

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии

ПЫНТИНА
Полина Александровна

**КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА АЛЬФА-ЦЕПИ ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ
ГОРМОНОВ *BOS TAURUS* В КЛЕТКАХ *E. COLI***

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
Заведующий НИЛ биотехнологии
кафедры микробиологии
Потапович Максим Иосифович

Минск, 2022

АННОТАЦИЯ

Дипломная работа, 48 страниц, 6 рисунков, 7 таблиц, 62 источника.

Ключевые слова: ГЛИКОПРОТЕИНОВЫЕ ГОРМОНЫ, АЛЬФА-ЦЕПЬ, РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК, *ESCHERICHIA COLI*, ИНДУЦИБЕЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ТЕЛЬЦА ВКЛЮЧЕНИЯ, РЕФОЛДИНГ, ХРОМАТОГРАФИЯ.

Объект исследования: оптимизированная нуклеотидная последовательность, детерминирующая синтез альфа-цепи бычьих гликопротеиновых гормонов.

Цель работы: клонирование и экспрессия альфа-цепи бычьих гликопротеиновых гормонов в клетках *E. coli*.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов, индуцибельная экспрессия), молекулярно-генетические (выделение ДНК, ПЦР, рестрикция, лигирование, кальциевая трансформация), биохимические (рефолдинг, хроматография), физико-аналитические (электрофорез в агарозном геле, ДСН-ПААГ электрофорез, спектрофотометрия).

Результаты:

1. Получена гибридная конструкция на основе экспрессионного вектора рЕТ24b(+), несущая оптимизированную последовательность гена альфа-цепи бычьего гликопротеинового гормона.
2. Получен рекомбинантный штамм *E. coli* BL21-Gold(DE3), несущий гибридную конструкцию.
3. В результате индуцибельной экспрессии в течение 4 ч при 37 °С в клетка *E. coli* BL21-Gold(DE3) наблюдается накопление белка, соответствующего размеру альфа-цепи бычьего гликопротеинового гормона.
4. Подобраны оптимальные условия рефолдинга целевого белка.
5. Проведен рефолдинг целевого белка и очистка его от примесей с помощью хроматографии.

МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЎНІВЕРСІТЭТ
БІЯЛАГІЧНЫ ФАКУЛЬТЭТ
Кафедра мікрабіялогіі

ПЫНЦІНА
Паліна Аляксандраўна

КЛАНАВАННЕ ГЕНА АЛЬФА-ЛАНЦУГА ГЛІКАПРАТЭІНАВЫХ
ГАРМОНАЎ *BOS TAURUS* У КЛЕТКАХ *E. COLI*

Анатацыя да дыпломнай працы

Навуковы кіраўнік:
загадчык НДЛ біятэхналогіі,
М.І. Потаповіч

Мінск, 2022

АНАТАЦЫЯ

Дыпломная праца 48 старонак, 6 малюнкаў, 7 табліц, 62 крыніцы

Ключавыя словы: ГЛІКАПРАТЭІНАВЫЯ ГАРМОНЫ, АЛЬФА-ЛАНЦУГ БЫЧАГА ГЛІКАПРАТЭІНАВАГА ГАРМОНА, РЭКАМБІНАНТНЫ БЯЛОК, *ESCHERICHIA COLI* BL21-GOLD, ІНДУЦЫБЕЛЬНАЯ ЭКСПРЕСІЯ, ЦЕЛЬЦЫ ЎКЛЮЧЭННЯ, РЭФОЛДЗІНГ, ХРАМАТАГРАФІЯ.

Аб'ект даследвання: аптымізаваная нуклеацідная паслядоўнасць, якая дэтэрмінуе сінтэз альфа-ланцуга бычых глікапратэінавых гармонаў.

Мэта працы: кланаванне і экспрэсія гена альфа-ланцуга бычых глікапратэінавых гармонаў у клетках *E. coli*.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў, індуцыбельная экспрэсія), малекулярна-генетычныя (вылучэнне ДНК, ПЦР, рэстрыкцыя, лігіраванне, кальцыевая трансфармацыя), біяхімічныя (рэфолдзінг, храматаграфія), фізіка-аналітычныя (электрафарэз на агарозным гелі, ДСН-ПААГ электрафарэз, спектрафотаметрыя).

Вынікі:

1. Атрымана гібрыдная канструкцыя на аснове экспрэсійнага вектара pET24b(+) (Novagen, ЗША), якая нясе аптымізаваную паслядоўнасць гена альфа-ланцуга бычага глікапратэінавага гармона.

2. Атрыманы рэкамбінантныя штамы *E. coli* BL21-Gold(DE3), які нясе гібрыдную канструкцыю.

3. У выніку індуцыбельнай экспрэсіі на працягу 4 ч пры 37 °С у клетках *E. coli* BL21-Gold(DE3) назіраецца назапашэнне бялку, які па памеры адпавядае альфа-ланцугу бычынага глікапратэінавага гармона.

4. Падабраны аптымальныя ўмовы рэфолдзінга мэтавага бялку.

5. Праведзены рэфолдзінг мэтавага бялку і ачыстка яго ад прымешак з дапамогай храматаграфіі.

MINISTRY OF EDUCATION OF THE REPUBLIC OF BELARUS
BELARUSIAN STATE UNIVERSITY BIOLOGICAL FACULTY
Department of microbiology

P.A. PYNTSINA

**CLONING OF THE *BOS TAURUS* ALPHA-CHAIN GLYCOPROTEIN
HORMONES GENE IN *E. COLI* CELLS**

Annotation of the thesis

Scientific supervisor:

Head of the Laboratory of

Biotechnology

Potapovich.M.I

Minsk, 2022

ANNOTATION

The thesis consists of 48 pages, 6 figures, 7 tables, 62 sources.

Key words: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA CHAIN OF BOVINE GLYCOPROTEIN HORMONE, RECOMBINANT PROTEIN, ESCHERICHIA COLI BL21-GOLD, INDUCED EXPRESSION, INCLUSION BODIES, REFOLDING, CHROMATOGRAPHY.

Object of study: optimized nucleotide sequence that determines the synthesis of the alpha chain of bovine glycoprotein hormones.

Purpose: cloning and expression of the alpha chain of bovine glycoprotein hormones in *E. coli* cells.

Research methods: microbiological (cultivation of microorganism, induced expression), molecular-genetic (PCR, DNA isolation, restriction, ligation, calcium transformation), biochemical (refolding, chromatography), physico-analytical (SDS-PAGE electrophoresis, electrophoresis in agarose gel, estimation of protein concentrations, spectrophotometry).

Results:

1. A hybrid construct based on the expression vector pET24b(+) (Novagen, USA) was obtained, carrying an optimized sequence of the alpha chain gene of bovine glycoprotein hormone.

2. A recombinant strain of *E. coli* BL21-Gold(DE3) bearing a hybrid design was obtained.

3. As a result of inducible expression for 4 hours at 37 ° C, an accumulation of protein corresponding to the size of the alpha chain of bovine glycoprotein hormone is observed in the *E. coli* BL21-Gold(DE3) cell.

4. Optimal conditions for target protein refolding were defined.

5. Refolding of the target protein and its purification from impurities using chromatography was carried out.