

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии

ПЕРМЯКОВА
Виктория Ильинична

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА БЫЧЬЕГО
ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА 2
В КЛЕТКАХ *E. COLI*

АННОТАЦИЯ
к дипломной работе

Научный руководитель:
зав. НИЛ биотехнологии кафедры
микробиологии БГУ
Потапович М.И.

Минск, 2017

АННОТАЦИЯ

Дипломная работа 63 страницы, 3 таблицы, 19 рисунков, 33 источника.

ЦИТОКИНЫ, ЦИТОКИНОВАЯ ТЕРАПИЯ, КЛЕТКИ КРОВИ, КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР, ФАКТОР РОСТА, ГЕМОПОЭЗ, СТВОЛОВАЯ КРОВЕТВОРНАЯ КЛЕТКА (СКК), КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩАЯ ЕДИНИЦА (КОЕ), ГРАНУЛОЦИТ, МАКРОФАГ, ИММУНОТЕРАПИИ, ВЕТЕРИНАРИЯ, БЫК, *E. COLI*, КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ.

Объект исследования: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор 2 быка.

Цель работы: клонирование и экспрессия гена бычьего гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора 2 в клетках *E.coli*.

Методы исследования: электрофорез в агарозном геле, описанный в руководстве Маниатиса, кальциевая трансформация бактерий плазмидной ДНК и амплификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по стандартной методике, рестрикция ДНК и лигирование с использованием ферментов и буферных систем фирмы «Thermo Scientific», индукция при помощи набора реактивов QIAprep®Spin Miniprep Kit (Qiagen), белковый электрофорез в ПААГ.

Полученные результаты. В ходе проделанной работы был получен экспрессионный вектор на основе плазмиды pET24b(+), содержащий в составе последовательность гена бычьего GM-CSF-2, который затем клонирован в клетках *E. coli* BL21 Gold и *E. coli* CodonPlus(DE3)-RIPL. Создана гибридная конструкция pET24-bovine-CSF-2-CBM, содержащая последовательность гена бычьего GM-CSF-2 и целлюлозосвязывающего домена (CBM), которой были трансформированы штаммы *E. coli* BL21 Gold и *E. coli* CodonPlus(DE3)-RIPL. После проведенной индуцибельной экспрессии было установлено, что белковый продукт, который накапливается в клетках бактерий при 42°C соответствует размеру бычьего GM-CSF-2, но экспрессия при повышенных температурах в используемой системе требует дальнейшего изучения. Не удалось получить рекомбинантный GM-CSF-2, в системе экспрессии на основе штаммов *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL и BL21 Gold и вектора pET24b. На основании полученных результатов можно сказать, что вероятно целесообразным решением проблемы будет использование другой системы экспрессии для получения рекомбинантного GM-CSF-2.

МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЎНІВЕРСІТЭТ
БІЯЛАГІЧНЫ ФАКУЛЬТЭТ
Кафедра мікрабіялогіі

ПЕРМЯКОВА
Вікторыя Ільвічна

**КЛОНАВАННЕ І ЭКСПРЭСІЯ ГЕНА ГРАНУЛАЦЫТАРНА-
МАКРАФАГАЛЬНАГА КАЛОНІЕСТЫМУЛЯЦЫЙНАГА ФАКТАРУ 2
БЫКА Ў КЛЕТКАХ *E. COLI***

АНАТАЦЫЯ
да дыпломнай працы

Навуковы кіраўнік:
загадчык НДЛ біятэхналогіі кафедры
мікрабіялогіі БДУ
Патаповіч.М.І.

Мінск, 2017

АНАТАЦЫЯ

Дыпломная праца 63 старонкі, 3 табліцы, 19 малюнкаў, 33 крыніцы.

ЦЫТАКІНЫ, ЦЫТАКІНАВАЯ ТЭРАПІЯ, КЛЕТКІ КРЫВІ, КАЛОНИЕСТЫМУЛЯЦЫЙНЫ ФАКТАР, ФАКТАР УЗРОСТУ, ГЕМАПАЭЗ, СТВАЛОВАЯ КРЫВЯТВОРНАЯ КЛЕТКА (СКК), КАЛОНИЕСТЫМУЛЯЦЫЙНАЯ АДЗІНКА (КАА), ГРАНУЛАЦЫТ, МАКРАФАГ, ІМУНАТЭРАПІЯ, ВЕТЭРЫНАРЫЯ, БЫК, *E. COLI*, КЛАНАВАННЕ, ЭКСПРЭСІЯ.

Аб'ект даследавання: гранулацытарна-макрафагальны калоніестымуляцыйны фактар 2 быка.

Мэта працы: кланаванне і экспрэсія гена гранулацытарна-макрафагальнага калоніестымуляцыйнага фактару 2 быка ў клетках *E.coli*.

Метады даследавання: электрафарэз у агарозавым гелі, апісаны ў кіраўніцтве Маніатіс, кальцыевая трансфармацыя бактэрыі плазмідай ДНК і ампліфікацыя фрагментаў ДНК метадам палімеразнай ланцуговай рэакцыі (ПЛР) па стандартнай методыцы, рэстрыкцыя ДНК і лігаванне з выкарыстаннем ферментаў і буферных сістэм фірмы «Thermo Scientific», індукцыя з дапамогай набору рэактываў QIAprep®SpinMiniprepKit (Qiagen), бялковы электрафарэз у ПААГ, лізіс бактэрыіных клетак з выкарыстаннем рэактываў набору B-PER® Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific).

Атрыманыя вынікі. У ходзе праведзенай працы быў атрыманы экспрэсіённы вектар на грунце плазміды pET-24b(+), які змяшчае ў складзе паслядоўнасць гена бычынага GM-CSF-2, які затым быў кланаваны ў клетках *E. coli* BL21 Gold і *E. coli* CodonPlus(DE3)-RIPL. Створана гібрыдная канструкцыя pET24-bovine-CSF-2 і целюлозаслучанага дамена CBM, якой былі трансфармаваны штамы *E. coli* BL21 Gold і *E. coli* CodonPlus(DE3)-RIPL. Пасля праведзенай індукцыйнай экспрэсіі было ўсталявана, што бялковы прадукт, які запасіцца ў клетках бактэрыі пры 42 °С адпавядае бычынаму гранулацытарна-макрафагальнаму калоніестымуляцыйнаму фактару 2, але экспрэсія пры павышаных тэмпературах у выкарыстыванай сістэме патрабуе далейшага вывучэння. Не атрымалася атрымаць рэкамбінантны GM-CSF-2, у сістэме экспрэсіі на аснове штамаў *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL і BL21 Gold і вектару pET24b. На падставе атрыманых вынікаў магчыма казаць, што верагодным рашэннем праблемы будзе выкарыстанне іншай сістэмы экспрэсіі для атрымання рэкамбінантнага GM-CSF-2.

MINISTRY OF EDUCATION OF THE REPUBLIC OF BELARUS
BELARUSIAN STATE UNIVERSITY
BIOLOGICAL FACULTY
Department of microbiology

Permiakova
Victoria. Ilinichna

**CLONING AND EXPRESSION OF THE GENE BOVINE
GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING
FACTOR 2 IN *E. COLI* CELLS**

ANNOTATION
to the thesis work

Scientific supervisor:
Head of the Laboratory of
Biotechnology
Potapovich.M.I

Minsk, 2017

ANNOTATION

Graduate work 63 pages, 3 tables, 19 figures, 33 sources.

CYTOKINES, CYTOKINE THERAPY, BLOOD CELL, COLONY-STIMULATING FACTORS, GROWTH FACTORS, HEMATOPOIESIS STEM HEMOPOIETIC CELL (SHC), COLONY STIMULATING UNIT (CSU), GRANULOCYTE, MACROPHAGE IMMUNOTHERAPY, VETERINARIANS, *BOSTAURUS*, *E. COLI*, CLONING, EXPRESSION.

The object of study: bovine granulocyte-macrophage colony stimulating factor 2.

Objective: Cloning and expression of the gene bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 2 in *E. coli* cells.

Methods: agarose gel electrophoresis as described in the manual of Maniatis, calcium transformation of bacteria with plasmid DNA and amplification of DNA fragments by polymerase chain reaction (PCR) according to standard procedures, DNA restriction and ligation using enzymes and buffers company systems «Thermo Scientific», by means of induction QIAprep®SpinMiniprepKit reagent kit (Qiagen), protein electrophoresis in SDS, lysis of bacterial cells using a reagent kit B-PER® bacterial protein Extraction reagent (Thermo Scientific).

Results. As the result of this work the expression pET-24b (+)-based vector coding the bovine GM - CSF-2 was constructed, it was cloned into the cells of *E. coli* BL21 Gold and *E. coli* CodonPlus (DE3) -RIPL then. Also the hybrid construction coding bovine CSF-2 fused with cellulose-binding module (CBM) was created, it was cloned into the cells of *E. coli* BL21 Gold and *E. coli* CodonPlus (DE3) -RIPL. After the inducible expression experiments it was established that the protein product size that accumulates in the bacterial cells at 42°C corresponds to the size of the bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 2, but the expression at elevated temperatures in the system used requires further study. It was not possible to obtain recombinant GM-CSF-2 in the expression system based on *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL and BL21 Gold strains and the vector pET24b. Based on the results obtained, it can be concluded that the use of another expression system for the production of recombinant GM-CSF-2 is probably to be an appropriate solution.