

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии

КОСТЮЧЕНКО
Никита Сергеевич

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И РЕФОЛДИНГ ЛИГАНД-
СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ЭФРИНОВОГО РЕЦЕПТОРА ТИПА B2
ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ *E.coli***

Дипломная работа

Научный руководитель:
Заведующий НИЛ
«Биохимия обмена веществ»
кафедры биохимии
кандидат биологических наук
Шолух Михаил Васильевич

Допущен к защите
«__» _____ 2021 г.
Зав. Кафедрой биохимии

Кандидат биологических наук, доцент
_____ И.В. Семак

Минск, 2021

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 43 страницы, 21 рисунок, 5 таблиц, 21 источник.

ТЕЛЬЦА ВКЛЮЧЕНИЯ, ЭФРИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР, ЕРНВ2, РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК, *E. COLI*, ОТМЫВКА, СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ, РЕФОЛДИНГ, ЭЛЕКТРОФОРЕЗ.

Объект исследования: тельца включения *E. coli*.

Цель исследования: подобрать оптимальные условия отмывки и солюбилизации телец включения, содержащих лиганд-связывающий домен эфринового рецептора типа В2. Подобрать оптимальные условия рефолдинга эфринового рецептора В2.

Методы исследования: спектрометрические, электрофоретические, хроматографические.

В данной работе был проведен анализ ряда систем для отмывки телец включения от примесных белков, среди которых наиболее оптимальными оказались 0,5 моль/л NaCl и 0,5 моль/л трис-HCl с pH=8.0. Кроме того было выяснено, что системы на основе 2, 3 и 4 моль/л мочевины, 0,5 моль/л трис-HCl с pH=9, 10 и 0,5 моль/л триса с pH=10.9 не могут быть использованные из-за значительных потерь целевого белка на стадии отмывки.

Был протестирован ряд восстанавливающих компонентов, которые при внесении на стадии солюбилизации телец включения облегчают последующий рефолдинг, среди которых был выбран β -меркаптоэтанол в концентрации 10 ммоль/л.

Были протестированы 15 систем для рефолдинга эфринового рецептора типа В2, среди которых была выбрана та, которая дает наибольшее количество мономерного продукта (50 ммоль/л трис-HCl pH=8,5; 9,6 ммоль/л NaCl; 0,4 ммоль/л KCl; 1 ммоль/л ЭДТА; 1 ммоль/л ДТТ).

Область применения результатов исследования: биохимия, биотехнология, медицина.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 43 старонкі, 21 малюнак, 5 табліц, 21 крыніца.

ЦЯЛЬЦА ЎКЛЮЧЭННЯ, ЭФРЫНАВЫ РЭЦЭПТАР, РЭКАМБІНАНТНЫ БЯЛОК, *E. COLI*, АДМЫЎКА, САЛЮБІЛІЗАЦЫЯ, РЭФОЛДЫНГ, ЭЛЕКТРАФАРЭЗ.

Аб'ект даследавання: цяльца ўключэння *E. coli*.

Мэта даследавання: Вызначыць аптымальныя ўмовы адмыўкі і салюбілізацыі цялец ўключэння, якія ўтрымліваюць дамен звязвання ліганда эфрынавага рэцэптара тыпу В2. Вызначыць аптымальныя ўмовы рэфолдынгу эфрынавага рэцэптара В2.

Метады даследвання: спектраметрычныя, электрофарэтычныя, храматаграфічныя.

У дадзенай рабоце быў прыведзены аналіз шэрагу сістэм для адмывання цялец ўключэння ад прымесных бялкоў, сярод якіх найбольш аптымальнымі з'явіліся 0,5 моль/л NaCl і 0,5 моль/л тріс-HCl з pH=8.0. Акрамя таго было вызначана, што сістэмы на аснове 2, 3 і 4 малярнай мачавіны, 0,5 малярнага тріс- HCl з pH=9, 10 і 0,5 малярны тріс з pH=10,9 не могуць быць выкарыставаны з-за значных страт бялку на стадыі адмыўкі.

Быў пратэставаны шэраг аднаўляюшчых кампанентаў, якія пры ўнесенні на стадыі салюбілізацыі цялец ўключэння палягчаюць наступны рэфолдінг. Сярод гэтых кампанентаў быў абраны β-меркаптаэтанол у канцэнтрацыі 10 ммоль/л.

Былі пратэставаны 15 сістэм для рэфолдынга эфрынавага рэцэптару тыпа В2, сярод якіх была абрана тая, якая дае найбольшую колькасць манамернага прадукту (50 ммоль/л тріс-HCl pH=8,5; 9,6 ммоль/л NaCl; 0,4 ммоль/л KCl; 1 ммоль/л ЭДТА; 1 ммоль/л ДТТ).

Вобласць прымянення вынікаў даследвання: біяхімія, біятэналогія, медыцына.

ABSTRACT

Thesis, 43 pages, 39 figures, 21 sources

INCLUSION BODIES, EPHRIN RECEPTOR, EPHB2, RECOMBINANT PROTEIN, E. COLI, WASHING, SOLUBILIZATION, REFOLDING, ELECTROPHORESIS

Subject of research: inclusion bodies E. Coli.

Aim of research: to find optimal conditions for washing and solubilization of inclusion bodies that contain ligand-binding domain of type B2 ephrin receptor; to find optimal conditions for refolding of type B2 ephrin receptor.

Research methods: spectrometric, electrophoretic, chromatographic.

During this research, several inclusive body washing systems that are used to remove protein impurities were analyzed. 0,5 mol/L NaCl and 0,5 mol/L tris HCl with pH=8.0 proved to be the optimal systems. Furthermore, it was revealed that the systems that use 2, 3 and 4 mol/L urea, 0,5 mol/L tris-HCl with pH=9, 10 and 0,5 mol/L tris with pH=10.9 cannot be used without significant target protein losses during the washing stage.

Several recovering agents that facilitate protein refolding after the inclusion bodies solubilization stage were tested. β -Mercaptoethanol at a concentration of 10 mmol/L was selected as the optimal agent.

15 type B2 ephrin receptor refolding systems were tested. Systems that use 50 mmol/L tris-HCl pH=8,5; 9,6 mmol/L NaCl; 0,4 mmol/L KCl; 1 mmol/L EDTA and 1 mmol/L DTT were as selected as optimal due to the highest amounts of the monomer product yield.

The results of this research can be applied in biochemistry, biotechnology and medicine.