

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Специальность: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**Система экспрессии гуанилпредпочитающих
рибонуклеаз, несущих гистидиновую метку**

Работа завершена:

" 1 " июня 2017 г.  (А.И. Салимова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

с.н.с., к.б.н.

" 1 " июня 2017 г.  (В. В. Ульянова)

Заведующий кафедрой

Профессор, д.б.н.

" 7 " июня 2017 г.  (О.Н. Ильинская)

Казань – 2017

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим семейством ферментов нуклеинового обмена являются рибонуклеазы. Большой интерес к ним обусловлен исключительной важностью их субстратов, играющих ключевую роль в процессах воспроизведения и реализации генетической информации. Клетки используют множество функционально разнообразных рибонуклеаз, осуществляющих созревание и расщепление РНК. В настоящее время особое внимание уделяется биологическим эффектам рибонуклеаз, таким, как контроль роста кровеносных сосудов, токсичность по отношению к опухолевым клеткам, противовирусная активность. Показано, что цитотоксическим действием по отношению к опухолевым клеткам обладают РНКазы млекопитающих, земноводных, грибов, бактерий [Sevcik *et al.*, 2002, Saxena *et al.*, 2003]. Особое внимание уделяется микробным РНКазам ввиду их селективного цитотоксического действия на раковые клетки, а также нечувствительности к ингибитору РНКаз млекопитающих. Современные представления о роли и функциях микробных РНКаз позволяют рассматривать их как перспективные объекты для создания новых противоопухолевых препаратов, альтернативных традиционным химиотерапевтическим средствам, в шадящей терапии злокачественных новообразований [Olmo *et al.*, 2001, Sevcik *et al.*, 2002, Ильинская с соавт., 2005]. Следует отметить, что для применения рибонуклеаз в качестве терапевтических противовирусных и противоопухолевых лекарственных средств, необходимы гомогенные белки, обладающие высокой специфичностью и эффективностью.

В течение многих десятилетий бактерий использовали для создания множества первичных и вторичных продуктов на благо человечества. С появлением генной инженерии, на рынок вышли рекомбинантные белки, которые радикально изменили сценарий развития фармацевтической промышленности [Demain, 2004]. Важным моментом в получении

рекомбинантных белков является выбор системы экспрессии, которых в настоящее время достаточно много. В качестве таких систем могут быть использованы клеточные культуры бактерий, дрожжей, грибов или трансгенные растения и животные. Наиболее важными факторами при выборе системы экспрессии рекомбинантных белков являются: функциональность таких систем, скорость воспроизводства, выход продукта [Demain, Vaishnav, 2009]. Кроме того, для получения большого количества белка важно, чтобы ген находился под экспрессией удачно подобранного промотора. Наиболее выгодную комбинацию организма-хозяина и промотора подобрать достаточно сложно, и это во многом зависит от целевого продукта [Terpe, 2006].

В связи с изложенным выше целью данной работы стало определение возможности использования T7 системы, позволяющей получать рекомбинантный белок с полигистидиновой меткой, для экспрессии гуанилпредпочитающих рибонуклеаз *Bacillus*.

В работе решали следующие задачи:

1. Получить плазмиду, обеспечивающую индуцируемую экспрессию гуанилпредпочитающей рибонуклеазы *Bacillus pumilus* с гистидиновой меткой и секрецию белка;
2. Оценить уровень биосинтеза рекомбинантной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* в экспрессионном штамме;
3. Смоделировать пространственную структуру биназы с гистидиновой меткой и оценить возможность изменения ее физико-химических свойств.

ВЫВОДЫ

1. Ген гуанилпредпочитающей рибонуклеазы *Bacillus pumilus* – биназы – был клонирован на плазмиде pET2615, которая обеспечивала его ИПТГ-индуцируемую экспрессию с последующей секрецией белка из клеток
2. Экспрессия рекомбинантной биназы с плазмиды pET2615-HisBin-Vgs индуцируется 0.5 мМ ИПТГ в течение 16 ч при выращивании бактерий на богатой среде при температуре 30С.
3. Введение N-концевой метки в молекулу биназы не затрагивает активный центр фермента, хотя в целом, несколько увеличивает катионность и гидрофильность белка, и может незначительно снижать его стабильность.