

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра биохимии

АНДРОНОВА
Вероника Павловна

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОАНТИТЕЛ,
СВЯЗЫВАЮЩИХ АПОЦИТОХРОМ B562RIL (BRIL), ДЛЯ
СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ**

Дипломная работа

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
Д.О. Дормешкин

Допущен к защите
«__» _____ 2022 г.
Зав. кафедрой биохимии

кандидат биологических наук, доцент
_____ И.В. Семак

Минск, 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 60с., 13 рис., 1 табл., 145 источников.

GPCR, моноклональные антитела, апоцитохром b562RIL, рекомбинантные белки, фаговый дисплей, трансформация, лигирование, электрофорез, экспрессия, металл-аффинная хроматография, MALDI-TOF, иммуноферментный анализ, вестерн-блоттинг, *Escherichia coli*.

Объект исследования: рекомбинантные моноклональные антитела к термостабилизированному апоцитохрому b562RIL (BRIL).

Цель: получение и характеристика наноантител, связывающих апоцитохром b562RIL (BRIL), для структурных исследований мембранных белков.

Методы исследования: спектрофотометрический метод количественного определения белков и полинуклеотидов, секвенирование ДНК, электрофорез в агарозном и полиакриламидном гелях, вестерн-блоттинг, моно-, поликлональный и конкурентный иммуноферментный анализ, металл-аффинная хроматография, MALDI-TOF масс-спектрометрия, анализ кинетики взаимодействия антител, фаговый дисплей.

С помощью технологии фагового дисплея производился отбор и амплификация специфичных клонов к BRIL. Для характеристики данных клонов были проведены моноклональный, поликлональный и конкурентный иммуноферментные анализы.

В ходе проведения моноклонального иммуноферментного анализа было обнаружено, что в фаговом пуле смеси библиотек VHH4-B, VHH4-G, VHH4-D присутствуют клоны антител, обладающие высокими показателями связывания BRIL.

Клоны были ранжированы по значению константы скорости диссоциации методом иммуноферментного анализа.

В результате работы, путем гетерологической экспрессии и последующей хроматографической очистки было наработано в препаративных количествах высокоаффинное антитело к мишени BRIL.

Был произведен анализ кинетики взаимодействия полученного антитела и антигена. Константа диссоциации равняется 19 нМ.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 60 с., 13 мал., 1 табл., 145 крыніц.

GPCR, монакланальныя антыцелы, апацытахром b562RIL, рэкамбінантныя бялкі, фагавы дысплей, трансфармацыя, лігіраванне, электрафарэз, экспрэсія, метал-афінная храматаграфія, MALDI-TOF, імунаферментны аналіз, вестэрн-блотынг, *Escherichia coli*.

Аб'ект даследавання: рэкамбінантныя монакланальныя антыцелы да тэрмастабілізаванага апацытахрома b562RIL (BRIL).

Мэта: атрыманне і характарыстыка нанаантытэляў, якія звязваюць апацытахром b562RIL (BRIL), для структурных даследаванняў мембранных бялкоў.

Метады даследавання: спектрафотометрычны метады колькаснага вызначэння бялкоў і полінуклеатыдаў, секвеніраванне ДНК, электрафарэз у агарозным і поліакрыламідным гелях, вестэрн-блотынг, мона-, палікланальны і канкурэнтны імунаферментны аналіз, метал-афінная храматаграфія, MALDI-TOF мас-спектраметрыя, аналіз кінетыкі ўзаемадзеяння антыцелаў, фагавы дысплей.

З дапамогай тэхналогіі фагавога дысплея праводзіўся адбор і ампліфікацыя спецыфічных клонаў да BRIL. Для характарыстыкі дадзеных клонаў былі праведзены монакланальны, палікланальны і канкурэнтны імунаферментныя аналізы.

У ходзе правядзення монакланальнага імунаферментнага аналізу было выяўлена, што ў фагавым пуле сумесі бібліятэк VHH4-B, VHH4-G, VHH4-D прысутнічаюць клоны антыцелаў, якія валодаюць высокімі паказчыкамі звязвання BRIL.

Клоны былі ранжыраваць па значэнні канстанты хуткасці дысацыяцыі метадам імунаферментнага аналізу. У выніку працы, шляхам гетэралагічнай экспрэсіі і наступнай храматаграфічнай ачысткі было атрымана высокаафіннае антыцела да мішэні BRIL.

Быў зроблены аналіз кінетыкі ўзаемадзеяння атрыманага антыцелы і антыгена. Канстанта дысацыяцыі складае 19 нМ.

ABSTRACT

Thesis 60 p., 13 figures, 1 tables, 145 sources.

GPCR, monoclonal antibodies, apocytochrome b562RIL, recombinant proteins, transformation, ligation, electrophoresis, expression, metal affinity chromatography, MALDI-TOF, ELISA, Western blotting, *Escherichia coli*.

Subject of research: recombinant monoclonal antibodies to heat-stabilized apocytochrome b562RIL (BRIL).

Purpose: generation and characterization of nanoantibodies binding apocytochrome b562RIL (BRIL) for structural studies of membrane proteins.

Research methods: spectrophotometric method for the quantitative determination of proteins and polynucleotides, DNA sequencing, agarose and polyacrylamide gel electrophoresis, Western blotting, ELISA, metal affinity chromatography, MALDI-TOF mass spectrometry, analysis of antibody interaction kinetics, phage display.

Phage display technology was used to select and amplify specific clones for BRIL. Monoclonal, polyclonal and competitive enzyme immunoassays were performed to characterize these clones.

During the monoclonal enzyme immunoassay, it was found that in the phage pool of the mixture of libraries VHH4-B, VHH4-G, VHH4-D there are antibody clones with high rates of BRIL binding.

The clones were ranked according to the value of the dissociation rate constant by enzyme immunoassay..

As a result of the work, a high-affinity antibody to the BRIL target was obtained by heterological expression and subsequent chromatographic purification.

An analysis was made in order to determine kinetics of the interaction of the obtained antibody and antigen. The dissociation constant is 19 nM.