

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

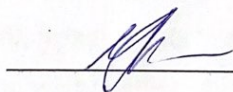
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ БИНАЗЫ

Обучающийся 2 курса
группы 01-140-2



А.С. Коснырев

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



В.В. Ульянова

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Структура, свойства и биологические эффекты биназы	7
1.2 Влияние мутаций на структуру и свойства биназы	9
1.3 Прокариотические системы гетерологичной экспрессии белка.....	13
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	19
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	19
2.1 Плазмиды, бактериальные штаммы и условия культивирования	19
2.2 Трансформация <i>E. coli</i> методом теплового шока.....	20
2.3 Трансформация бацилл методом Спицайзена.....	21
2.4 Выделение плазмидной ДНК	21
2.5 Электрофорез ДНК.....	23
2.6 Рестрикция ДНК	24
2.7 Лигирование ДНК.....	24
2.8 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	24
2.9 Секвенирование	27
2.10 Индукция экспрессии гена биназы в <i>E. coli</i> BL21 λ DE3	27
2.11 Электрофорез белков в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ).....	28
2.12 Вестерн-блот	29
2.13 Электрофорез белков в нативных условиях	30
2.14 Получение клеточных лизатов <i>E. coli</i> BL21 λ DE3	30
2.15 Приготовление телец включения.....	31
2.16 Ренатурация биназы из телец включения	32
2.17 Получение периплазматической фракции <i>E. coli</i>	32
2.18 Индукция экспрессии биназы и барстара в <i>B. subtilis</i>	32
2.19 Ионообменная хроматография.....	33
2.20 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).....	34

2.21	Определение рибонуклеазной активности.....	34
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	36
3.1	Внесение мутаций в ген биназы.....	36
3.2	Получение генетических конструкций для экспрессии мутантной биназы в клетках <i>E. coli</i> и <i>B. subtilis</i>	38
3.3	Экспрессия мутантной биназы в <i>E. coli</i> BL21 λ DE3	42
3.4	Экспрессия мутантной биназы в <i>B. subtilis</i> BRB08.....	47
	ВЫВОДЫ	51
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	52

ВВЕДЕНИЕ

Секретируемые рибонуклеазы (РНказы) бацилл являются привлекательным объектом прикладных исследований. Для них характерны дозозависимая стимуляция или подавление роста клеток бактерий и дрожжей [Кипенская, 1998; Колпаков, 1993], избирательная цитотоксичность по отношению к *ras*-, *kit*- и AML1-ETO-трансформированным опухолевым клеточным линиям [Cabrera-Fuentes *et al.*, 2013; Ilinskaya *et al.*, 2008; Mitkevich *et al.*, 2011], противовирусная активность [Ильинская и Шах Махмуд, 2013; Shah Mahmud *et al.*, 2018], невосприимчивость к действию эукариотических ингибиторов рибонуклеаз. Данные свойства РНказ представляют интерес ввиду возможности использования в медицине.

Несмотря на то, что биологические свойства РНказ изучены достаточно хорошо, непосредственные молекулярные механизмы, лежащие в их основе, требуют дальнейших углубленных исследований ввиду своей неоднозначности. Так, было показано значение ярко выраженного положительного заряда РНказ [Ilinskaya *et al.*, 2004], взаимодействие с рядом ключевых для функционирования опухолевой клетки белков [Ilinskaya *et al.*, 2008; Ilinskaya *et al.*, 2016], а также участие в воспалительном ответе [Makeeva *et al.*, 2017]. Однако вклад каталитической активности РНказ в их биологические свойства является дискуссионным вопросом [Кипенская, 1998; Rosenberg, 1995], ответ на который может быть получен с использованием мутантных форм изучаемого белка.

Исследование физико-химических, структурных и биологических свойств того или иного белка предполагает его выделение в гомогенном состоянии в препаративных количествах, а вещества, предназначенные для дальнейшего терапевтического использования, дополнительно требуют отсутствия токсинов и иных потенциально опасных для человека побочных продуктов. Соответственно, первоочередной задачей должен быть выбор системы экспрессии целевого продукта. Бактериальные системы

гетерологичной экспрессии белков являются наиболее распространёнными ввиду глубокой изученности геномов продуцентов и их метаболизма, разнообразия штаммов и стратегий генетической модификации, простоты в обращении, дешевизны питательных сред. Бактерии *Escherichia coli* характеризуются всеми вышеперечисленными преимуществами, однако имеют и такие ограничения, как непродуктивность систем секреции, выражающаяся в перегрузке и некорректной работе её компонентов, выделение токсинов и ограниченные возможности фолдинга и посттрансляционных модификаций белка. Бактери рода *Bacillus* обладают более развитой системой секреции и сопровождения белка. Такие виды как *B. subtilis* и *B. licheniformis* считаются безопасными для человека, так как не имеют токсинов и широко используются в научно-исследовательской и биотехнологической практике

Целью данной работы стал сравнительный анализ систем экспрессии на основе *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* для выделения и очистки каталитически неактивной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы). В соответствии с поставленной целью решали следующие экспериментальные задачи:

- 1) Получить генетическую кассету для гетерологичной экспрессии биназы и внести мутацию в её ген;
- 2) Сконструировать плазмиды для экспрессии мутантной биназы в клетках *E. coli* и *B. subtilis*;
- 3) Оценить особенности экспрессии мутантной биназы в клетках *E. coli* BL21 λ DE3;
- 4) Оценить особенности экспрессии мутантной биназы в клетках *B. subtilis* BRB08.

ВЫВОДЫ

- 1) На основе вектора pAL2-T была получена генетическая конструкция, содержащая полные гены биназы и ее ингибитора барстара, в которой методом сайт-направленного мутагенеза в ген биназы была внесена мутация H101E.
- 2) Были сконструированы плазмиды pET15b-BinH101E и pET26b-BinH101E, позволяющие, соответственно, осуществлять индуцируемую цитоплазматическую и периплазматическую экспрессию мутантной биназы в *E. coli* BL21 λ DE3, а также плазида pGP380-BinH101E для экспрессии мутантной биназы в клетках *B. subtilis* BRB08 с последующей секрецией целевого белка в культуральную жидкость.
- 3) Было установлено, что экспрессия мутантной биназы в *E. coli* не позволяет получить рекомбинантный белок в нативной форме в препаративных количествах независимо от его локализации, условий индукции и способа разрушения клеток.
- 4) Было показано, что экспрессия на основе *B. subtilis* позволяет получить гомогенный препарат мутантной биназы с ненарушенной структурой белка.