

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии

ЛАБЫНЬКО
Дарья Кирилловна

РЕФОЛДИНГ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО α -ИНТЕРФЕРОНА
СОБАКИ

Дипломная работа

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
ст. научный сотрудник
Е.В. Бондарюк

Допущена к защите

«___» _____ 2020 г.

Зав. кафедрой биохимии

кандидат биологических наук, доцент И.В. Семак

Минск, 2020

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 79 страниц, 28 рисунков, 12 таблиц, 71 источник.
РЕКОМБИНАНТНЫЙ СОБАЧИЙ α -ИНТЕРФЕРОН, ТЕЛЕЦА ВКЛЮЧЕНИЯ, РЕФОЛДИНГ БЕЛКА, АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ.

Цель работы: получение рекомбинантного α -интерферона собаки из телец включения при помощи оптимизированных условий очистки и хроматографического метода рефолдинга.

Методы исследования: спектрофотометрические, хроматографические, электрофоретические, солюбилизация.

Данная работа была посвящена определению оптимальных условий выделения, очистки и рефолдинга рекомбинантного α -интерферона собаки из телец включения. Отмывка телец включения осуществлялась 50 ммоль/л Tris-HCl pH 8, 150 ммоль/л NaCl, 2 моль/л мочевины. Диагностика прогресса отмывки фиксировалась спектрофотометрически в диапазоне 200 нм – 500 нм, которая позволила показать эффективность отмывочного буфера в отношении очистки балластных белков и нуклеиновых кислот с наименьшими потерями целевого белка.

Солюбилизация в растворе 50 ммоль/л Tris-HCl pH 8 с использованием 8 моль/л мочевины, 20 ммоль/л β -меркаптоэтанола, позволяет наиболее полно экстрагировать α -интерферон в мономерной форме из телец включения.

В качестве рефолдинга использовался уменьшающийся градиент мочевины на сефадекс G-50, колонка была уравновешена рефолдинг-буфером (50 ммоль/л MES pH 6, 240 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л KCl, 1 ммоль/л ЭДТА, 0.4 моль/л сахараза, 0.75 моль/л Gd-HCl, 1 ммоль/л DTT).

После рефолдинга и очистки с использованием одностадийной ионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе концентрация белка составила 0,42 мг/мл.

Электрофоретический анализ полученных фракций в неденатурирующих условиях продемонстрировал наличие рекомбинантного α -интерферона.

Область применения результатов: биохимия, биохимическая фармакология, биотехнология, микробиология, генная инженерия.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 79 старонак, 28 малюнкаў, 12 табліц, 71 крыніца.
РЭКАМБІНАНТНЫ САБАЧЫ α -ІНТЭРФЕРОН, ЦЯЛЯЎКЛЮЧЭННЯ,
РЕФОЛДЫНГ БЯЛКУ, АГРЭГАЦЫЯ БЯЛКОЎ.

Мэта працы: атрыманне рэкамбінантнага α -інтэрферону сабакі з цялец ўключэння пры дапамозе аптымізаваных умоў ачысткі і храматаграфічнага метаду рефолдынгу.

Метады даследавання: спектрофотометрычныя, храматаграфічныя, электрофарэтычныя, салюбілізацыя.

Дадзеная праца была прысвечана вызначэнню аптымальных умоў вылучэння, ачысткі і рефолдынгу рэкамбінантнага α -інтэрферону сабакі з цел ўключэння. Адмыванне Цялец ўключэння ажыццяўлялася 50 ммоль / л Tris-HCl pH 8, 150 ммоль/л NaCl, 2 моль / л мачавіны. Дыягностыка прагрэсу адмывання фіксавалася спектрофотометрычна ў дыяпазоне 200 нм-500 нм, які дазволіў паказаць эфектыўнасць адмывачнага буферу ў дачыненні да ачысткі баластных бялкоў і нуклеінавых кіслот з найменшымі стратамі мэтавага бялку.

Салюбілізацыя ў раствору 50 ммоль/л Tris-HCl pH 8 з выкарыстаннем 8 ммоль/л мачавіны, 20 ммоль / л β -меркаптоэтанола, дазваляе найбольш поўна экстрагаваць α -інтэрферон ў манамернай форме з цялец ўключэння.

У якасці рефолдынга выкарыстоўваўся памяншальны градыент мачавіны на сефадексе G-50, калонка была ўраўнаважаная рефолдынг буферам (50 ммоль/л MES pH 6, 240 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л KCl, 1 ммоль/л ЭДТА, 0.4 моль/л цукроза, 0.75 моль/л Gd-HCl, 1 ммоль/л DTT).

Пасля рефолдынгу і ачысткі з выкарыстаннем аднастадынай іонаабменнай храматаграфіі на DEAE-сефарозе канцэнтрацыя бялку склала 0,42 мг/мл.

Электрофарэтычны аналіз атрыманых фракцый у недэнатураваных умовах прадэманстравалі наяўнасць рэкамбінантных α -інтэрферону.

Вобласць ужывання вынікаў: біяхімія, біяхімічная фармакалогія, біятэхналогія, мікрабіялогія, генная інжынерыя.

ABSTRACT

Thesis, 79 pages, 28 figures, 12 table, 71 source.

RECOMBINANT DOG α -INTERFERON, INCLUSION BODIES, PROTEIN REFOLDING, PROTEIN AGGREGATION.

Objective: to obtain a dog recombinant α -interferon from inclusion bodies using optimized purification conditions and a chromatographic method of refolding.

Research methods: spectrophotometric, chromatographic, electrophoretic, solubilization.

This work was devoted to determining the optimal conditions for the isolation, purification, and refolding of a dog recombinant α -interferon from inclusion bodies. The inclusion bodies were washed with 50 mmol / l Tris-HCl pH 8, 150 mmol / l NaCl, 2 mol / l urea.

The diagnosis of washing progress was recorded spectrophotometrically in the range of 200 nm – 500nm, which allowed us to show the effectiveness of the wash buffer in cleaning ballast proteins and nucleic acids with the least loss of the target protein.

Solubilization in the solution of 50 mmol / l Tris-HCl pH 8 using 8 mol / l urea, 20 mmol / l β -mercaptoethanol allows the most complete extraction of α -interferon in monomeric form from inclusion bodies.

A decreasing urea gradient to Sephadex G-50 was used as refolding, the column was balanced by refolding buffer (50 mmol / l MES pH 6, 240 mmol / l NaCl, 10 mmol / l KCl, 1 mmol / l EDTA, 0.4 mol / l sucrose 0.75 mol / l Gd-HCl, 1 mmol / l DTT).

After refolding and purification using single-stage ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose, the protein concentration was 0,42mg / ml.

Electrophoretic analysis of the obtained fractions under non-denaturing conditions demonstrated the presence of recombinant α -interferon.

The scope of the results: biochemistry, biochemical pharmacology, biotechnology, microbiology, genetic engineering.

