

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии**

ИВАНОВА Ольга Григорьевна

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ, ОЧИСТКИ И
РЕФОЛДИНГА РЕКОМБИНАНТНОГО СТАФИЛОКОККОВОГО
ЭНДОЛИЗИНА K (Lys K) ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ *E. COLI***

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
младший научный сотрудник
А.В. Жидецкий

Минск, 2017

АННОТАЦИЯ

Данная работа состоит из 52 страницы, и содержит 18 иллюстраций, 9 таблиц и 23 источника литературы.

Настоящая работа посвящена оптимизации условий выделения, очистки и рефолдинга рекомбинантного стафилококкового эндолизина K (Lys K) из телец включения *E.coli*, что соответствует цели данной работы. Данный фермент имеет широкий спектр литической активности в отношении клинически значимых стафилококков и имеет ряд преимуществ по сравнению с антибиотиками.

На основании цели данной работы были поставлены следующие задачи:

1. Найти оптимальный состав растворов для отмывки телец включения;
2. Создать оптимальную систему солюбилизации телец включения;
3. Определить условия и оценить эффективность применения ионообменной хроматографии для очистки целевого белка от примесных соединений;
4. Провести скрининг условий рефолдинга рекомбинантного белка LysK методом разведения;
5. Разработать подход и провести рефолдинг LysK на матрице ионообменного сорбента;
6. Сравнить эффективность различных методов рефолдинга на основе выхода целевого продукта.

В результате проделанной работы была подобрана оптимальная система отмывки и солюбилизации телец включения, разработана методика очистки целевого продукта от примесных белков и нуклеиновых кислот, а также определены оптимальные условия основных характеристик ренатурирующего буфера с проведением последующего рефолдинга. Таким образом получен рекомбинантный эндолизин K, обладающий антистафилококковой активностью в размере 1ед/1мкг, которая соответствует активности нативного фермента.

**МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЎНІВЕРСІТЭТ
БІЯЛАГІЧНЫ ФАКУЛЬТЭТ
Кафедра мікрабіялогіі**

ІВАНОВА Вольга Рыгораўна

**АПТЫМІЗАЦЫЯ ЎМОЎ ВЫДЗЯЛЕННЯ, АЧЫСТКІ І
РЭФОЛДЫНГА РЭКАМБІНАНТНАГА СТАФІЛАКОКАВАГА
ЭНДАЛІЗІНА К (LYS K) З ЦЯЛЕЦ УКЛЮЧЭННЯ *E.COLI***

Анатацыя да дыпломнай працы

Навуковы кіраўнік:
малодшы навуковы
супрацоўнік А.В. Жыдзецкі

Мінск, 2017

АНАТАЦЫЯ

Дадзеная праца складаецца з 52 старонак, і змяшчае 18 ілюстрацый, 9 табліц і 23 літаратурыя крыніцы.

Сапраўдная праца прысвечана аптымізацыі ўмоў выдзялення, ачысткі і рэфолдынга рэкамбінантнага стафілакокавага эндалізіна K (Lys K) з цялец уключэння *E.coli*, што адпавядае мэце працы. Дадзены фермент мае шырокі спектр літычнай актыўнасці ў дачыненні да клінічна значных стафілакокаў, і мае шэраг пераваг у параўнанні з антыбіётыкамі.

На падставе мэты дадзенай працы былі пастаўлены наступныя задачы:

1. Знайсці аптымальны склад раствораў для адмыўкі цялец уключэння;
2. Стварыць аптымальную сістэму салюбілізацыі цялец уключэння;
3. Вызначыць умовы і ацаніць эфектыўнасць прымянення іонаабменнай храматаграфіі для ачысткі мэтавага бялка ад прымясных злучэнняў;
4. Правесці скрынінг умоў рэфолдынга рэкамбінантнага бялка LysK метадам развядзення;
5. Распрацаваць падыход і правесці рэфолдынг LysK на матрыцы іонаабменнага сарбента;
6. Параўнаць эфектыўнасць розных метадаў рэфолдынга на аснове выхада мэтавага прадукта.

У выніку праведзенай работы была падобрана аптымальная сістэма адмыўкі і салюбілізацыі цялец уключэння, распрацавана метадыка ачысткі мэтавага прадукту ад прымесных бялкоў і нуклеінавых кіслот, а таксама вызначаны аптымальныя ўмовы асноўных характарыстык рэнатурыруючага буфера з правядзеннем наступнага рэфолдынга. Такім чынам, атрыманы рэкамбінантны эндалізін K, які валодае антыстафілакокавай актыўнасцю ў памеры 1 адз/ 1 мкг, што адпавядае актыўнасці натыйнага фермента.

**MINISTRY OF EDUCATION REPUBLIC OF BELARUS
BELARUSIAN STATE UNIVERSITY
BIOLOGICAL FACULTY
Microbiology department**

IVANOVA Olga Grigorievna

**OPTIMIZATION OF ISOLATION, PURIFICATION AND
REFOLDING CONDITIONS OF THE RECOMBINANT
STAPHYLOCOCCAL ENDOLYSIN K (LYS K) FROM E. COLI
INCLUSION BODIES**

Annotation to the thesis work

Supervisor:
junior researcher A. Zhydzetski

Minsk, 2017

ANNOTATION

The paper consists of 52 pages, and contains 18 illustrations, 9 tables and 23 literature sources.

The present work is devoted to optimization of isolation, purification and refolding conditions of the recombinant staphylococcal endolysin K (Lys K) from *E. coli* inclusion bodies, which corresponds to the aim of the work. This enzyme has a wide range of lytic activity against clinically significant staphylococci and has several advantages of antibiotics.

The following tasks were set based on the aim of the work:

1. To find the optimal solution composition for washing the inclusion bodies;
2. To develop an optimal system for solubilization of inclusion bodies;
3. To determine the conditions and evaluate the effectiveness of ion exchange chromatography for purification of the target protein from impurity compounds;
4. To carry out the screening of LysK refolding conditions by dilution method;
5. To develop approach and carry out LysK refolding on the matrix of ion-exchange resin;
6. To compare the effectiveness of various refolding methods on the basis of the target protein yield.

As a result of the work done an optimal system for inclusion bodies washing and solubilization was selected. The method of purifying the target product from impurity proteins and nucleic acids was developed, as well as optimal conditions of the main renaturing buffer characteristics were determined, followed by LysK refolding. Thus, the recombinant endolysin K possessing an antistaphylococcal activity in the amount of 1 U/ 1 mkg is obtained, which corresponds to the activity of the natively folded enzyme.