

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Институт фундаментальной медицины и биологии

Кафедра генетики

ПРАКТИКУМ ПО ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ

Учебно-методическое пособие

Казань – 2022

УДК 577.21
ББК 28

Печатается по решению редакционно-издательского совета ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Учебно-методической комиссии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ, протокол № 4 от 16.03.2022, заседания кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, протокол № 6 от 15.03.2022.

Рецензенты:

Кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии **В. В. Ульянова**, кандидат биологических наук, зав. лабораторией инфекционных заболеваний растений КИББ КазНЦ ФИЦ РАН **В. Ю. Горшков**.

Журавлева Д. Э. Практикум по гетерологичной экспрессии белков. Учебно-методическое пособие / Д. Э. Журавлева, З. И. Исхакова, Е. Ю. Тризна, Р. Г. Хамидуллина, А. Р. Каюмов – Казань: Казань, КФУ, 2022. –36 с.

В учебно-методическом пособии содержится характеристика наиболее часто используемых бактериальных экспрессионных систем (плазмиды и штаммы), описания и протоколы стандартных методов получения рекомбинантных штаммов-продуцентов, индукции синтеза белка, оценка гиперпродукции методом электрофоретического разделения белка. Приводятся наиболее распространенные и общепринятые методики, не требующие дорогостоящих или редких реактивов и материалов, либо коммерческих наборов реагентов. Каждый метод содержит теоретическое описание и краткую характеристику, назначение метода, наиболее важные аспекты его практического использования, целевое назначение необходимых реактивов и оборудования, подробное последовательное описание стадий лабораторных операций.

© Журавлева Д. Э., Исхакова З. И., Тризна Е. Ю.,
Хамидуллина Р. Г., Каюмов А.Р, 2022
© Казанский федеральный университет, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ	5
1.1 Экспрессионные плазмиды.....	5
1.2 Плазмиды для получения белков с аффинными олигопептидами (аффинными тагами)	6
1.3 Лактозный, тетрациклиновый и арабинозный операторы	11
1.4 Штаммы <i>E. coli</i> для экспрессии рекомбинантных белков	11
ГЛАВА 2. ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА БЕЛКА	13
2.1 Трансформация плазмидной ДНК клеток <i>E. coli</i> методом теплового шока (химическая трансформация)	14
2.2 Трансформация плазмидной ДНК клеток <i>E. coli</i> методом электропорации. 16	
2.3 Скрининг рекомбинантных штаммов, обладающих максимальной гиперпродукцией белков	18
2.4 Гиперпродукция белков в клетках <i>E. coli</i> и получение клеточных экстрактов.....	19
2.5 Очистка белков на Ni-NTA сефарозе	21
2.6 Очистка белков на Strep-tactin сефарозе	23
2.7 Определение концентрации белка по методу Мэрион Брэдфорд	25
2.8 Электрофорез белков в денатурирующих условиях.....	26
2.9 Электрофорез белков в нативных условиях (основной) для белков, у которых pI (изоэлектрическая точка) <7.....	29
2.10 Электрофорез белков в нативных условиях (кислотный) для белков, у которых pI (изоэлектрическая точка) >7.....	31
2.11 Окрашивание белковых гелей кумасси синим.....	33
2.12 Окрашивание белковых гелей нитратом серебра	34
ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И СПОСОБЫ ИХ РЕШЕНИЯ	35
ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА	36

ВВЕДЕНИЕ

Развитие генной инженерии и клонирования открыло множество возможностей экспрессии и выделения гетерологичных белков для исследовательских целей. Существует множество молекулярных инструментов и протоколов для производства гетерологичных белков: обширный каталог экспрессионных векторов, большое количество бактериальных и дрожжевых штаммов и множество стратегий культивирования. Наиболее простой экспрессионной системой для экспрессии рекомбинантных белков в лабораторных условиях являются системы на основе клеток *Escherichia coli*.

К преимуществам работы с кишечной палочкой можно отнести следующее:

- 1) Большое количество плазмидных векторов дают возможность быстрого и простого клонирования гена целевого белка для получения плазмиды с заданными условиями экспрессии, продукции рекомбинантного белка, несущего аффинный олигопептид на N- или C-конце белка, или комбинацию аффинных олигопептидов;
- 2) Генетическая трансформация кишечной палочки проходит с высокой эффективностью, при этом процедура часто не требует специального оборудования и реагентов;
- 3) Генетический аппарат кишечной палочки совместим с большинством кодонов и, как правило, не требуется оптимизация генетического кода;
- 4) При оптимальных условиях экспрессии возможно получить до 10% целевого белка от сухой биомассы клеток.

Несколько шагов отделяет вас от рекомбинантного белка: ген интересующего белка клонируется в любой имеющийся в вашем распоряжении экспрессионный вектор, желаемый штамм-хозяин трансформируется полученной плазмидой, индуцируется экспрессия белка, и затем белок готов к очистке и дальнейшим манипуляциям.

ГЛАВА 1. ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ

1.1 Экспрессионные плазмиды

Экспрессионная плазида включает в себя следующие структурные элементы: точка Origin, экспрессионная кассета (промотор, сайт связывания рибосом, полилинкер – сайт с множеством уникальных сайтов для эндонуклеаз рестрикции, терминатор), селективный маркер (Рисунок 1).

Точка Origin, Ori или **сайт начала репликации** является необходимым структурным элементом любого плазмидного вектора. Это АТ-богатая последовательность ДНК, обеспечивающая автономную инициацию репликации плазмиды в клетках определенного вида микроорганизма с участием белков репликации самого микроорганизма. Сама плазида не кодирует эти белки. Поэтому, точка Ori, распознаваемая белками *E. coli*, не будет активна в клетках других бактерий. Точка Ori со всеми ее регуляторными элементами называется репликоном.

Экспрессионная кассета включает в себя сильный промотор под контролем оператора, сайт связывания с рибосомой (RBS – ribosome binding site), полилинкер (участок с множеством уникальных сайтов для эндонуклеаз рестрикции для клонирования гена белка), терминатор, дополнительные последовательности. В качестве промоторов используются, как правило, промоторы фагов, которые обеспечивают высокий уровень транскрипции гена. В большинстве случаев также после промотора находится оператор, позволяющий «включать» транскрипцию гена только в определенное время.

Селективный маркер необходим для отбора трансформированных клеток, содержащих экспрессионную плазмиду. Существуют позитивные и негативные маркеры отбора. Наиболее распространенный маркер – это ген устойчивости к антибиотику. В плазидах, реплицирующихся в кишечной палочке, наиболее распространенными являются гены устойчивости к ампициллину, канамицину, тетрациклину и хлорамфениколу (Таблица 1).

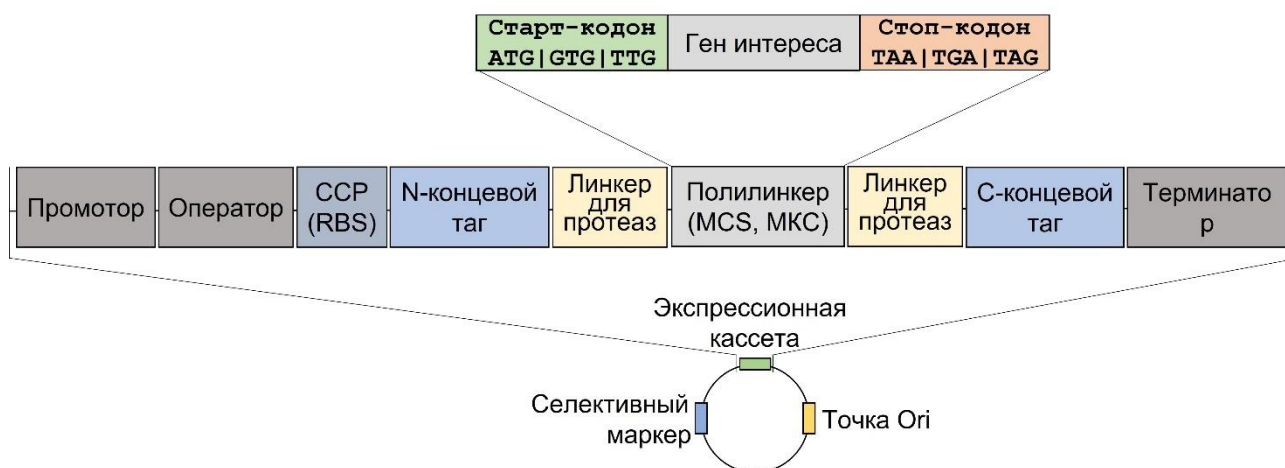


Рисунок 1 – Основные элементы экспрессионной плазмиды

Таблица 1 – Конечные концентрации в среде культивирования антибиотиков для отбора рекомбинантных штаммов

Название	Рабочая концентрация	Стоковый раствор*	Растворитель	Условия хранения
Ампициллин (Amp)	100 мкг/мл	100 мг/мл	20% этанол	4–6 мес., -20 °С
Канамицин (Kan)	10 мкг/мл	10 мг/мл	H ₂ O	-20 °С
Тетрациклин (Tet)	15 мкг/мл	15 мг/мл	70% этанол	Чувствителен к свету, -20 °С
Хлорамфеникол (Cam)	33 мкг/мл	33 мг/мл	96% этанол	-20 °С

*Готовится 1000-кратный раствор антибиотика, добавляется в питательную среду в соотношении 1 мкл антибиотика на 1 мл питательной среды.

1.2 Плазмиды для получения белков с аффинными олигопептидами (аффинными тагами)

В общем виде схема клонирования выглядит следующим образом. Если аффинный таг, имеющийся в конструкции вектора для экспрессии, планируется расположить на N-конце рекомбинантного белка, то праймеры для клонирования подбирают таким образом, чтобы целевой фрагмент включал всю рамку считывания (либо интересующий фрагмент), начиная стартовым и заканчивая стоп-кодоном (Рисунок 2). При необходимости получения рекомбинантного белка с C-концевым аффинным тагом дизайн праймеров продумывают таким образом, чтоб клонировать всю рамку считывания (либо интересующий фрагмент) без стоп-кодона (Рисунок 3).

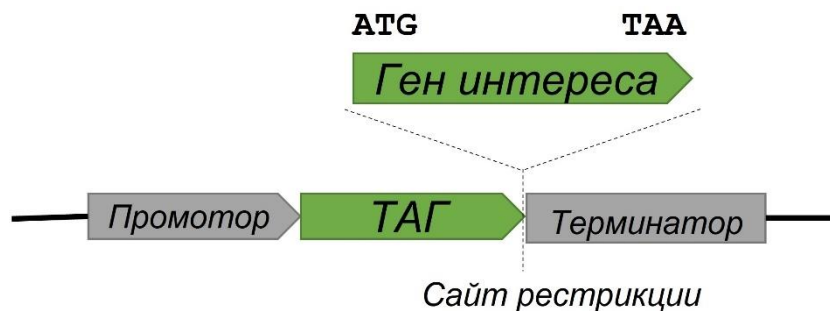


Рисунок 2 – Общая схема клонирования для получения белка с N-концевым аффинным тагом

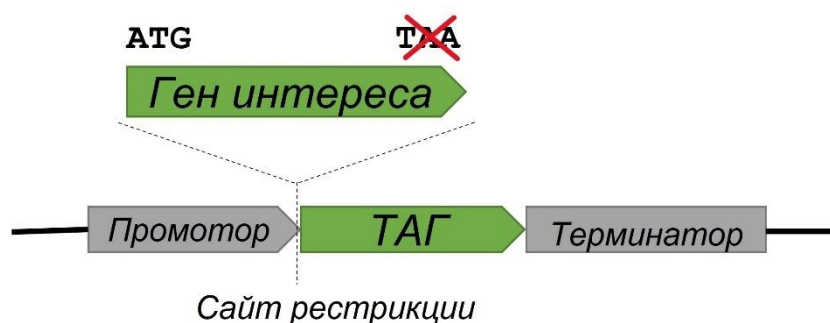


Рисунок 3 – Общая схема клонирования для получения белка с C-концевым аффинным тагом

Для получения белков с гистидиновым тагом можно использовать плазмиду pET15b. Плазмида pET15b обеспечивает синтез целевого белка с N-концевой гексагистидиновой последовательностью, после которой расположен сайт распознавания тромбином (протеаза, с помощью которой можно удалить в очищенном белке аффинный олигопептид) и имеет три сайта рестрикции для клонирования генов. Экспрессионная кассета находится под контролем лактозного оператора (Рисунок 4). В плазмиде присутствует ген устойчивости к ампициллину.

Для получения белков со стреп-тагом можно использовать плазмиды pASK-IBA5plus и pASK-IBA3plus. Плазмиды pASK-IBA5plus и pASK-IBA3plus обеспечивают синтез целевого белка с N- и C-концевыми стреп-таг последовательностями, соответственно. Экспрессионная кассета находится под контролем тетрациклинового промотора (Рисунок 5, 6). В плаزمиде присутствует ген устойчивости к ампициллину.


```

1      CCAATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAAATTTTGTGTGACACTCTATCATTTGATGAGATTATTTTACCACACTCCCTA 77
      forward primer

78      TCAGTGTAGAGAAAAAGTGAATAGTTCGACA AAAAATCTAGAAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATAC 157
      XbaI

      M G D R G P E F E L G T R G S L E V D L Q G D H G L

158     AaatggAGACCGGGTCCCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCCTCGAGGTCGACCTGCAGGGGACCATGGTCTC 237
      BsaI BsmFI SstI KpnI BamHI SmaI XhoI PstI SmaI BsmFI BsaI
      PshAI EcoRI PshAI NcoI
      SacII

link   Strep-tag
S A W S H P Q F E K *

238     AgcgcTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATAATAAGCTTGACCTGTGAAGTGA AAAAATGGCGCACATTTGTGCGACATTT 317
      Eco47III HindIII

318     TTTTGTCTGCGGTTTACCGCTACTGCGTCSACGGATCTCCACGGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGGTGTGGT 397
      reverse primer

```

Рисунок 5 – Схема экспрессионной кассеты экспрессионного вектора pASK-IBA3plus:

forward primer - прямой праймер для скрининга;

XbaI, NheI, BbeI, EheI, KasI, NarI, BsaI, BsmFI, SstI, KpnI, BamHI, PshAI, EcoRI, SmaI, XhoI, SacII, SalI, PstI, BsmFI, BsaI, EcoRV, HindIII, PshAI, NcoI - сайты рестрикции, идентичные сайты рестрикции выделены жирным шрифтом;

Strep-tag - последовательность аффинного стреп-тага;

Link - содержит сайт рестрикции, который может быть использован для субклонирования рекомбинантного гена в векторы pEXPR-IBA для экспрессии у млекопитающих;

reverse primer - обратный праймер для скрининга.

```

1      CCATCGAAATGGCCAGATGATTAATTCCTAAATTTGGTTGGACACTCTATCATTTGATAGAGTTATTTTACCCTCCCTATC 79
      forward primer

80      AGTGATAGAGAAAAGTGAATGAAATAGTCTCGACAAAATACTAGAAAATAATTTGTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAA 159
      XbaI

      Strep-tag      link      R P R S R I R A R Y P G I      D R G P E F E L G T R G S
      M A S W S H P Q F E K G A E T A V P N S S V P G D P
160     ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGGAGTTTCGAAAAAGCGCGGAGACCGCGGTCCCGAAATTCGAGCTGGTACCCGGGGATCC 239
      NheI      BbeI BsaI BsmFI SstI KpnI BamHI
      EheI PshAI EcoRI SmaI XhoI
      Kasi SacII
      Nari

      L E V D L Q G D H G L *
      P R G R P A G G P W S L I S N *
      S R S T C R G T M V S D I *
240     CTCGAGGTCGACCTGCAGGGGACCAATGGTCTGTgataCTAACTAAGTTGACCTGTGAAGTGA AAAATGGCGCACATT 319
      Sali PstI BsmFI BsaI EcoRV HindIII
      PshAI
      NcoI

320     GTGGGACATTTTTTTGTCTGTCCGTTTACCGCTACTGCGTCA CGGATCTCCACGGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCG 399
      reverse primer

```

Рисунок 6 – Схема экспрессионной кассеты экспрессионного вектора рASK-IBA5plus:

forward primer - прямой праймер для скрининга;

XbaI, *NheI*, *BbeI*, *EheI*, *KasI*, *NarI*, *BsaI*, *BsmFI*, *SstI*, *KpnI*, *BamHI*, *PshAI*, *EcoRI*, *SmaI*, *XhoI*, *XhoI*, *SacII*, *Sall*, *PstI*, *BsmFI*, *BsaI*, *EcoRV*, *HindIII*, *NcoI* - сайты рестрикции, идентичные сайты рестрикции выделены жирным шрифтом;

Strep-tag - последовательность аффинного стреп-тага;

Link - содержит сайт рестрикции, который может быть использован для субклонирования рекомбинантного гена в векторы рEXPR-IBA для экспрессии у млекопитающих;

reverse primer - обратный праймер для скрининга.

1.3 Лактозный, тетрациклиновый и арабинозный операторы

Поскольку накопление чужеродного белка может быть токсичным для бактериальной клетки, в экспрессионный вектор часто включают индуцибельные промоторные/операторные участки. При этом условием инициации транскрипции является добавление индуктора. Когда в среде отсутствует индуктор, операторный участок блокирован репрессором, РНК-полимераза не может связаться с промотором и транскрипция клонированного гена не происходит.

Широкое распространение получили лактозный, тетрациклиновый и арабинозный операторы (Таблица 2).

Таблица 2 – Операторы, применяемые в прокариотических экспрессионных векторах

Оператор	Индуктор	Стоковый раствор	Растворитель	Концентрация индуктора в среде	Векторы
<i>lac</i>	ИПТГ*	1М	H ₂ O	0.5–1 мМ	pET
<i>tet</i>	АГТ**	2 мг/мл	Этанол	0.2 мкг/1 мл	pASK
<i>ara</i>	L-арабиноза	20%	H ₂ O	0.2%	pBAD

* ИПТГ – Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид, неметаболизируемый клеткой аналог лактозы.

** АГТ – ангидротетрациклин

1.4 Штаммы *E. coli* для экспрессии рекомбинантных белков

Штаммы *E. coli*, наиболее часто используемые для экспрессии рекомбинантных белков перечислены в таблице 3. Характерной особенностью этих штаммов являются мутации, блокирующие систему рестрикции-модификации, а также мутации в генах, кодирующих клеточные протеазы (Таблица 3). Таким образом, данные штаммы не способны уничтожать введенные в них экспрессионные векторы и расщеплять продуцируемые рекомбинантные белки. При этом в настоящее время разработаны несколько штаммов кишечной палочки для продукции белков для решения разных задач.

Таблица 3 – Штаммы *E. coli* для экспрессии рекомбинантных белков

Название штамма	Использование штамма	Генотип
<i>E. coli</i> BL21(λDE3)	Основной штамм для экспрессии рекомбинантных белков	$F^- ompT hsdS_B(r_B-m_B^-) gal dcm (DE3)$
<i>E. coli</i> Lemo21(λDE3)	Для экспрессии сложных белков: мембранные белки, токсичные белки, нерастворимые белки	$F^- ompT hsdS_B(r_B-m_B^-) gal dcm (DE3) pLemo Cam^r$
<i>E. coli</i> Rosetta(λDE3)	Для экспрессии эукариотических белков (позволяет экспрессировать белки с кодонами, редкими для бактерий)	$F^- ompT hsdS_B(r_B-m_B^-) gal dcm (DE3) pRARE Cam^r$
<i>E. coli</i> B834	Для маркировки белков для последующей кристаллографии	$F^- ompT hsdS_B(r_B-m_B^-) gal dcm met (DE3)$

(*DE3*) – наличие профага, несущего кассету с геном РНК-полимеразы T7;
pLemo Cam^r – плазмида pACYC184-PrhaBAD-lysY, позволяет варьируя концентрацию арабинозы регулировать синтез лизоцима, репрессора РНК-полимеразы T7;
pRARE Cam^r – плазмида, кодирующая гены тРНК для кодонов AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, которые плохо считываются в кишечной палочке.

Название гена в списке означает, что ген несет мутацию потери функции:
F⁻ - не несет плазмиду F;
ompT – мутация в гене белковой протеазы VII;
hsdS_B(r_B-m_B⁻) – блокировка системы рестрикции-модификации (EcoB) хозяйского штамма;
gal – нарушена система утилизации галактозы;
dcm – метилаза.

ГЛАВА 2. ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА БЕЛКА

Получение рекомбинантных белков высокой степени очистки и изучение их свойств является одной из главных задач для биохимии белков в науке и фармацевтической промышленности. Бактериальные экспрессионные системы для получения гетерологичных белков являются привлекательными из-за возможности наращивания большой биомассы на недорогих субстратах, хорошо исследованной генетики и наличия большого числа векторов для клонирования и мутантных штаммов-хозяев.

Последовательность действий для получения очищенного рекомбинантного белка включает следующие действия:

- 1) Клонирование гена в экспрессионный вектор;
- 2) Перенос плазмиды в экспрессионный штамм;
- 3) Скрининг клонов на способность к гиперпродукции белка (small-scale);
- 4) Получение биомассы штамма и индукция гиперпродукции белка;
- 5) Очистка рекомбинантного белка.

2.1 Трансформация плазмидной ДНК клеток *E. coli* методом теплового шока (химическая трансформация)

1. Колонию с чашки перенести в 2 мл LB и инкубировать в течение ночи при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин.

2. 200 мкл ночной культуры перенести в 10 мл среды LB, выращивать до ОП₅₉₀=0.6-0.8 при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин (1.5–2 часа).

3. Клетки из 1.5 мл культуры собрать центрифугированием в стерильных эппендорфах в течение 10 мин при 3 тыс. об/мин или в течение 2 мин при 13 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость удалить полностью.

4. Клетки ресуспендировать в 200 мкл холодного, стерильного раствора 0.1М CaCl₂, поместить в лед на 2 ч при температуре 4 °С.

Ионы кальция связываются с внешней мембраной клеток, и тем самым позволяют ДНК сорбироваться за счет ионных связей. Через 2 часа инкубации достигается максимальная сорбционная емкость, потом она сохраняется некоторое время. В данном растворе клетки могут сохранять компетентность в течение суток, далее эффективность трансформации сильно снижается.

5. К 200 мкл компетентных клеток добавить ДНК (как правило, вносят 0.1 мкг плазмидной ДНК, это 1 мкл раствора плазмиды, полученной путем очистки с помощью коммерческого набора) и оставить во льду на 15 мин.

6. Клетки поместить в водяную баню или твердотельный термостат на 42 °С на 5 мин.

7. Клетки перенести в лед на 10 мин.

8. Добавить 800 мкл теплого LB (можно комнатной температуры) и инкубировать 1 ч при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин.

За это время клетки должны синтезировать фермент, отвечающий за устойчивость к антибиотику. Поэтому короткое время инкубации может погубить клетки. Однако если инкубировать более 1 часа, клетки начнут делиться, и количество колоний на чашке будет значительно увеличиваться, что может затруднить дальнейший скрининг.

9. Сделать высевы на LB-агар (вылить содержимое эппендорфа в чашку Петри и распределить) с соответствующим антибиотиком и инкубировать сутки при 37 °С. Чашки в термостате должны лежать перевернутыми, т. е. агаром вверх.

Анализировать рекомбинантные клетки (трансформанты) необходимо не позднее 2 суток после трансформации, так как может быть контаминация из растворов, а также вокруг колоний истинных трансформантов могут вырасти мелкие колонии, не имеющие плазмиды, поскольку рекомбинантные клетки выделяют в среду вокруг себя ферменты, разрушающие антибиотик.

Питательные среды и растворы:

LB [Sambrook <i>et al.</i> , 1989]	100 мл
Триптон	1 г
Дрожжевой экстракт	0.5 г
NaCl	0.5 г

Твердая среда LB (LA) включает 2% агара, 2 г на 100 мл среды.

0.1M CaCl₂ = 1.47 г CaCl₂×2H₂O на 100 мл деионизованной воды. Готовый раствор простерилизовать в автоклаве или при помощи стерильного фильтра с диаметром пор 0.2 мкм, хранить при 4 °С.

2.2 Трансформация плазмидной ДНК клеток *E. coli* методом электропорации

1. Колонию с чашки перенести в 10 мл LB и инкубировать в течение ночи при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин.

2. 10 мл ночной культуры перенести в 90 мл LB и инкубировать на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин при 37 °С до ОП₆₀₀=0.5–0.6 (~ 2 часа). *

* Если нужно меньшее количество проб, все объемы растворов, в том числе объем культуры клеток, уменьшаются в одинаковое количество раз.

ВСЕ ДАЛЬНЕЙШИЕ МАНИПУЛЯЦИИ ПРОВОДЯТСЯ НА ЛЬДУ И ЦЕНТРИФУГАХ С ОХЛАЖДЕНИЕМ:

3. Клетки собрать центрифугированием в течение 10 мин при 4.4 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость удалить.

4. Клетки отмыть 2 раза холодной (4 °С) деионизованной водой: к осадку клеток добавить 25 мл воды, ресуспендировать и центрифугировать в течение 10 мин при 4.4 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость удалить.

5. Клетки отмыть 2 раза холодным (4 °С) 10%-ным раствором глицерина в деионизованной воде: к осадку клеток добавить 10 мл глицерина, ресуспендировать и центрифугировать в течение 10 мин при 4.4 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость удалить.

6. Клетки ресуспендировать в 5 мл ледяного, стерильного 10%-ного глицерина.

7. Разлить клетки порциями по 50 мкл в эппендорфы, убрать в морозильник на -80 °С.

8. Электропорационную кювету хорошо промыть (5 мин держать в деионизованной воде, залить 70% спирт на 30 мин, вылить) и поставить сушиться в ламинар под ультрафиолетовые лучи. Перед работой кювету поставить в лед на 10 мин.

9. Клетки медленно разморозить на льду, добавить ДНК и осторожно перемешать, перенести в холодную кювету.

ВАЖНО!

Любые соли приводят к тому, что электрический импульс будет проходить через раствор, а не через клетки, и эффективность трансформации резко снижается. Поэтому ДНК для электропорации должна быть растворена в деионизованной воде, и добавлять ее можно не более 5 мкл на кювету.

При трансформации клеток лигазной смесью необходимо брать не более 1 мкл смеси.

Условия электропорации:

а) Ес 1 для кювет 1 мм (напряжение 1,8 kV; длительность импульса ~5,0 мс)

б) Ес 2 для кювет 2 мм (напряжение 2,5 kV; длительность импульса ~5,0 мс)

10. Протереть кювету и поставить ее в прибор Bio-Rad MicroPulser. Установить параметры и нажать кнопку «Pulse». После убедиться, что импульс был не короче ~4,0 мс (больше ~5,0 мс – нормально), если короче, то нажать кнопку «Pulse» еще раз. После звукового сигнала снять кювету.

11. После электропорации сразу в кювету добавить 400 мкл среды LB (37 °С). Осторожно перемешать, перелить в эппендорф и инкубировать при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин в течение 40 мин.

12. Сделать высевы на LB-агар (вылить содержимое эппендорфа в чашку Петри и распределить) с соответствующим антибиотиком и инкубировать сутки при 37 °С. Чашки в термостате должны лежать перевернутыми, т. е. агаром вверх.

Питательные среды и растворы:

LB [Sambrook <i>et al.</i> , 1989]	100 мл
Триптон	1 г
Дрожжевой экстракт	0.5 г
NaCl	0.5 г

Твердая среда LB (LA) включает 2% агара, 2 г на 100 мл среды.

10% глицерин = 10 мл глицерина + 90 мл деионизованной воды.

2.3 Скрининг рекомбинантных штаммов, обладающих максимальной гиперпродукцией белков

1. Одну колонию с чашки с трансформантами перенести в 1 мл LB с соответствующим антибиотиком, и инкубировать в течение ночи при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин. *

* Количество отдельных колоний варьируется от 1 до максимального (до 9 или 18 и т. д., чтобы поместилось на один или два и т. д. ПААГ-гелей). Одна колония является контрольной – в нее не добавляется индуктор.

2. 200 мкл ночной культуры рекомбинантных штаммов *E. coli* перенести в 2 мл среды LB и выращивать 2–3 часа на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин при 37 °С до достижения $ОП_{600}=0.8$.

3. Для снятия репрессии и индукции гиперпродукции белка внести ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ (для плазмид с лактозным оператором), или АГТ до конечной концентрации 0.2 мкг/мл (для плазмид с тетрациклиновым оператором), или арабинозу до конечной концентрации 0.2% (для плазмид с арабинозным оператором), и культивировать 4 часа при 25–30 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин.

4. 30 мкл суспензии клеток смешать с 10 мкл 4-кратного буфера SB (см. раздел 2.8) и инкубировать при 95 °С в течение 10 мин.

5. Пробы анализировать с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях.

6. Оставшиеся после приготовления проб для электрофореза клетки собрать центрифугированием в течение 2 мин при 13 тыс. об/мин либо в течение 10 мин при 3 тыс. об/мин. Удалить надосадочную жидкость. Хранить при -20 °С.

Растворы:

ИПТГ 0.1М = 0.024 г на 1 мл деионизованной воды, добавлять 1 мкл на 1 мл клеточной суспензии;

АГТ 2 мг/мл = 0.002 г на 1 мл 96% этанола, разбавить в 10 раз этанолом и добавлять 1 мкл на 1 мл клеточной суспензии.

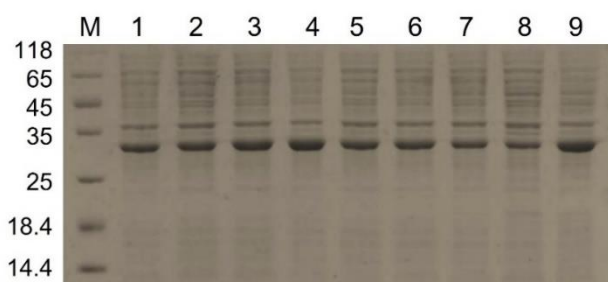


Рисунок 7 – Пример скрининга рекомбинантных штаммов для гиперпродукции рекомбинантных белков

2.4 Гиперпродукция белков в клетках *E. coli* и получение клеточных экстрактов

1. Соскрести с чашки некоторое количество клеток рекомбинантного штамма *E. coli* и перенести их в 50 мл среды LB с соответствующим антибиотиком и инкубировать в течение ночи при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин.

2. В 450 мл среды LB с соответствующим антибиотиком засеять 50 мл ночной культуры рекомбинантного штамма *E. coli* и инкубировать в течение 2 часов при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин до ОП₆₀₀~0.8.

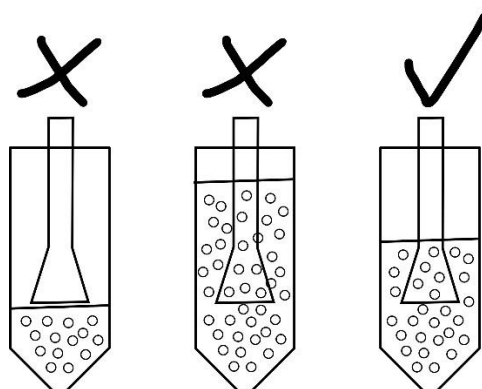
3. Добавить ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, либо АГТ до конечной концентрации 0.2 мкг/мл, либо L-арабинозу до конечной концентрации 0.2% и культивировать 4 часа при 25–30 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин.

4. Клетки собрать с помощью центрифугирования в течение 15 мин при 4.4 тыс. об/мин.

5. Клетки ресуспендировать в 20 мл буфера DB для последующей очистки на Ni-NTA сефарозе либо в 20 мл StW буфера для последующей очистки на стреп-тактин сефарозе.

6. Разрушить клетки на ультразвуковом дезинтеграторе при 22 кГц во льду (7–10 озвучиваний по 1 мин с перерывами по 1 мин для охлаждения).

Для этого фалкон с суспензией клеток поместить в круглую колбу с плоским дном (объемом либо 100, либо 250 мл) предварительно наполненную льдом и водой; опустить в фалкон с суспензией клеток кончик УЗ-зонда, как показано на рисунке ниже.



7. Полученный клеточный экстракт центрифугировать в течение 15 мин при 4.4 тыс. об/мин с охлаждением до 4 °С для удаления крупных клеточных обломков (дебриса).

8. Полученный клеточный экстракт перенести в эппендорфы и центрифугировать в течение 15 мин при 13 тыс. об/мин с охлаждением до 4 °С

для удаления мелких клеточных обломков и затем использовать для аффинной хроматографии.

Растворы:

DB буфер pH 8.0	Конц.	100 мл
NaCl	100 мМ	0.58 г
Трис-НСl	50 мМ	0.605 г

StW буфер pH 8.0	Конц.	100 мл
NaCl	150 мМ	0.88 г
Трис-НСl	100 мМ	1.22 г
ЭДТА	1 мМ	0.038 г

ИПТГ 1М = 0.24 г на 1 мл деионизованной воды, добавлять 1 мкл на 1 мл клеточной суспензии;

АГТ 2 мг/мл = 0.002 г на 1 мл 96% этанола, добавлять 1 мкл на 10 мл клеточной суспензии;

L-арабиноза 20% = 0.2 г на 1 мл деионизованной воды, добавлять 1 мкл на 1 мл клеточной суспензии.

2.5 Очистка белков на Ni-NTA сефарозе

Хроматографию белков, содержащих гексагистиридиновый таг проводить на Ni-NTA сефарозе.

1. 2 мл суспензии Ni-NTA сефарозы поместить в колонку для аффинной хроматографии.

2. Подготовить колонку к очистке белка путем промывания сефарозы 5 мл буфера HisW.

3. Подготовить клеточный экстракт для нанесения на колонку как описано в разделе 2.4.

4. 50 мкл клеточного экстракта сохранить для дальнейшего анализа (проба 1).

5. Пропустить через колонку клеточный экстракт 3 раза, поскольку не весь целевой белок связывается с сефарозой за 1 пропускание.

6. 50 мкл клеточного экстракта после пропускания через колонку сохранить для дальнейшего анализа (проба 2).

7. Колонку промыть буфером HisW, наличие не связавшегося с носителем белка проверять при помощи раствора Брэдфорд. Промывать до тех пор, пока раствор Брэдфорд не перестанет синеть.

Для приготовления 10 мл рабочего раствора Брэдфорд необходимо 5 мл раствора Брэдфорд смешать с 5 мл деионизованной воды в маленьком стеклянном стаканчике, предварительно обработанным 96% спиртом.

В 10 лунок 96-лучночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Брэдфорд. Проверять наличие неспецифических белков смешением 30 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Брэдфорд.

8. Связавшийся белок элюировать буфером HisE. Элюировать до тех пор, пока раствор Брэдфорд подтверждает наличие белка во фракции (синее).

В 10 лунок 96-лучночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Брэдфорд. Проверять наличие связавшихся белков смешением 5 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Брэдфорда.

9. После элюции промыть колонку 5 мл буфера HisW. Хранить колонку в холодильнике в буфере HisW.

10. Анализировать фракции элюции с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях.

Со временем Ni-NTA сефароза теряет связывающие свойства и ее нужно промывать и перезаряжать.

Для регенерации Ni-NTA сефарозы (для 1 мл сефарозы):

1. Колонку промыть 2 мл деионизованной воды.
2. Колонку промыть 5 мл 0.2М ЭДТА pH 8.0 (смывает ионы никеля).
3. Колонку промыть 5 мл 6М гуанидина гидрохлорида (удаляет неспецифически сорбированные белки).
4. Колонку промыть 10 мл деионизованной воды.
5. Зарядить колонку 2 мл 0.2М NiSO₄.
6. Промыть сефарозу от несвязавшихся ионов никеля 2 мл деионизованной воды.
7. Промыть колонку 10 мл буфера HisW.
8. Хранить колонку в холодильнике в буфере HisW.

Растворы:

HisW pH 8.0	Конц.	100 мл	250 мл	500 мл
NaCl	0.5 М	2.92 г	7.3 г	14.6 г
Трис-НСl	0.05 М	0.61 г	1.52 г	3.03 г
Имидазол	0.025 М	0.17 г	0.43 г	0.86 г

HisE pH 8.0	Конц.	10 мл	50 мл	100 мл
NaCl	0.5 М	0.29 г	1.46 г	2.92 г
Трис-НСl	0.05 М	0.061 г	0.31 г	0.61 г
Имидазол	0.5 М	0.34 г	1.7 г	3.4 г

0.2М ЭДТА pH 8.0 = 3.36 г на 50 мл деионизованной воды, довести pH до 8;
 6М гуанидин гидрохлорид = 7.01 г на 20 мл деионизованной воды;
 0.2 М NiSO₄ = 0.56 г NiSO₄ × 7H₂O на 10 мл деионизованной воды.

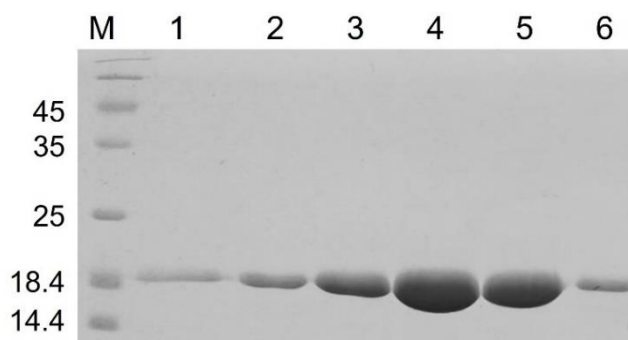


Рисунок 8 – Пример очистки рекомбинантного белка

2.6 Очистка белков на Strep-tactin сефарозе

Очистку белков со strep-тагом проводить на стреп-тактин сефарозе.

1. 2 мл суспензии стреп-тактин сефарозы поместить в колонку для аффинной хроматографии.

2. Подготовить колонку к очистке белка путем промывания сефарозы 5 мл буфера StW.

3. Подготовить клеточный экстракт для нанесения на колонку как описано в разделе 2.4.

4. 50 мкл клеточного экстракта сохранить для дальнейшего анализа (проба 1).

5. Пропустить через колонку клеточный экстракт 3 раза, поскольку не весь целевой белок связывается с сефарозой за 1 пропускание.

6. 50 мкл клеточного экстракта после пропускания через колонку сохранить для дальнейшего анализа (проба 2).

7. Колонку промыть буфером StW, наличие не связавшегося с носителем белка проверять при помощи раствора Бредфорд. Промывать до тех пор, пока раствор Бредфорд не перестанет синеть.

Для приготовления 10 мл рабочего раствора Бредфорд необходимо 5 мл раствора Бредфорд смешать с 5 мл деионизированной воды в маленьком стеклянном стаканчике, предварительно обработанным 96% спиртом.

В 10 лунок 96-лучночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Бредфорд. Проверять наличие неспецифических белков смешением 30 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Бредфорд.

8. Связавшийся белок элюировать буфером StE. Элюировать до тех пор, пока раствор Бредфорд подтверждает наличие белка во фракции (синее).

В 10 лунок 96-лучночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Бредфорд. Проверять наличие связавшихся белков смешением 5 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Бредфорд.

9. Анализировать фракции элюции с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях.

10. После элюции промыть колонку 7 мл буфера для регенерации StR.

11. Промыть колонку 15 мл буфера StW.

12. Промыть колонку 5 мл 0.1M NaOH.

13. Хранить колонку в холодильнике в 0.1M NaOH.

Со временем стреп-тактин сефароза накапливает на себе неспецифически сорбированные белки, поэтому ее нужно очищать.

Для регенерации стреп-тактин сефарозы (для 1 мл сефарозы):

1. Колонку промыть 2 мл деионизованной воды.
2. Колонку промыть 5 мл 6М гуанидина гидрохлорида для удаления неспецифически сорбированных белков.
3. Колонку промыть 10 мл деионизованной воды.
4. Колонку промыть 10 мл буфера StW.
5. Хранить колонку в холодильнике в буфере StW.

Растворы:

StW pH 8.0	Конц.	100 мл	250 мл	500 мл
NaCl	0.15 М	0.88 г	2.2 г	4.4 г
Трис-НСl	0.1 М	1.22 г	3.05 г	6.1 г
ЭДТА	0.001 М	0.038 г	0.095 г	0.19 г

StE pH 8.0	Конц.	10 мл	25 мл	50 мл
NaCl	0.15 М	0.09 г	0.22 г	0.44 г
Трис-НСl	0.1 М	0.12 г	0.31 г	0.61 г
ЭДТА	0.001 М	0.004 г	0.01 г	0.019 г
Дестибиотин	0.0025 М	0.006 г	0.014 г	0.027 г

Раствор для регенерации StR = 0.012 г 2-[4-гидроксибензеназо] бензойной кислоты (НАВА) на 50 мл буфера StW;

0.1М NaOH = 0.2 г на 50 мл деионизованной воды.

2.7 Определение концентрации белка по методу Мэрион Брэдфорд [Bradford, 1976]

Приготовление раствора Брэдфорд:

1. 0.02 г кумасси G-250 растворить в 10 мл этанола.
2. Добавить 20 мл ортофосфорной кислоты.
3. Довести объем раствора до 200 мл деионизованной воды.
4. Полученный раствор отфильтровать через бумажный фильтр.

Построение калибровочной кривой:

1. Приготовить водный раствор БСА (бычий сывороточный альбумин) 10 мг/мл.
2. Развести водный раствор БСА водой в 10 раз (100 мкл БСА 10 мг/мл + 900 мкл деионизованной воды) до 1 мг/мл.
3. Смешать 1:1 раствор Брэдфорд и деионизованную воду.
4. Разлить по 1 мл по 6 эппендорфам полученный раствор.
5. Добавить в эппендорфы 1, 2, 4, 8 и 16 мкл БСА 1 мг/мл.
6. Через 5 минут развития окраски измерить поглощение образцов против контроля при длине волны 595 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.
7. Построить точечную диаграмму, выставить линию тренда, вывести уравнение на график. Коэффициент перед X – коэффициент раствора Брэдфорд.

Определение концентрации белка:

1. Смешать 1:1 раствор Брэдфорд и деионизованную воду.
2. В 1 мл полученного раствора внести 1 мкл исследуемой пробы белка (если 1 мкл недостаточно, то внести еще; затем учесть это при расчете).
3. Через 5 минут развития окраски измерить поглощение образцов при длине волны 595 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.
4. Концентрацию белка рассчитать по формуле:

$$\frac{\text{число, полученное на ФЭК} \times \text{коэфф. р – ра Брэдфорд}}{\text{объем иссл. пробы белка в мкл}} = \text{количество белка в мг/мл}$$

Раствор Брэдфорд	200 мл
Кумасси G-250	0.02 г
Этанол	10 мл
Ортофосфорная кислота	20 мл
H ₂ O	До 200 мл

2.8 Электрофорез белков в денатурирующих условиях

Электрофорез белков в денатурирующих условиях по методу Лэммли [Laemmli, 1970] в 10–15%-ном полиакриламидном геле в зависимости от размеров разделяемых молекул, 10% – для белков, размером больше 50 кДа, 15% – для белков, размером меньше 50 кДа.

1. Подготовить электрофоретические стекла для заливки гелей.

2. Залить свежеприготовленный разрешающий гель на 3/4 высоты «бутерброда» из стекла. Следом залить до краев деионизованной воды для формирования ровной границы геля. Дождаться полного застывания геля (примерно 20 мин). Застывание геля определяется появлением четкой границы деления между гелем и водой.

3. Слить воду и промокнуть остатки фильтровальной бумагой.

4. Залить свежеприготовленный концентрирующий гель и осторожно, не создавая пузырей, поместить между гелями гребенку. Дождаться полного застывания геля (примерно 20 мин).

5. Поместить стекла с гелями в электрофоретический модуль, извлечь гребенку.

6. Поместить модуль в ячейку и залить в них необходимое количество однократного TGB буфера.

7. Внести в лунки исследуемые пробы, предварительно смешанные 3:1 с буфером для внесения и нагреть в течение 10 мин при 95 °С, а также маркер белкового веса.

8. Надеть крышку с электродами, подключить источник питания, соблюдая полярность (красный к красному, черный к черному).

9. Задать нужные параметры и запустить электрофорез. Электрофорез проводить при значении напряжения 100 В в концентрирующем геле и 180 В – в разрешающем.

10. После того, как фронт красителя подойдет к нижнему краю геля, прибор отключить от электропитания, гель осторожно вынуть из стекол, отрезать концентрирующую часть геля (верхняя часть геля с лунками; выбросить) и окрасить гель кумасси синим или нитратом серебра.

Растворы:

30% АА (акриламид)	100 мл
Акриламид	29 г
Бис-акриламид	1 г
H ₂ O	70 мл

После приготовления раствора АА отфильтровать через фильтровальную бумагу.

Разрешающий гель	5 мл		
	10%	12.5%	15%
30% АА	1.67 мл	2.08 мл	2.5 мл
Трис-НСl 1М рН 8.8	1.88 мл	1.88 мл	1.88 мл
H ₂ O	1.36 мл	0.95 мл	0.53 мл
10% SDS	0.05 мл	0.05 мл	0.05 мл
10% PSA	50 мкл	50 мкл	50 мкл
TEMED	5 мкл	5 мкл	5 мкл

Добавить PSA и TEMED в конце. Аккуратно перемешать, стараясь не создать пузыри.

Концентрирующий гель	5 мл
30 % АА	0.83 мл
Трис-НСl 1М рН 6.8	0.63 мл
H ₂ O	3.4 мл
10% SDS	0.05 мл
10% PSA	50 мкл
TEMED	5 мкл

Добавить PSA и TEMED в конце. Аккуратно перемешать, стараясь не создать пузыри.

1x Буфер TGB рН 8.3	1 л
Трис-НСl	3 г
Глицин	18 г
SDS	1 г
H ₂ O	1 л

5x Буфер TGB	5 л
Трис-НСl	75 г
Глицин	450 г
SDS	25 г
H ₂ O	Довести до 5 л

4x SB (SDS буфер для внесения)	5 мл
Tris-HCl 1M pH 6.8	1 мл
DTT	0.3 г
SDS	0.4 г
Глицерин	2 мл
H ₂ O	2 мл
Бромфеноловый синий	На кончике скальпеля

10% PSA (персульфат аммония) = 1 г PSA + 9 мл деионизованной воды;

10% SDS = 5 г SDS + 45 мл деионизованной воды;

Трис-HCl 1M pH 8.8 = 12.1 г на 100 мл деионизованной воды (трис-HCl растворить в 70 мл деионизованной воды, поскольку при доведении pH объем увеличивается; после получения необходимого pH довести объем до 100 мл);

Трис-HCl 1M pH 6.8 = 12.1 г на 100 мл деионизованной воды (трис-HCl растворить в 70 мл деионизованной воды, поскольку при доведении pH объем увеличивается; после получения необходимого pH довести объем до 100 мл).

2.9 Электрофорез белков в нативных условиях (основной) для белков, у которых pI (изоэлектрическая точка) < 7

1. Подготовить электрофоретические стекла для заливки гелей.
2. Залить свежеприготовленный разрешающий гель на $3/4$ высоты «бутерброда» из стекла. Следом залить 0.5 мл н-бутанола. Через 10–20 минут будет видна граница раздела между гелем и бутанолом. После этого оставить полимеризоваться еще на 1 час.
3. Промыть верхнюю границу разрешающего геля водой перед заливкой концентрирующего геля.
4. Залить свежеприготовленный концентрирующий гель и осторожно, не создавая пузырей, поместить между гелями гребенку. Дождаться полного застывания геля (примерно 1 час).
5. Поместить стекла с гелями в электрофоретический модуль, извлечь гребенку.
6. Поместить модуль в ячейку и залить в них необходимое количество однократного TGB буфера.
7. Внести в лунки исследуемые пробы, предварительно смешанные 4:1 на льду с буфером для внесения, а также маркер белкового веса.
8. Надеть крышку с электродами, подключить источник питания, соблюдая полярность (красный к красному, черный к черному).
9. Задать нужные параметры и запустить электрофорез. Электрофорез проводить при значении силы тока 30 мА.
10. После того, как фронт красителя подойдет к нижнему краю геля, прибор отключить от электропитания, гель осторожно вынуть из стекол, отрезать концентрирующую часть геля (верхняя часть геля с лунками; выбросить) и окрасить гель.

Растворы:

Разрешающий гель	5 мл		
	10%	12%	15%
30% АА, 0.8% Бис-АА	1.86 мл	2.26 мл	2.78 мл
Трис-НСl 1.5М рН 8.9	1.4 мл	1.4 мл	1.4 мл
H ₂ O	2.46 мл	1.86 мл	1.26 мл
10% PSA	20 мкл	20 мкл	20 мкл
TEMED	4.6 мкл	4.6 мкл	4.6 мкл

Добавить PSA и TEMED в конце. Аккуратно перемешать, стараясь не создать пузыри.

Концентрирующий гель	5 мл
30 % АА, 0.8% Бис-АА	0.5 мл
Трис-НСl 0.5М рН 6.8	1.25 мл
H ₂ O	3.2 мл
10% PSA	50 мкл
TEMED	5 мкл

Добавить PSA и TEMED в конце. Аккуратно перемешать, стараясь не создать пузыри.

30% АА, 0.8% Бис-АА (акриламид)	100 мл
Акриламид	30 г
Бис-акриламид	0.8 г
H ₂ O	69.2 мл

После приготовления раствора АА отфильтровать через фильтровальную бумагу.

1x Буфер TGB рН 8.9	1 л
Тризма	6.05 г
Глицин	26.6 г
H ₂ O	1 л

5x SBN (буфер для внесения)	5 мл
Tris-НСl 0.5М рН 6.8	1.1 мл
Глицерин	2.5 мл
H ₂ O	1.4 мл
Бромфеноловый синий	На кончике скальпеля

Сделать аликвоты по 1 мл и хранить при – 20 °С.

10% PSA (персульфат аммония) = 1 г PSA + 9 мл деионизованной воды;
Трис-НСl 1.5М рН 8.9 = 18.17 г на 100 мл деионизованной воды (трис-НСl растворить в 70 мл деионизованной воды, поскольку при доведении рН объем увеличивается; после получения необходимого рН довести объем до 100 мл);
Трис-НСl 0.5М рН 6.8 = 6.1 г на 100 мл деионизованной воды (трис-НСl растворить в 70 мл деионизованной воды, поскольку при доведении рН объем увеличивается; после получения необходимого рН довести объем до 100 мл).

2.10 Электрофорез белков в нативных условиях (кислотный) для белков, у которых pI (изоэлектрическая точка) >7

1. Подготовить электрофоретические стекла для заливки гелей.
2. Залить свежеприготовленный разрешающий гель на $3/4$ высоты «бутерброда» из стекла. Следом залить 0.5 мл н-бутанола. Через 10–20 минут будет видна граница раздела между гелем и бутанолом. После этого оставить полимеризоваться еще на 1 час.
3. Промыть верхнюю границу разрешающего геля водой перед заливкой концентрирующего геля.
4. Залить свежеприготовленный концентрирующий гель и осторожно, не создавая пузырей, поместить между гелями гребенку. Дождаться полного застывания геля (примерно 1 час).
5. Поместить стекла с гелями в электрофоретический модуль, извлечь гребенку.
6. Поместить модуль в ячейку и залить в них необходимое количество однократного TGB буфера.
7. Внести в лунки исследуемые пробы, предварительно смешанные 4:1 на льду с буфером для внесения, а также маркер белкового веса.
8. Надеть крышку с электродами, подключить источник питания, **ИНВЕРТИРОВАТЬ ПОЛЯРНОСТЬ** (красный к черному, черный к красному). При кислом pH белки будут заряжены положительно, и, следовательно, будут двигаться к аноду, поэтому, если не инвертировать полярность, образцы будут потеряны.
9. Задать нужные параметры и запустить электрофорез. Электрофорез проводить при значении силы тока 30 мА.
10. После того, как фронт красителя подойдет к нижнему краю геля, прибор отключить от электропитания, гель осторожно вынуть из стекол, отрезать концентрирующую часть геля (верхняя часть геля с лунками; выбросить) и окрасить гель.

Растворы:

30% АА, 0.8% Бис-АА (акриламид)	100 мл
Акриламид	30 г
Бис-акриламид	0.8 г
H ₂ O	69.2 мл

После приготовления раствора АА отфильтровать через фильтровальную бумагу.

Разрешающий гель	5 мл		
	7%	10%	15%
1.5М Ацетат-КОН pH 4.3	1.34 мл	1.34 мл	1.34 мл
50% Глицерин	1.2 мл	1.2 мл	1.2 мл
AA 30%, 0.8% Бис-AA	1.28 мл	1.76 мл	2.66 мл
H ₂ O	1.32 мл	0.84 мл	0 мл
PSA 10%	64 мкл	64 мкл	64 мкл
TEMED	8 мкл	8 мкл	8 мкл

Добавить PSA и TEMED в конце. Аккуратно перемешать, стараясь не создать пузыри.

Концентрирующий гель	5 мл
0.25М Ацетат-КОН	1.25 мл
30 % AA, 0.8% Бис-AA	0.5 мл
H ₂ O	3.2 мл
10% PSA	50 мкл
TEMED	5 мкл

Добавить PSA и TEMED в конце. Аккуратно перемешать, стараясь не создать пузыри.

Рабочий буфер pH 4.3	1 л
β-аланин	31.17 г
Ледяная уксусная кислота	8 мл
H ₂ O	Долить до 1 л

5x DisB (буфер для внесения)	2 мл
50% Глицерин	1.45 мл
0.25М Ацетат-КОН pH 6.8	0.5 мл
Метиловый зеленый	На кончике скальпеля

Сделать аликвоты по 1 мл и хранить при – 20 °С.

1.5М Ацетат-КОН pH 4.3 = 14.7 г на 100 мл деионизованной воды (Ацетат-КОН растворить в 70 мл деионизованной воды, поскольку при доведении pH объем увеличивается; после получения необходимого pH довести объем до 100 мл);
 10% PSA (персульфат аммония) = 1г PSA + 9 мл деионизованной воды;
 0.25М Ацетат-КОН pH 6.8 = 2.5 г на 100 мл деионизованной воды (Ацетат-КОН растворить в 70 мл деионизованной воды, поскольку при доведении pH объем увеличивается; после получения необходимого pH довести объем до 100 мл).

2.11 Окрашивание белковых гелей кумасси синим

1. Гель после электрофореза поместить в контейнер с красящим раствором и инкубировать в течение ночи при комнатной температуре с качанием.

2. На следующий день гель промыть под проточной водой. Инкубировать гель в осветляющем растворе до полного удаления цвета фона. Для ускорения процесса поместить контейнер с гелем в осветляющем растворе в микроволновую печь не более, чем на 30 сек.

Красящий раствор	Концентрация	300 мл
Этанол	50%	150 мл
Ледяная уксусная кислота	10%	30 мл
Coomassie brilliant blue R250	0.22%	0.666 г
H ₂ O		120 мл

Осветляющий раствор	Концентрация	1 л
Этанол	10 %	100 мл
Ледяная уксусная кислота	10%	100 мл
H ₂ O		800 мл

2.12 Окрашивание белковых гелей нитратом серебра

ВСЕ МАНИПУЛЯЦИИ ПРОИЗВОДЯТСЯ В ПЕРЧАТКАХ, ГЕЛИ НАХОДЯТСЯ В СПЕЦИАЛЬНЫХ КОНТЕЙНЕРАХ, ИСПОЛЬЗУЕТСЯ MILLIQ H₂O.

1. Гель после электрофореза поместить в фиксирующий раствор А и инкубировать с качанием 30 мин.
2. Гель поместить в раствор Б и инкубировать с качанием 15 минут.
3. Гель промыть 2 раза по 5 мин в воде.
4. Гель выдержать 1 мин в растворе В.
5. Гель промыть водой.
6. Гель инкубировать в холодном растворе Г в течение 25 мин с качанием.
7. Гель промыть 2 раза по 1 мин водой.
8. Гель для проявления окраски поместить в раствор Д.
9. Добавить (НЕ НА ГЕЛЬ, а в угол контейнера) 12.5 мкл 37% формальдегида, сразу перемешать покачиванием. Дождаться появления полос на геле (не более 10 мин). Если окраска не произошла, добавить еще 12.5 мкл 37% формальдегида и ждать не более 10 мин.
10. Для остановки реакции поместить гель в раствор Е.
11. Промыть гель водой 2 раза по 1 минуте водой.

Растворы	Состав	50 мл
Раствор А	50% Этанол	25 мл
	5% Ледяная уксусная кислота	5 мл
Раствор Б	50% Этанол	25 мл
Раствор В	Тиосульфат натрия (Na ₂ S ₂ O ₃ × 5H ₂ O)	0.01 г
Раствор Г	Нитрат серебра (AgNO ₃) (хранить при 4 °С)	0.1 г
Раствор Д	Карбонат натрия безводный (Na ₂ CO ₃)	1.5 г
Раствор Е	Na ₂ -ЭДТА	0.7 г

Если по какой-то причине окраска геля не произошла должным образом, можно произвести обесцвечивание геля и повторную окраску.

Обесцвечивание геля:

1. Растворить 0.4 г феррицианида калия (K₃Fe(CN)₆) в 200 мл тиосульфата натрия (Раствор В, 0.04 г на 200 мл).
2. Инкубировать гель в растворе феррицианида калия до полного исчезновения полос.
3. Промыть гель 4–5 раз MilliQ H₂O в течение 15 мин.
4. Продолжить окраску с Раствора В.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И СПОСОБЫ ИХ РЕШЕНИЯ

Проблема	Решение
Не проходит трансформация бактерий	<ol style="list-style-type: none">1. Проверить «свежесть» штамма;2. Проверить кальциевый буфер;3. Проверить, тот ли антибиотик
Не происходит индукция экспрессии рекомбинантных белков	<ol style="list-style-type: none">1. Проверить штамм на наличие экспрессионной плазмиды;2. Проверить, верный ли индуктор
Не чистится рекомбинантный белок	<ol style="list-style-type: none">1. Проверить наличие экспрессии рекомбинантного белка;2. Проверить pH всех буферов для очистки белка;3. Перезарядить сефарозу для очистки
Плохое разрешения геля у белкового электрофореза	Проверить pH гелей и буфера для электрофореза
Грязный гель после окраски серебром	<ol style="list-style-type: none">1. Использовать высокоочищенную воду;2. Все манипуляции проводить в перчатках

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1) Великов В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство: Учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. нано- и биомед. технол., обуч-ся по напр. «Биология (020400)», «Биология-пед (050100)», «Биотехнические системы и технологии (200100)», «Медицинская физика (011200)» и по спец. «Биоинженерия и биоинформатика (020501)». – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. – 84 с.: ил.
- 2) Blum, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels [Text] / H. Blum, H. Beier, H. J. Gross // Electrophoresis. – 1987. – V. 8. – №2. – P. 93-99.
- 3) Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [Text] / M. Bradford // Anal Biochem. – 1976. – V. 7 (72). – P. 248-254.
- 4) Classic cloning with pASK-IBA, pPR-IBA and pEXPR-IBA vectors. General protocol.
- 5) Laemmli, U. K. Denaturing (SDS) discontinuous gel electrophoresis [Text] / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680-685.
- 6) pET system manual. TB055 10th edition Rev.B 0403. Novagen, 2003.
- 7) Protein expression handbook. Recombinant protein expression and purification technologies. ThermoFisher scientific, 2015.
- 8) Strep-tagged protein purification handbook. Second edition. Qiagen, 2007.
- 9) Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual [Text] / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Laboratory Press. –1989.
- 10) The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.