

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра молекулярной биологии

Аннотация к магистерской диссертации

ДУБКОВ
Никита Анатольевич

**ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ,
ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *E.coli*,
РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Научный руководитель:
Счесленок Елена Павловна
кандидат биологических наук

Минск, 2014

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Ключевые слова: МЕТАЛЛХЕЛАТНАЯ АФФИННАЯ ХРАМАТАГРАФИЯ, ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ, РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПОЛИПЕПТИД, ИСКУССТВЕННЫЙ АНТИГЕН, ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, ИММУНОБЛОТТИНГ, ОЧИСТКА БЕЛКОВ

Работа содержит 53 стр., 18 рис., 3 табл., 26 литературных источника.

Целью данной работы было получение высокоочищенных препаратов рекомбинантных полипептидов с использованием различных видов жидкостной хроматографии на автоматическом хроматографе ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare).

Использование рекомбинантных полипептидов в иммунобиологических тест-системах в качестве антигенов, а также для иммунизации животных с целью получения специфических антител предполагает чрезвычайно высокие требования к их степени очистки для достижения высокой специфичности и повышения чувствительности диагностикумов. Жидкостная хроматография представляет группу методов, способных обеспечить требуемую степень чистоты. В качестве объектов в данной работе использовались рекомбинантные полипептиды, содержащие антиген-значимые участки нуклеокапсидных белков вирусов Пуумала и Марбург. Данные полипептиды кодируются рекомбинантными экспрессирующими плазмидами, полученными на основе вектора рJС40. Данный вектор кодирует последовательность из десяти остатков гистидина на N-конце химерного белка, что позволяет очищать рекомбинантные полипептиды методом металлхелатной аффинной хроматографии.

Был проведен сравнительный анализ эффективности очистки рекомбинантного полипептида вируса Пуумала в нативных и денатурирующих условиях методом металлхелатной хроматографии. Было показано, что в денатурирующих условиях происходит более высокая степень очистки и выхода рекомбинантного полипептида. Использование двухэтапной схемы очистки (металлхелатная аффинная хроматография – гель-фильтрация) позволило получить высокоочищенные препараты рекомбинантных полипептидов в препаративных количествах.

Агульная характарыстыка работы

Ключавыя словы: МЕТАЛХЕЛАТНАЯ АФФІННАЯ ХРАМАТАГРАФІЯ, ГЕЛЬ-ФІЛЬТРАЦІЯ, РЭКАМБІНАНТНЫЯ ПОЛІПЕПТЫДЫ, ШТУЧНЫ АНТИГЕН, ІММУНАФЕРМЕНТЫ АНАЛІЗ, ІММУНАБЛОТІНГ, ЧЫСТКА БЯЛКОЎ

Работа утрымлівае 53 старонкі, 18 малюнкаў, 3 табліцы, 26 літаратурныя крыніцы.

Мэтай дадзенай працы было атрыманне высокачышчаных прэпаратаў рэкамбінантных поліпептыдаў с выкарыстаннем розных відаў ваткаснай храматаграфіі на аўтаматычным храматографе ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare).

Выкарыстанне рэкамбінантных поліпептыдаў у імунабіялагічных тэст-сістэмах у якасці антыгенаў, а таксама для імунізацыі жывелін з мэтай атрымання спецыфічных антыцел абумоўлівае найвышэйшыя патрабаванні к ступені іх чысціні для дасягнення высокай спецыфічнасці і адчувальнасці. Ваткасная храматаграфія пардстаўляе метады, які можа забяспечыць патрабаваную ступень чысціні.

У якасці аб'ектаў у дадзенай працы выкарыстоўваліся рэкамбінантныя поліпептыды, змяшчаючыя антыгенныя часткі нуклеакапсідных бялкоў вірусаў Пуумала і Марбург. Дадзеныя поліпептыды кадзіруюцца, рэкамбінантнымі экспрэсіруючымі вектарамі, атрыманымі на аснове вектара рJС40. Дадзены вектар кадзіруе паслядоўнасць з дзесяці рэшткаў гісцидзіну на N-канцы хімернага бялку, што дазваляе чысціць рэкамбінантныя поліпептыды метадамі металахелатнай аффіннай храматаграфіі.

Быў праведзены параўнальны аналіз эфектыўнасці чысткі рэкамбінантнага поліпептыда віруса Пуумала ў натыўных і дэнатурыруючых умовах метадамі металахелатнай храматаграфіі. Было паказана, што ў дэнатурыруючых умовах атрымліваецца больш высокая ступень чысціні і выхад рэкамбінантнага поліпептыда.

Выкарыстоўваючы двухступенчатую схему чысткі (металахелатная аффінная храматаграфія – гель-фільтрацыя) былі атрыманы высокачыстыя прэпараты рэкамбінантных поліпептыдаў у прэпаратывальных колькасцях.

Resume of the paper

IMMOBILIZED AFFINITY CHROMATOGRAPHY, GEL-FILTRATION, RECOMBINANT POLYPEPTIDES, SYNTHETIC ANTIGENS, ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, IMMUNOBLOTTING, PROTEIN PURIFICATION

Master's thesis contains 53 pages, 18 pictures, 3 tables, 26 sources

The purpose of the study was to obtain the highly-purified samples of recombinant polypeptides using different methods of liquid chromatography on automated chromatographic system ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare).

Employing of recombinant polypeptides as antigens in immunobiological test-system or for antibody production put forth very strict requirements for the levels of purity to achieve high levels of sensitivity and specificity. Liquid chromatography represents a broad group of methods, which can reach desired purity level.

Recombinant polypeptides containing antigen sites of nucleocapsid proteins of Puumala and Marburg viruses were used as objects of research in this study. These polypeptides are encoded by recombinant expressing vectors obtained on the basis of pJC40 vector. This vector encodes the sequence of ten histidine residues on N-terminus of the fusion protein, which allows purifying such proteins by the means of IMAC.

Analyses were performed to compare the effectiveness of purifying of protein Puumala virus protein in native and denaturated conditions utilizing the method of IMAC. It was shown far higher levels of purity utilizing denaturated conditions. Using two-step purification scheme (IMAC – Gel-filtration) , highly purified recombinant polypeptides were obtained in preparative values.