

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии

ДАНИЛЕВИЧ
Никита Сергеевич

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И РЕФОЛДИНГ ЭКТОДОМЕНА
ЭФРИНОВОГО РЕЦЕПТОРА ТИПА A5 С МУТАЦИЕЙ QAPS ИЗ
ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ *E.coli*

Дипломная работа

Научный руководитель:
Заведующий НИЛ
биохимии обмена веществ
кандидат биологических наук
доцент М.В.Шолух

Допущен к защите
«__» _____ 2024 г.
Зав. Кафедрой биохимии

Кандидат биологических наук, доцент
_____ И.В. Семак

Минск, 2024

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 37 страниц, 21 рисунок, 3 таблицы, 18 источников.

ТЕЛЕЦА ВКЛЮЧЕНИЯ, ЭФРИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР, ЕRNA5, РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК, *E. COLI*, ОТМЫВКА, СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ, ТРОМБИНОЛИЗ, РЕФОЛДИНГ.

Объект исследования: нерастворимая форма эктодомена эфринового рецептора типа A5 с мутацией QAPS из телец включения *E.coli*.

Цель исследования: выделение, очистка и рефолдинг нерастворимой формы эктодомена эфринового рецептора типа A5 с мутацией QAPS из телец включения *E.coli*

подобрать оптимальные условия солюбилизации телец включения, содержащих мутантный лиганд-связывающий домен эфринового рецептора типа A5 QAPS. Подвергнуть тромбинолизу и рефолдировать выделенные образцы эфринового рецептора A5 QAPS.

Методы исследования: спектрометрические, электрофоретические, хроматографические.

Результаты: протестировано 13 систем солюбилизации отмытых телец включения. Оптимальной оказалась система с составом 20 ммоль/л Трис-HCl, pH 9,0, DTT 5 ммоль/л, Мочевина 8 моль/л.

Отмывка телец включения 150 ммоль/л Трисом позволила удалить примеси без потерь целевого белка, общая масса которых составила 55% от массы телец включения.

Очистка целевого продукта на анионообменном сорбенте позволила полностью избавиться от примесей нуклеиновых кислот.

Тромбинолиз целевого белка и разделение его продуктов способствуют удалению тиоредоксинового фрагмента из молекул целевого продукта и очистке его от примесей.

Получение рефолдированного эктодомена эфринового рецептора A5 с мутацией QAPS позволяет проводить дальнейшие работы по исследованию активности и свойств мутантной формы белка.

Область применения результатов исследования: биохимия, биотехнология, медицина.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 37 старонак, 21 малюнак, 3 табліцы, 18 крыніц.

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

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

Мэта даследавання: вылучэнне, ачыстка і рэфолдынг нерастваральнай формы эктадамена эфрынавага рэцэптара тыпу A5 з мутацыяй QAPS з цяльцаў ўключэння *E.coli*

падабраць аптымальныя ўмовы салюбілізацыі цяльцаў ўключэння, якія змяшчаюць мутантны ліганд-злучальны дамен эфрынавага рэцэптара тыпу A5 QAPS. Падвергнуць трамбінолізу і рэфалдаваць выдзеленыя ўзоры эфрынавага рэцэптара A5 QAPS.

Метады даследвання: спектраметрычныя, электрофарэтычныя, храматаграфічныя.

Вынік: пратэставана 13 сістэм салюбілізацыі адмытых цяльцаў ўключэння. Аптымальнай аказалася сістэма са складам 20 ммоль/л Трыс-HCl, pH 9.0, DTT 5 ммоль/л, мачавіна 8 моль/л.

Адмыванне цяльцаў ўключэння 150 ммоль/л Трысом дазволіла выдаліць прымешкі без страт мэтавага бялку, агульная маса якіх складала 55% ад масы цяльцаў ўключэння.

Ачыстка мэтавага прадукта на аніёнаабменным сарбенце дазволіла цалкам пазбавіцца ад прымешак нуклеінавых кіслот.

Трамбіноліз мэтавага бялку і падзел яго прадуктаў спрыяюць выдаленню тыарэдаксінавага фрагмента з малекул мэтавага прадукта і ачыстцы яго ад прымешак.

Атрыманне рефолдаванага эктадамена эфрынавага рэцэптара A5 з мутацыяй QAPS дазваляе праводзіць далейшыя працы па даследаванні актыўнасці і ўласцівасцяў мутантавай формы бялку.

Вобласць прымянення вынікаў даследвання: біяхімія, біятэналогія, медыцына.

ABSTRACT

Thesis, 37 pages, 21 figures, 3 tables, 18 sources

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

Subject of research: inclusion bodies *E. Coli*.

Aim of research: Isolation, purification and refolding of an insoluble form of the ectodomain of the ephrin receptor type A5 with the QAPS mutation from *E.coli* inclusion bodies

to select optimal conditions for the solubilization of inclusion bodies containing the mutant ligand-binding domain of the ephrin receptor type A5 QAPS. Thrombinolyze and refold isolated ephrin receptor A5 QAPS samples.

Research methods: spectrometric, electrophoretic, chromatographic.

Results: 13 systems for solubilization of washed inclusion bodies were tested. The optimal system turned out to be a system with a composition of 20 mmol/l Tris-HCl, pH 9.0, DTT 5 mmol/l, Urea 8 mol/l.

Washing the inclusion bodies with 150 mmol/l Tris made it possible to remove impurities without loss of the target protein, the total mass of which was 55% of the mass of the inclusion bodies.

Purification of the target product using an anion-exchange sorbent made it possible to completely get rid of nucleic acid impurities.

Thrombinolysis of the target protein and separation of its products help remove the thioredoxin fragment from the molecules of the target product and purify it from impurities.

Obtaining a refolded ectodomain of the ephrin receptor A5 with the QAPS mutation allows further work to study the activity and properties of the mutant form of the protein.

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