

6. не только знать общепринятые методы статистического анализа результатов исследования, но и уметь их доходчиво объяснить школьникам;

7. четко знать критерии оценивания работы и сроки ее представления на конкурс или конференцию. Различные конференции и конкурсы, на которых ученики представляют полученные результаты исследований, имеют свои требования по оформлению и представлению результатов, что заставляет ученика каждый раз при подаче заявки на различные конкурсы заново корректировать свою работу.

8. Исследуя мир вместе со школьниками, мы открываем новые горизонты знаний и для себя, и для своих учеников. И кто знает, может именно наш ученик впоследствии совершит великое открытие, которое потрясет весь мир!

Литература

1. Другакова А. Д., Минец М. Л. Научно-исследовательская работа школьников: проблемы и перспективы // Сб. работ 70-ой науч. конф. студентов и аспирантов БГУ, 2013. Ч. 1. С. 14–18
2. Лысак В. В., Желдакова, Р. А. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов. Мн.: БГУ, 2002.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭКТОДОМЕНА ЭФРИНОВОГО РЕЦЕПТОРА ТИПА A5 (ECD EphA5) ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ *E.coli*

А. В. Жидецкий

В последнее время отмечается повышенный интерес к изучению эфринных рецепторов (Eph) и их лигандов эфринов в качестве объектов для целевой терапии заболеваний, ассоциированных с данным типом белков. Eph и их лиганды являются представителями семейства рецепторов тирозинкиназ. У млекопитающих обнаружено 14 типов эфринных рецепторов, подразделяющихся на две группы, семейства EphA (EphA1-A8 и A10) и EphB (EphB1-4 и EphB6). Аналогичным образом выделяют 2 класса эфринных лигандов: класс-А, включающий 5 типов (ephrinA1-A5), и класс-В (ephrinB1-B3) [1]. Сигнальные пути, осуществляющие свой механизм через эфринные рецепторы и их мембраносвязанные лиганды, участвуют в регуляции многих биологических процессов и поведения клеток, как во время эмбрионального периода развития, так и во взрослом организме. Помимо экспрессии в здоровых клетках, данный тип рецепторов широко представлен на поверхности опухолевых клеток большинства типов новообразований, а также в патологических клетках, не связанных с малигнизацией [2].

Понимание механизмов функционирования и возможность регуляции данных рецепторов требует всестороннего изучения их структуры, свойств и поведения, в том числе на моделях *in vitro*. Однако, при изучении интересующего белка исследователь сталкивается со множеством трудностей, главной из которых является получение данного белка в необходимых количествах. Связано это в первую очередь либо со сложностью технологии выделения и очистки, либо его низким содержанием в изучаемом объекте. Одной из наиболее широко применяемых стратегий при получении необходимых белков в препаративных количествах является способ экспрессии последних штаммами-продуцентами. Однако, большинство экспрессируемых белков накапливаются в тельцах включения (ТВ), что требует разработки уникальных протоколов и методов солиubilизации, очистки и рефолдинга целевого продукта.

Данная работа посвящена оптимизации условий выделения и очистки рекомбинантного ECD EphA5 из телец включения *E. coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Система экспрессии рекомбинантного белка. Для получения препаративных количеств рекомбинантного эктодомена рецептора Eph-A5 использовалась система экспрессии на основе штамма *E. coli* Origami B (DE3). Штамм *E. coli*, содержащий конструкцию на основе плазмиды рEX32 для экспрессии рекомбинантного эфрина A5, включающего кроме белковой части целевого продукта тиоредоксиновый фрагмент, (His)₆-Tag и сайт разрезания для тромбина, был разработан в биотехнологическом центре в городе Турку (Финляндия) и любезно предоставлен Ю.-П. Химаненом.

Солюбилизация белков из телец включения. Тельца включения растворяли в 5 ммоль/л Tris-HCl буфере с pH 8,0, содержащем 500 ммоль/л NaCl и хаотропные агенты: гуанидингидрохлорид 0–6 моль/л и мочевины 0–8 моль/л.

Гель-фильтрационная хроматография. Для перевода солиubilизированных телец включения в соответствующий буфер, для проведения дальнейших этапов очистки и измерения концентрации белка, применялась гель-фильтрация на сефадексе G-25.

Металл-хелатная хроматография на Ni-сефарозе. Связывание (His)₆-Tag присутствующего в структуре рекомбинантного белка, осуществлялось на колонке HiTrap IMAC HP с Ni-сефарозой. Колонку предварительно уравнивали буфером следующего состава: 50 ммоль/л Tris-HCl, pH 8,0, 500 ммоль/л NaCl, 20 ммоль/л имидазол. ECD EphA5 с (His)₆-Tag связывался с сорбентом и затем элюировался линейным градиентом концентрации имидазола от 20 ммоль/л до 500 ммоль/л.

Ионообменная хроматография. Процесс очистки целевого продукта от примесных белков и нуклеиновых кислот проходил с использованием катионообменника Toyopearl SP 550С.

Определение количества белка. Количество белка на всех стадиях определяли методом Лоури в модификации Петерсона [3]

SDS-электрофорез в полиакриламидном геле. Чистоту белковых фракций и локализацию белка оценивали методом SDS-электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле по стандартной методике [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения оптимальных условий экстракции белков из телец включения одинаковые по массе навески последних растворяли в системах солиubilизации на основе Tris-HCl буфера с pH 8,0, содержащих мочевины или гуанидингидрохлорид в концентрациях 0–8 моль/л и 0–6 моль/л соответственно. После солиubilизации ТВ экстракт центрифугировали для отделения нерастворенных агрегатов. Далее измеряли содержание белка в супернатанте и осадке опцентрифугированного экстракта.

Показано, что наиболее полная экстракция белка из ТВ происходит в 6 моль/л и 8 моль/л мочевины, в то время как в гуанидингидрохлориде те же значения достигаются при его концентрации 6 моль/л (Таблица).

Таблица 1

Степень экстракции телец включения в зависимости от системы растворения

Система солиubilизации	Концентрация белка, мг/мл	Выход белка, %
5 мМ Трис-HCl, 0,5 М NaCl	0,08	5,5
2 М мочевина	0,24	15,9
4 М мочевина	1,15	76,4
6 М мочевина	1,33	88,9
8 М мочевина	1,44	95,7
2 М гуанидингидрохлорид	0,22	14,8
4 М гуанидингидрохлорид	0,53	35,1
6 М гуанидингидрохлорид	1,4	92,1

Для дальнейшей очистки была выбрана система солиubilизации на основе 8 ммоль/л мочевины с добавлением β-меркаптоэтанола для разрыва меж- и внутримолекулярных дисульфидных связей и глицил-глицина для защиты белковой молекулы от реакций карбомиэлирования циановой кислотой, присутствующей в растворах мочевины [5].

Благодаря наличию в структуре полипептидной цепи фрагмента (His)₆-Tag, основным методом очистки от примесей данных рекомбинантных белков является применение металл-хелатной хроматографии на Ni-сефарозе [6]. Сильное сродство остатков гистидина к ионам Ni²⁺ позволяет очистить целевой продукт, имеющий 6 дополнительных

остатков данной аминокислоты, от примесных белков. Последние элюируются низкими концентрациями имидазола, в то время как (His)₆-белки элюируются высокими концентрациями данного соединения.

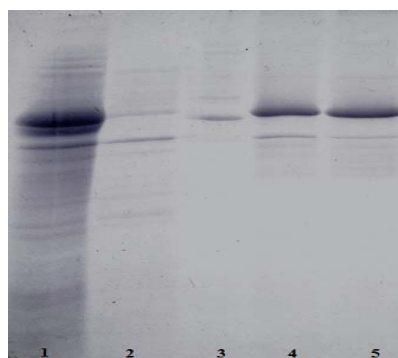


Рис. 1. Электрофореграмма ECD EphA5 после проведения одностадийного процесса очистки и рефолдинга на HiTrap IMAC HP Ni-сефарозе

SDS-электрофорез проведен в 12,5 %-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (окрашивание Coomassie BB R-250)

1 – Образец после солиubilизации телец включения, 2 – Образец, не связавшийся с Ni-сефарозой (фракция 16), 3 – Образец, не связавшийся с Ni-сефарозой (фракция 43), 4 – Элюция с Ni-сефарозы линейным градиентом имидазола (фракция 53), 5 – Элюция с Ni-сефарозы линейным градиентом имидазола (фракция 59)

Для очистки целевого продукта от нуклеиновых кислот (НК) (рисунок 2) была применена ионообменная хроматография на катионообменнике Toyopearl SP 550C. В результате удалось избавиться от данного типа примесей, о чём можно судить по поглощению НК при 260 нм и максимуму поглощения целевого продукта при 280 нм после его элюции с сорбента линейным градиентом NaCl.

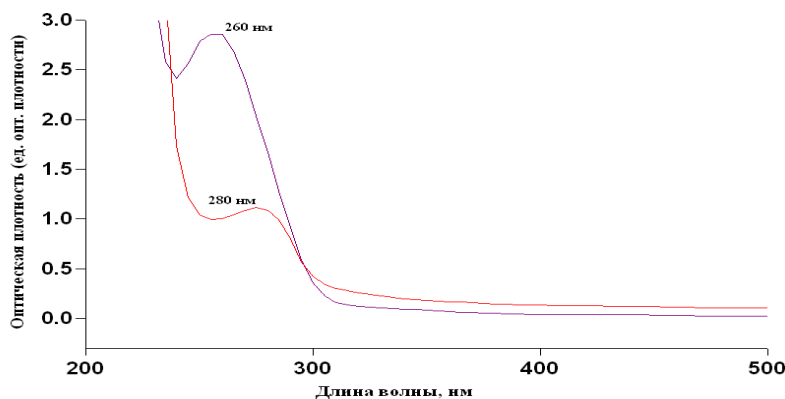


Рис. 2. Спектры поглощения фракций образца, не связавшегося с сорбентом (260 нм) и элюции (280 нм) после проведения ИОХ на Toyopearl SP 550C

ВЫВОДЫ

Определена оптимальная система солиubilизации для достижения максимальной экстракции белка из телец включения. Установлено, что применение двух последовательных этапов очистки на Ni-сефарозе и ка-

тионообменнике Toyopearl SP 550C позволяет получить высокоочищенный рекомбинантный эктодомен EphA5.

Литература

1. Pasquale E. B. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behavior // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2005. Vol. 6. P. 462–475.
2. Himanen J.P., Nikolov D.B. Eph signaling: a structural view // *Trends Neurosci.* 2003. Vol. 26. P. 46–51.
3. Protein electrophoresis: applications guide: Hoefer scientific instruments, 1994. P. 17–25.
4. Peterson G.L. Determination of total protein // *Methods in enzymology.* 1983. Vol. 91. P. 95–119.
5. Stark G.R. Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins // *J. Biological chemistry.* 1960. Vol. 235, № 11. P. 3177–3181.
6. Recombinant protein purification handbook: Principles and methods // GE Healthcare. Sweden, 2006. Ch. 1. P. 9–12.

СТРУКТУРА И ДИНАМИКА СООБЩЕСТВ ЖУЖЕЛИЦ РОДА CARABUS L. ХВОЙНЫХ МАССИВОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ БЕЛАРУСИ

Ю. В. Ключенович, А. А. Литвинок, М. Л. Минец

Сосновые леса Беларуси занимают 57,7 % всей лесопокрытой площади Беларуси. Наибольшее распространение имеют сосняки мшистые (42,2 %), реже встречаются вересковые (19,7 %) и еще реже – черничные (12,7 %). Леса с преобладанием ели обыкновенной занимают меньшую площадь (9,6 % лесопокрываемой территории).

Жужелицы (Coleoptera, Carabidae) и в частности представители рода *Carabus* являются наиболее распространенными наземными энтомофагами, регулирующими численность почвенных беспозвоночных в большинстве типов лесов лесной зоны. В Беларуси различные аспекты структуры сообществ жужелиц давно находятся в поле зрения исследователей. Видовой состав и структура населения жужелиц сем. Carabidae различных типов ландшафтов не раз становилась объектом исследования как отечественных, так и зарубежных карабидологов. Однако данных, касающихся детальных характеристик представителей непосредственно р. *Carabus*, населяющих хвойные массивы в интервале времени, мало.

Работа базируется на материале, собранном во время полевого сезона 2013 года в окрестностях поселка Колосово Столбцовского района Минской области в сосняке мшистом и ельнике кисличном. В сосняке мшистом отработано 6795 ловушко-суток, отловлено 1039 экземпляров жужелиц рода *Carabus*. В ельнике кисличном – 6747 ловушко-суток, отловлено 1622 экземпляров жужелиц. Для сравнения использованы сборы М. Л. Минец, проведенные в этих же биотопах в течение полевого сезона