	149
prot2	101	SGLRSLTSLLRALGAQKEAIPDASPSSATPLRTFAVDTLCKLFRNYSN	150
epo	150	FLRGKLTLYTGEACRRRER*	169
prot2	151	FLRGKLTLYTGEACRRRDR-	169

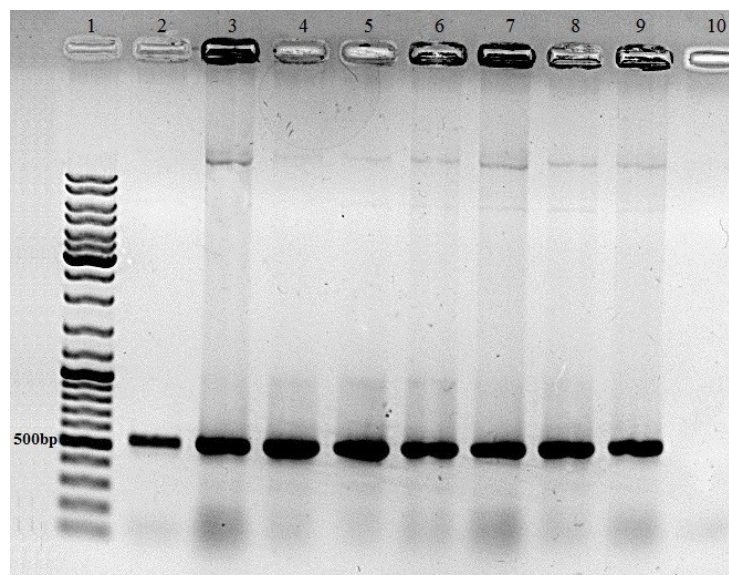
**Рисунок 3.12– Выравнивание белковых последовательностей гена эритропоэтина (epo) и последовательности, соответствующей клону 11 (prot2)**

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 *EcoR* I был заменен на сайт для рестриктазы *BamH* I. 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 *Nde* I и *BamH* I 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].

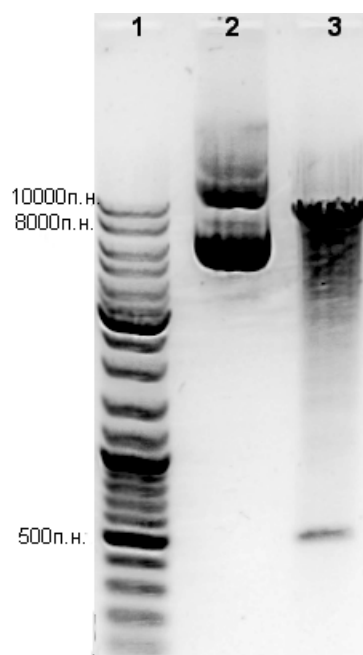
Методами ПЦР и рестрикционного анализа было подтверждено, что все отобранные трансформанты содержат необходимую вставку (рисунок 3.13, рисунок 3.14).

Из электрофореграмм, представленных на рисунках 3.13 и 3.14 следует, что в ходе работы нам удалось получить штаммы *E. coli* XL-1-pAS2epo, которые несут генетическую конструкцию pAS2-epo.



**Рисунок 3.13 – Проверка клонов *E. coli* XL-1-pAS2еро после трансформации**

- 1- маркер молекулярного веса
- 2-9 – клоны от 1 до 8 соответственно
- 10 – отрицательный контроль ПЦР



**Рисунок 3.14 – Рестрикционный анализ клона 1 *E. coli* XL-1-pAS2еро после трансформации**

- 1 – DNA Ladder Mix
- 2 - pAS2

3 - рAS2-еро, выделенная из клона 1

## ВЫВОДЫ

1. Была синтезирована модифицированная кодирующая последовательность гена эритропоэтина свиней методом ПЦР.
2. На основе бактериального вектора pET24b получены рекомбинантные конструкции pET24b-epo и pET24b-epo' несущие, соответственно, полную и усечённую кодирующие последовательности гена эритропоэтина свиней.
3. 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.
4. 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.
5. На основе челночного вектора pAS2 получена рекомбинантная конструкция pAS2-epo, предназначенная для экспрессии гена свиного эритропоэтина в клетках *S. cerevisiae*.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Вайс, Х. Функции крови / Х. Вайс, В. Елькманн // Физиология человека. В трех томах: учеб. пособие / Р. Шмидт, Г. Тевс. – 3-е изд., испр. и доп. – М., 2005. – Гл.18. – С. 422-426.
2. Достижения и перспективы использования рекомбинантных цитокинов в клинической практике /А. С. Симбирцев // Медицинский академический журнал. – 2013. – №1. – С. 7-22.
3. Зайцева, А. В. Определение эффективного иммуномодулятора для конструирования комплексного препарата для поросят / А. В. Зайцева, Г. Э. Дремач, Р. Б. Корочкин // Повышение интенсивности и конкурентоспособности отраслей животноводства: материалы XVIII междунар. науч.-практ. конф., Жодино, 14-15 сентября 2011г.: в 2 ч. / РУП "Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству"; редкол.: М. В. Джумкова. – Борисов, 2011. – Ч.2. – С. 213-215.
4. Карнаух, Э. В. Эритропоэтин – концепция «неуловимого» допинга / Э. В. Карнаух, С. А. Попенко // Научная дискуссия: Инновации в современном мире: сборник статей по материалам XXXI междунар. заочной науч.-практ. конф., Москва, 18 ноября 2014 г./ издательство Интернаука; редкол.: М. А . Васинович. – М., 2014. – С. 150–155.
5. Колковская, Е. В. Создание генетических конструкций для получения эритропоэтина свиней в клетках *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae* / Е. В. Колковская, С. Г. Голенченко, В. А. Прокулевич // Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии: материалы III междунар. конф. молодых ученых, Гродно, 11-12 мая 2017 г. / НАН Беларуси; редкол.: Л. И. Надольник [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 163-165.
6. Ноздрачев, А. Д. Кроветворение и его регуляция / А. Д. Ноздрачев // Начала физиологии: учеб. пособие / А. Д. Ноздрачев, Ю. К. Баженов, И. А. Баранникова; под ред. А. Д. Ноздрачева . – Спб., 2002. – Гл. 7.8. – С. 621-622.
7. Основные проблемы и пути развития животноводства / И. П. Шейко [и др.] // Весці НАН Беларусі: Серыя аграрных навук. – 2006. – №1. – С. 70-72.
8. Способ профилактики и лечения алиментарной анемии и профилактики гипопластической анемии у поросят: пат. 2429863 РФ / МПК А61К 35/20, А61К 33/26 / А. В. Савинков, В. А. Антипов, К. М. Садов и др.; заявитель ГНУ Самарская НИВС. – заявл. №2010130859/15; 22.07.2010; опубл. 27.09.2011 // Офиц. бюл. / Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. – 2011. – № 27.
9. Эльдаров, М. А. Дрожжи как фабрика для получения лекарств / М. А. Эльдаров, Н. В. Равин // Центр «Биоинженерия» РАН [Электронный ресурс]. –



2010. – Режим доступа: <http://www.biengi.ac.ru/molclon.html>. – Дата доступа: 26.03.2015.

10. Activation and Inhibition of Erythropoietin Receptor Function: Role of Receptor Dimerization / S. S. Watowich [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 1994. – Vol. 14, № 6. – P. 3535-3549

11. Bazan, J. F. Haemopoietic receptors and helical cytokines / J. F. Bazan // *Immunology today*. – 1990. – Vol. 11, №10. – P. 350-354.

12. Bunn, H. F. Erythropoietin / H. F. Bunn // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2013. – Vol. 3. – P. 1-20.

13. Commercial production of recombinant erythropoietins / A. S. Chuck [et al.] // *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis: Molecular, Cellular, Preclinical, and Clinical Biology: collection of scientific articles* / Birkhäuser; edited by S. G. Elliott [et al.]. – Basel, 2009. – P. 87-104.

14. Developmental biology of erythropoiesis / J. Palis [et al.] // *Blood Reviews*. – 1998. – Vol. 12. – P. 106-114.

15. Erythropoietin / R. H. Wenger [et al.] // *Comprehensive Physiology*. – 2011. – Vol. 1. – P. 1759-1794.

16. Erythropoietin, partial [*Sus scrofa*] // National Center for Biotechnology Information [Electronic resource]. – 2009. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/164446> – Date of access: 04.03.2015.

17. Erythropoietin Structure-Function Relationships. Identification of functionally important domains / D. Wen [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269, № 36. – P. 22839-22846.

18. Erythropoietin Structure-Function Relationships: High Degree of Sequence Homology Among Mammals / D. Wen [et al.] // *Blood*. – 1993. – Vol. 82. – P. 1507-1516.

19. Glycosylation at Specific Sites of Erythropoietin Is Essential for Biosynthesis, Secretion, and Biological Function / S. Dube [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 263, № 33. – P. 17516-17521.

20. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin / K. Jacobs [et al.] // *Nature*. – 1985. – Vol. 313. – P. 806–810.

21. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation / J. C. Cheetham [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 5. – P. 861 – 866.

22. 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*. – 2002. – Vol. 131. – P. 527–533.

23. Responses of plasma Epo and kidney and liver Epo mRNA to hemorrhage in perinatal pigs / R. B. David [et al.] // *Domestic Animal Endocrinology*. – 2002. – Vol. 23. – P. 507-516.

24. Selective in vitro glycosylation of recombinant proteins: semi-synthesis of novel homogeneous glycoforms of human erythropoietin / D. Macmillan [et al.] // *Chemistry & Biology*. – 2001. – Vol. 8. – P. 133-145.
25. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage / C. T. Noguchi [et al.] // *Expert Reviews in Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 10. – e36.
26. Targeted erythropoietin selectively stimulates red blood cell expansion in vivo / D. R. Burrill // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2016. – Vol. 113, №19. – P. 5245–5250.
27. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework / Li Weizhong [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43. – P. 580-584.
28. The porcine erythropoietin gene: cDNA sequence, genomic sequence and expression analyses in piglets / R. B. David [et al.] // *Domestic Animal Endocrinology*. – 2001. – Vol.20. – P. 137–147.
29. The Role of Erythropoietin as an Inhibitor of Tissue Ischemia / N. Paschos [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2008. - №4. – P. 161-165.

## ПУБЛИКАЦИИ

1. Колковская, Е. В. Создание генетических конструкций для получения эритропоэтина свиней в клетках *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae* / Е. В. Колковская, С. Г. Голенченко, В. А. Прокулевич // Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии: материалы III междунар. конф. молодых ученых, Гродно, 11-12 мая 2017 г. / НАН Беларуси; редкол.: Л. И. Надольник [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 163-165.

2. Колковская, Е. В. Создание конструкции для экспрессии белка эритропоэтина в клетках дрожжей / Е. В. Колковская, С. Г. Голенченко, В. А. Прокулевич // Биология наука 21 века: материалы 21 междунар. Пущинской школы-конф. молодых ученых, Пущино, 17-21 апреля 2017 г. – ФГБУН Пущинский научный центр РАН. – Пущино, 2017. – С. 168.