

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии

БАХИР
Эдуард Халекович

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И
ХАРАКТЕРИСТИКА 3-ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗ
(AKR1C4, HSD3B1) ЧЕЛОВЕКА

Дипломная работа

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
доцент А.В. Свирид

Допущен к защите
«__» _____ 2022 г.
Зав. кафедрой биохимии

кандидат биологических наук, доцент
_____ И.В. Семак

Минск, 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 62 с., 19 рис., 5 табл., 126 источников.

Андрогенные анаболические стероиды, стероидогенез, рекомбинантные белки, ферменты, трансформация, лигирование, электрофорез, экспрессия, металл-аффинная хроматография, MALDI-TOF, вестерн-блоттинг, *Escherichia coli*, *Spodoptera frugiperda*.

Объект исследования: рекомбинантные 3-гидроксистероиддегидрогеназы человека.

Цель: экспрессия, выделение, очистка и характеристика целевых 3-гидроксистероиддегидрогеназ человека (AKR1C4 и HSD3B1).

Методы исследования: спектрофотометрический метод количественного определения белков и полинуклеотидов, секвенирование ДНК, электрофорез в агарозном и полиакриламидном гелях, вестерн-блоттинг, металл-аффинная хроматография, MALDI-TOF масс-спектрометрия.

Рекомбинантный AKR1C4 в нативной форме был получен при использовании гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL21. Белок, за счет наличия полигистидиновой метки на N-конце МБР, очищался с помощью металл-аффинной хроматографии на сорбенте Ni-NTA и подвергался высокоспецифичному протеолизу TEV-протеазой. Разделение смеси после протеолиза производилось повторной хроматографией на сорбенте Ni-NTA, но собирались фракции, не связавшиеся с сорбентом, т.к. они содержали целевой белок. Препарат белка был получен в гомогенном состоянии массой 37,066 кДа по данным MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа, что соответствует теоретической расчетной массе ($MW = 37,124$ кДа). Далее была проведена оценка ферментативной активности полученного рекомбинантного фермента двумя методами: масс-спектрометрическим и спектрофотометрическим, в ходе которых были определены K_{cat} и K_M для модельного субстрата (андростерона), которые составили $1,2 \text{ мин}^{-1}$ и $0,8 \text{ мкМ}$ соответственно, что согласуется с литературными данными о нативном ферменте.

Рекомбинантный 3 β -HSD 1 типа в нативной форме был получен при использовании гетерологической экспрессии в клетках линии Sf9. Данный белок также очищался с помощью металл-аффинной хроматографии на сорбенте Ni-NTA. Препарат белка был получен в гомогенном состоянии массой 42,849 кДа с высокой степенью чистоты по данным MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа, что соответствует теоретической расчетной массе ($MW = 43,232$ кДа).

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 62 с., 19 мал., 5 табл., 126 крыніц.

Андрагенныя анабалічныя стэроіды, стэроідагенез, рэкамбінантныя бялки, ферменты, трансфармацыя, лігіраванне, электрофарэз, экспрэсія, метал-афінная храматаграфія, MALDI-TOF, вестэрн-блотынг, *Escherichia coli*, *Spodoptera frugiperda*.

Аб'ект даследавання: рэкамбінантныя 3-гідраксістэроіддэгідрагеназы чалавека.

Мэта: экспрэсія, вылучэнне, ачыстка і характарыстыка мэтавых 3-гідраксістэроіддэгідрагеназ чалавека (AKR1C4 і HSD3B1).

Метады даследавання: спектрафатометрычны метады колькаснага вызначэння бялкоў і полінуклеатыдаў, секвеніраванне ДНК, электрофарэз у агарозным і поліакрыламідным гелях, вестэрн-блотынг, метал-афінная храматаграфія, MALDI-TOF мас-спектраметрыя.

Рэкамбінантны AKR1C4 ў натыйнай форме быў атрыманы пры выкарыстанні гетэралагічнай экспрэсіі ў клетках *E. coli* BL21. Бялок, за кошт наяўнасці полігістыдзінавай пазнакі на N-канцы MBP, чысціўся з дапамогай метал-афіннай храматаграфіі на сарбенце Ni-NTA і падвяргаўся высокаспецыфічнаму пратэалізу TEV-пратэазай. Падзел сумесі пасля пратэалізу выраблялася паўторнай храматаграфіяй на сарбенце Ni-NTA, але збіраліся фракцыі, якія не звязаліся з сарбентам, т.я. яны ўтрымоўвалі мэтавы бялок. Прэпарат бялку быў атрыманы ў гамагенным стане масай 37,066 кДа па дадзеных MALDI-TOF мас-спектраметрычнага аналізу, што адпавядае тэарэтычнай разліковай масе ($MW = 37,124$ кДа). Далей была праведзена ацэнка ферментатываўнай актыўнасці атрыманага рэкамбінантнага фермента двума метадамі: мас-спектраметрычным і спектрафатометрычным, у ходзе якіх былі вызначаны K_{cat} і K_M для мадэльнага субстрату (андрастэруну), якія склалі $1,2 \text{ min}^{-1}$ і $0,8 \text{ мкМ}$ адпаведна, што адпавядае з літаратурнымі дадзенымі аб натыйным ферменты.

Рэкамбінантны 3β -HSD 1 тыпу ў натыйнай форме быў атрыманы пры выкарыстанні гетэралагічнай экспрэсіі ў клетках лініі Sf9. Дадзены бялок таксама чысціўся з дапамогай метал-афіннай храматаграфіі на сарбенце Ni-NTA. Прэпарат бялку быў атрыманы ў гамагенным стане масай 42,849 кДа з высокай ступенню чысціні па дадзеных MALDI-TOF мас-спектраметрычнага аналізу, што адпавядае тэарэтычнай разліковай масе ($MW = 43,232$ кДа).

ABSTRACT

Thesis 62 p., 19 figures, 5 tables, 126 sources.

Androgenic anabolic steroids, steroidogenesis, recombinant proteins, enzymes, transformation, ligation, electrophoresis, expression, metal affinity chromatography, MALDI-TOF, Western blotting, *Escherichia coli*, *Spodoptera frugiperda*.

Subject of research: recombinant human 3-hydroxysteroid dehydrogenases.

Purpose: expression, isolation, purification and characterization of target human 3-hydroxysteroid dehydrogenases (AKR1C4 and HSD3B1).

Research methods: spectrophotometric method for the quantitative determination of proteins and polynucleotides, DNA sequencing, agarose and polyacrylamide gel electrophoresis, Western blotting, metal affinity chromatography, MALDI-TOF mass spectrometry.

Recombinant AKR1C4 in native form was obtained using heterologous expression in *E. coli* BL21 cells. The protein, due to the presence of a polyhistidine label at the N-terminus of MBP, was purified using metal-affinity chromatography on a Ni-NTA sorbent and subjected to highly specific proteolysis by TEV-protease. Separation of the mixture after proteolysis was carried out by repeated chromatography on the Ni-NTA sorbent, but the fractions that did not bind to the sorbent were collected, because they contained the target protein. The protein preparation was obtained in a homogeneous state with a mass of 37.066 kDa according to MALDI-TOF mass spectrometric analysis, which corresponds to the theoretical calculated mass (MW = 37.124 kDa). After that, the enzymatic activity of the resulting recombinant enzyme was evaluated by two methods: mass spectrometric and spectrophotometric, during which K_{cat} and K_M were determined for the model substrate (androsterone), which amounted to 1.2 min^{-1} and $0.8 \text{ }\mu\text{M}$, respectively, which is consistent with literature data on the native enzyme.

Recombinant 3 β -HSD type 1 in native form was obtained using heterologous expression in Sf9 cells. This protein was also purified by metal affinity chromatography on a Ni-NTA sorbent. The protein preparation was obtained in a homogeneous state with a mass of 42.849 kDa with a high degree of purity according to MALDI-TOF mass spectrometric analysis, which corresponds to the theoretical calculated mass (MW = 43.232 kDa).