

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра молекулярной биологии**

Аннотация к дипломной работе

**КОЦЮБКО
ВЛАДИСЛАВ
МИХАЙЛОВИЧ**

**ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА ОСНОВНОГО ФАКТОРА РОСТА
ФИБРОБЛАСТОВ И ЭПИДЕРАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА**

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, зав.
лабораторией рекомбинантных
белков,
Александр Павлович Власов

Минск, 2019

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 79 с., 25 рис., 90 источников.

Ключевые слова: Фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, экспрессия, рефолдинг, хроматография, солюбилизация, TEV-протеаза.

Объект исследования: белки человеческого рекомбинантный фактор роста фибробластов, человеческий рекомбинантный эпидермальный фактор роста.

Цель: получить, очистить и определить биологическую активность белков – фактора роста фибробластов основной и эпидермального фактора роста.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов), физические (спектрофотометрия, хроматография, ПААГ-ДСН-электрофорез), биохимические (экстракция белков, солюбилизация) и биоинформационные.

Эта работа описывает интеграцию операций по переосаждению, солюбилизации, рефолдингу белка, ионообменной и металл-хелатной хроматографии используемых для извлечения очищенного и биологически активного человеческого основного фактора роста фибробластов, эпидермального фактора роста и эпидермального фактора роста слитого с доменом B1 белка G стрептококка из телец включения, экспрессируемых в *E.coli*.

Нерастворимый сверхэкспрессированный основной фактор роста фибробластов человека очищали на матрице гепарин-сефарозе путем хроматографии после выделения и солюбилизации в 6 М хлоргидрате гуанидина. Рефолдинг осуществляли путем постепенного удаления гидрохлорида гуанидина. Основной фактор роста фибробластов человека был получен в виде высокоочищенной растворимой мономерной формы с электрофоретической чистотой 95%. Проведенный тест биологической активности ФРФ-2 показал наличие митогенной активности сравнимой с коммерческими препаратами фактора роста фибробластов.

Эпидермальный фактор роста и B1-ЭФР солюбилизировали в 0,1% тритоне-X100, рефолдировали в результате чего белки были получены с электрофоретической чистотой >70%. ЭФР экстрагировали из комплекса B1-ЭФР при помощи индуцированного ферментативного гидролиза высокоспецифичной TEV-протеазой. В результате проведенного исследования разработаны протоколы экстракции, фолдинга и первичного фракционирования трёх белков: фактора роста фибробластов основного(ФРФ-2), эпидермального фактора роста содержащего гексагистидиновую метку и эпидермального фактора роста слитого с доменом B1 белка G стрептококка.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца: 79 с., 25 мал., 90 крыніц.

Ключавыя словы: Фактар росту фібробластаў, эпідэrmальныя фактар росту, экспрэсія, рефолдинг, храматаграфія, солюбилизация, TEV -протеаза.

Аб'ект даследавання: бялкі чалавечы рэкамбінантныя фактар росту фібробластаў і чалавечы рэкамбінантны эпідэrmальны фактар росту.

Мэта: атрымаць, ачысціць і вызначыць біялагічную актыўнасць бялкоў -фактар а росту фібробластаў асноўны і эпідэrmальныя фактар а росту.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў), фізічныя (спектрафотометрыя, храматаграфія, ПААГ-ДСН-электрафарэз), біохімічныя (экстракцыя бялкоў, солюбилизация) так сама біоінфармацыйныя.

Гэтая праца апісвае інтэграцыю аперацый па пераасаажджэнню, солюбилизации, рефолдингу бялку, іонаабменных і метал-хелатных храматаграфій выкарыстоўваюцца для здабывання вычышчанага і біялагічна актыўнага чалавечага асноўнага фактару росту фібробластаў, эпідэrmальныя фактару росту і эпідэrmальным фактару росту злітага з даменам В1 бялку G стрэптакока з цэляццю ўключэння, экспрэсиремых ў *E.coli*.

Нерастваральны свэрхэкспрэсированны асноўны фактар росту фібробластаў чалавека чысцілі на матрыцы гепарин-сефарозе шляхам храматаграфіі пасля вылучэння і солюбилизации ў 6 М хлоргидрате гуанидина. Асноўны фактар росту фібробластаў чалавека быў атрыманы ў выглядзе высокачышчэн растваральнай мономернай форме з электрофоретической чысцінёй 95%. Праведзены тэст біялагічнай актыўнасці ФРФ-2 паказаў наяўнасць митогенной актыўнасці паранальнай з камерцыйнымі прэпаратамі фактару росту фібробластаў.

Эпідэrmальныя фактар росту і В1- ЭФР солюбилизировали у 0,1% Трытон-Х100, рефолдировали ў вынікаў у татэ чаго бяўкі былі атрыманы з электрофоретической чысцінёй > 70%. ЭФР экстрагаваныя з комплексу В1- ЭФР пры дапамозе індукаванага ферментатыўнага гідролізу высокаспецифичнай TEV - протеазай. У выніку праведзенага даследавання распрацаваны пратаколы экстракцыі, фолдинга і першаснага фракцыянавання трох бялкоў.

ABSTRACT

Graduation project: 79 p., 25 pics, 90 sources.

Keywords: fibroblast growth factor, epidermal growth factor, expression, refolding, chromatography, solubilization, TEV protease.

Object of study: proteins human recombinant fibroblast growth factor, human recombinant epidermal growth factor.

Purpose: to obtain, purify and determine the biological activity of proteins - the growth factor of fibroblasts of the main and epidermal growth factor.

Research methods: microbiological (cultivation of microorganisms), physical (spectrophotometry, chromatography, SDS page-SDS-electrophoresis), biochemical (protein extraction, solubilization) and bioinformation.

This work describes the integration of reprecipitation, solubilization, protein refolding, ion-exchange and metal-chelate chromatography used to extract purified and biologically active human basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor and epidermal growth factor streptococcus G protein fused to domain B1 from inclusion bodies, expressed in *E. coli*.

The insoluble overexpressed main human fibroblast growth factor was purified on a heparin-sepharose matrix by chromatography after isolation and solubilization in 6 M guanidine hydrochloride. The main human fibroblast growth factor was obtained in the form of a highly purified soluble monomer form with an electrophoretic purity of 95%. A biological test of the biological activity of FGF-2 showed the presence of mitogenic activity comparable to commercial fibroblast growth factor preparations.

Epidermal growth factor and B1-EGF were solubilized in 0.1% Triton-X100, refolded as a result of which the proteins were obtained with electrophoretic purity > 70%. EGF was extracted from the B1-EGF complex by induced enzymatic hydrolysis with a highly specific TEV protease. As a result of the study, protocols were developed for the extraction, folding, and primary fractionation of three proteins.