

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра микробиологии

ХАСАНОВ
Игорь Всеволодович

**КО-ЭКСПРЕССИЯ ШАПЕРОНОВ КАК СТРАТЕГИЯ
ПОЛУЧЕНИЯ РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ БЫЧЬЕГО
РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНА
В КЛЕТКАХ *E. COLI***

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
заведующий НИЛ биотехнологии
Потапович Максим Иосифович

Минск, 2019

АННОТАЦИЯ

Дипломная работа 52 страницы, 8 рисунков, 8 таблиц, 58 источников.

Объекты исследования: штамм *E. coli* BL21(λ DE3) (*F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB⁻ mB⁻) λ (DE3) pLysS(Cmr)*), трансформированный плазмидой pET24b(+), содержащей ген бычьего альфа-интерферона, и штамм *E. coli* BL21-Gold(DE3) (*F- ompT hsdS (rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte*), который, помимо pET24b(+) с геном бычьего альфа-интерферона, трансформирован плазмидами pBB540 и pBB550, несущими гены кошаперона GrpE, протеазы ClpB, и шаперонов DnaK, DnaJ, GroES, GroEL.

Целью данной работы являлась оценка стратегии ко-экспрессии молекулярных шаперонов GrpE, ClpB, GroEL и DnaKJ как подхода, позволяющего увеличить выход растворимого белка бычьего рекомбинантного альфа-интерферона (cowIFN α) при сверхэкспрессии в клетках *E. coli*.

Методы исследования: индуцибельная экспрессия, гомогенизация, определение концентрации белка, ДСН-ПААГ электрофорез, высаливание белков сульфатом аммония, ионообменная хроматография, ДНК-электрофорез, кальциевая трансформация, выделение ДНК, рестрикционный анализ.

Основными результатами работы являются:

1. Ко-индуцированная экспрессия шаперонов в клетках *E. coli* при культивировании при +37 °C привела к увеличению отношения концентрации общего клеточного белка в растворимой фракции к нерастворимой фракции в 3,2 раза, а cowIFN α в 3,6 раза.
2. При культивировании при +20 °C, в отличие от +37 °C, отношение концентраций растворимого общего клеточного белка к нерастворимому в отсутствие ко-экспрессии шаперонов увеличилось в 2 раза, а cowIFN α в 4,23 раза.
3. Ко-индуцированная экспрессия шаперонов при культивировании при +20°C привела к увеличению отношения концентрации общего клеточного белка в растворимой фракции к нерастворимой фракции в 4,67 раза по сравнению со штаммом без шаперонных плазмид, культивированным при +37°C, а cowIFN α в 12,5 раза.
4. Бычий альфа-ИФН наиболее эффективно высаливался из клеточного супернатанта сульфатом аммония в концентрации 0,4 М, при этом практически все примесные белки оставались в растворе.
5. Растворение осажденного сульфатом аммония бычьего альфа-ИФН в буфере и последующая катионообменная хроматография позволяют получить целевой белок высокой степени чистоты.

МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЎНІВЕРСТЭТ

БІЯЛАГІЧНЫ ФАКУЛЬТЭТ

Кафедра мікрабіялогіі

ХАСАНАЎ

Ігар Усеваладавіч

**КО-ЭКСПРЭСІЯ ШАПЕРОНАЎ ЯК СТРАТЭГІЯ
АТРЫМАННЯ РАСТВОРАЛЬНАЙ ФОРМЫ БЫЧЫНАГА
РЭКАМБІНАНТНАГА АЛЬФА-ІНТЭРФЕРОНА
Ў КЛЕТКАХ *E. COLI***

Анатацыя да дыпломнай працы

Навуковы кіраўнік:
загадчык НДЛ біятэхналогіі
М.І. Патаповіч

Мінск, 2019

АНАТАЦЫЯ

Дыпломная праца 52 ст., 8 мал., 8 табл., 58 крыніц.

Аб'екты даследавання: штамы *E. coli* BL21(λ DE3) (*F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB⁻ mB⁻) λ (DE3) pLysS(Cmr)*), трансфармаваны плазмідай pET24b(+), якая змяшчае ген бычынага альфа-інтэрферона, і штам *E. coli* BL21-Gold(DE3) (*F- ompT hsdS (rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal λ (DE3) endA Hte*), акрамя pET24b(+), трансфармаваны плазмідамі pBB540 і pBB550, якія нясуць гены ко-шаперона GrpE, пратэазы ClpB, і шаперонаў DnaK, DnaJ, GroES, GroEL.

Мэтай дадзенай працы з'яўлялася ацэнка стратэгіі ко-экспрэсіі малекулярных шаперонаў GrpE, ClpB, GroEL і DnaKJ як метада, што дазваляе павялічыць выхад растваральнага бялка бычынага рэкамбінантнага альфа-інтэрферона (cowIFN α) пры яго звышэкспрэсіі ў клетках *E. coli*.

Метады даследавання: індукцыйная экспрэсія, гамагенізацыя, падлік канцэнтрацыі бялка, ДСН-ПААГ электрофарэз, высольванне бялкоў сульфатам амонія, іёнабменная храматаграфія, ДНК-электрофарэз, кальцыевая трансфармацыя, вылучэнне ДНК, рэстрыкцыённы аналіз.

Асноўнымі вынікамі працы з'яўляюцца:

1. Ко-індуцыраванная экспрэсія шаперонаў ў клетках *E. coli* пры культываванні пры +37 °C прывяла да павялічэння адносін канцэнтрацыі агульнага клеткавага бялку ў растваральнай фракцыі да нерастваральнай фракцыі ў 3,2 разы, а cowIFN α у 3,6 разы.
2. Пры культываванні пры +20 °C, ў адрозненне ад +37 °C, адносін канцэнтрацыі растваральнага агульнага клеткавага бялку да канцэнтрацыі нерастваральнага ў адсутнасці ко-экспрэсіі шаперонаў павялічыліся ў 2 разы, а cowIFN α ў 4,23 разы.
3. Ко-індуцыраванная экспрэсія шаперонаў пры культываванні пры +20 °C прывяла да павялічэння адносін канцэнтрацыі агульнага клеткавага бялку ў растваральнай фракцыі да нерастваральнай фракцыі ў 4,67 раза ў параўнанні саштамам без шаперонных плазмід, культываваным пры +37 °C, а cowIFN α у 12,5 раза.
4. Бычыны альфа-інтэрферон асаджваўся з раствора найбольш эфектыўна ў 0,4 М раствору сульфату амонія, пры гэтым практычна ўсе прымесныя бялкі заставаліся ў раствору.
5. Растварэнне асаджанага сульфатам амонія бычынага альфа-ІФН у буферы і наступная катіёнабменная храматаграфія дазваляюць атрымаць мэтавы бялок высокай ступені чысціні.

MINISTRY OF EDUCATION OF THE REPUBLIC OF BELARUS

BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

FACULTY OF BIOLOGY

Department of Microbiology

KHASSANOV
Igor Vsevolodovich

**CHAPERONE CO-EXPRESSION AS STRATEGY
TO OBTAIN SOLUBLE BOVINE ALPHA-INTERFERON
IN *E. COLI* CELLS**

Abstract for diploma thesis

Scientific supervisor:
Head of Laboratory of Biotechnology
Potapovich Maksim Iosifovich

Minsk, 2019

ABSTRACT

The thesis consists of 52 pages, 8 figures, 8 tables, 58 sources.

Studied objects: The strain *E.coli* BL21(λ DE3) (*F*⁻ *ompT gal dcm lon hsdSB(rB⁻ mB⁻)* λ (DE3) *pLysS(Cmr)*), which was transformed with the plasmid pET24b(+) for bovine alpha-interferon expression, and the strain *E.coli* BL21-Gold(DE3) (*F*⁻ *ompT hsdS (rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal* λ (DE3) *endA Hte*), which, aside from pET24b(+), was also transformed with the plasmids pBB540 and pBB550, which carried the genes for the co-chaperone GrpE, ClpB protease, and the chaperones DnaK, DnaJ, GroES, GroEL.

The aim of the study was to test the strategy of co-expression of molecular chaperones GrpE, ClpB, GroEL and DnaJ as an approach that would allow increasing the yield of soluble bovine recombinant alpha-interferon (cowIFN α) during overexpression in *E.coli* cells.

The study methods included: induced expression, homogenization, estimation of protein concentrations, SDS-PAGE, DNA electrophoresis, restriction analysis, protein salt precipitation with ammonium sulfate, ion exchange chromatography, calcium transformation, DNA extraction.

The most notable results include:

1. Co-induced chaperone expression in *E.coli* cultivated at +37°C led to increase in the ratio of total protein concentration in the soluble to insoluble states by 3.2 times, and for cowIFN α – by 3.6 times.
2. During cultivation at +20°C, in comparison to +37°C, both times without co-expression of chaperones, the ratio of concentrations of soluble to insoluble total protein increased by 2 times, and for cowIFN α by 4.23 times.
3. Co-induced chaperone expression in *E.coli* cultivated at +20°C, as opposed to no chaperone co-expression at +37°C, led to increase in the ratio of soluble to insoluble total protein by 4.67 times, and by 12.5 times for cowIFN α .
4. Bovine alpha-interferon precipitated most effectively in 0.4M ammonium sulfate solution, and practically all additional proteins remained in the solution.
5. Performing cation exchange chromatography on the solubilized bovine alpha-IFN after ammonium sulfate precipitation allows yielding the target protein with a high level of purity.