

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ NAN_0240
ГАЛОАРХЕЙ *HALOARCUA HISPANICA*

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Топиловой Марины Юрьевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

ГГ —
30.05.2023

А.А. Галицкая

Научный консультант:

доцент, канд. биол. наук

БГ
30.05.2023

Б.Г. Бурыгин

канд. биол. наук

с.н.с., зав. группой надмолекулярных

белковых структур ИБ РАН

МГ
30.05.2023

М.Г. Пятибратов

Зав. кафедрой биохимии и биофизики

профессор, док. биол. наук

СА
30.05.2023

С.А. Коннова

Саратов 2023 год

Введение Актуальность работы. В группе надмолекулярных белковых структур (Институт белка РАН) у штамма DF60 галофильной археи *Haloarcula hispanica* был обнаружен новый тип поверхностных структур архей - ТАТ-нити, основным компонентом которых является белок НАН_0240.

Данные структуры уникальны, поскольку они образованы белковыми субъединицами, секретлируемыми с помощью твин- аргининового пути транслокации (Tat-путь), в отличие от известных архейных поверхностных филаментных структур, секретлируемых общим секреторным путем (Sec-путь). Случаи использования Tat-пути при сборке архейных и бактериальных нитевидных структур до настоящего времени не описаны

Для лучшего изучения процесса синтеза ТАТ-нитей было предложено использовать специфичные к белку НАН_0240 антитела. Однако, полученные к выделенному из *Haloarcula hispanica* белку, антитела обладали низкой специфичностью. Было предположено, что это обусловлено гликолизированием данного белка.

В соответствии с этим была сформулирована следующая цель:

Получение антител к рекомбинантному белку галоархеи *Haloarcula hispanica* НАН_0240

В связи с поставленной целью необходимо решить следующие задачи:

1. Создать генетическую конструкцию вектора для экспрессии целевого белка.
2. Проверить экспрессию рекомбинантного белка в *E.coli*.
3. Очистить целевой белок НАН_0240 и определить его локализацию в клетках *E.coli*.
4. Получить рекомбинантный белок НАН_0240 в количестве, достаточном для иммунизации кроликов и получения специфических поликлональных антител.
5. Провести качественный анализ наличия антител к рекомбинантному белку НАН_0240 в сыворотке крови.

6. Определить уровень специфичности полученных антител к белку НАН_0240.

Основное содержание работы.

Структура работы обусловлена целью и задачами исследования, включает обозначения и сокращения, введение, три раздела (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и их обсуждение), заключение, список использованных источников.

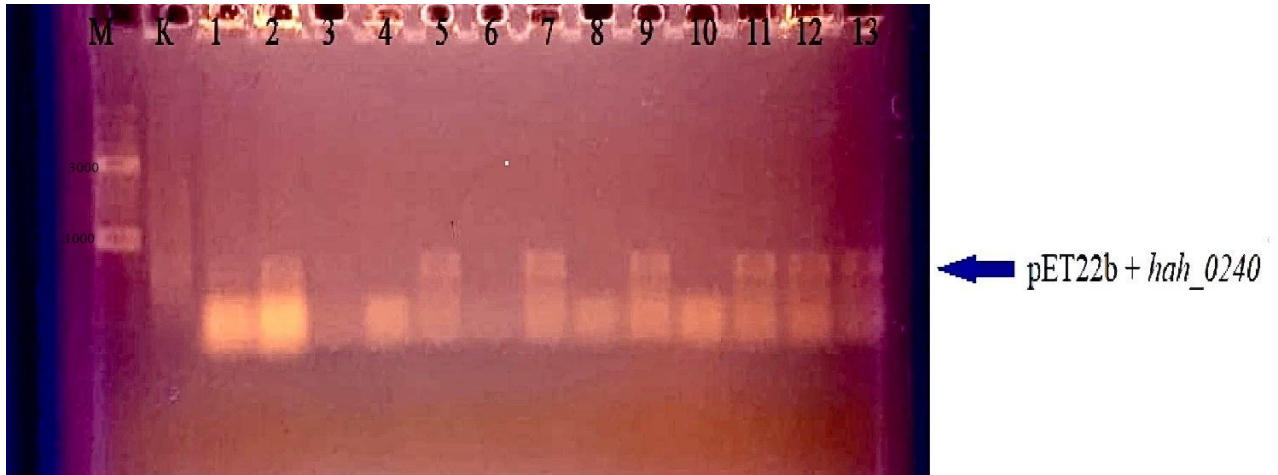
Проанализировано 34 источника иностранных авторов. Они составили теоретическую и методологическую основу исследования.

В разделе Материалы и методы описана структура экспериментов, перечислены основные методики. Для получения белка НАН_0240 использовали различные методы молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция, клонирование ДНК, очистка ДНК, линейаризация векторов, с помощью обработки эндонуклеазами рестрикции, трансформация *E. coli*, секвенирование ДНК, электрофорез в ДСН-ПААГ, сборка генетических конструкций методом TEDA и методом лигирования, ПЦР-скрининг трансформированных колоний и т.д.), для получения антител к белку использовались методы дот-анализа, вестерн-блоттинга, иммуноферментный анализ (ИФА) в полистирольном планшете.

В разделе Результаты и их обсуждение представлен экспериментальный материал и анализ полученных результатов.

На первом этапе необходимо было собрать генетическую конструкцию. Плазмиды для клонирования получали на основе вектора рЕТ22b. Кроме целевого гена (без N-концевой сигнальной последовательности), вставка содержала также участок, кодирующий 6 C-концевых гистидинов. Вставки нарабатывали методом ПЦР, сборку плазмид производили по методам TEDA и лигирования, после чего полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* и высевали на твердую селективную среду до получения отдельных колоний. Колонии проверяли на наличие вставки методом ПЦР-скрининга, результаты визуализировали с помощью

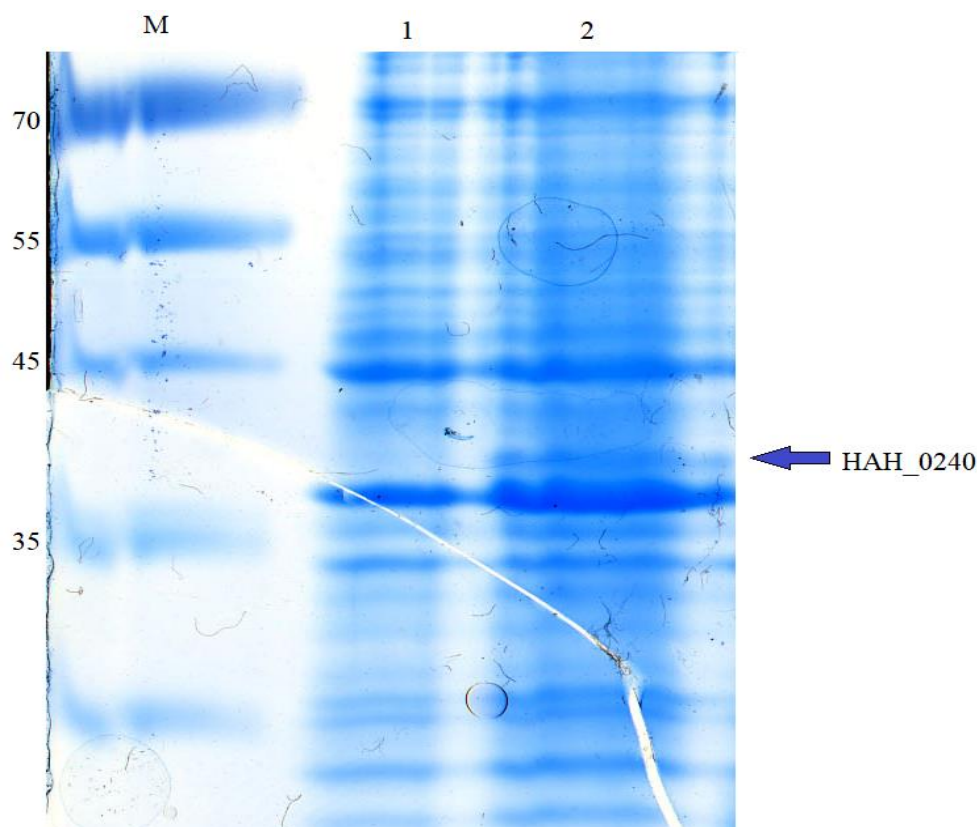
электрофореза в агарозном геле (рисунок 1). По результатам скрининга были обнаружены колонии, содержащие плазмиды со вставками ожидаемого размера. Последовательность вставок в плаزمидах была подтверждена секвенированием, выполненным компанией «Евроген» (Россия).



В качестве контроля (К) использовалась вставка, несущая целевой ген. «М» – ДНК-маркер (п.н.), «1–13» – ПЦР-продукты с различных колоний одного штамма, «1,2,3,5,7,9,11,12,13» – колонии содержащие плазмиды со вставками ожидаемого размера.

Рисунок 1 – Визуализация ПЦР-продуктов методом электрофореза в агарозном геле. Электрофореграмма, полученная в результате проверки наличия вставки гена *hah_0240*

Для проверки экспрессии рекомбинантного белка в *E.coli* необходимо было трансформировать экспрессионный штамм (BL-21, BL-Rosetta, C41) вектором, несущим целевой ген (*pET22b + hah_0240*) (рисунок 2). Доставка генетического материала в клетки производилась методом химической трансформации, после чего клетки высевались и инкубировались 16 часов в термостате при 37 °С.



«М» – маркер молекулярной массы, «1» – образец штамма BL-21, выращенный в среде до добавления ИПТГ, «2» – образец штамма BL-21, выращенный в среде после добавления ИПТГ
 Рисунок 2 – Электрофореграмма целевого белка НАН_0240, содержащего His-tag, с ожидаемой подвижностью, который был выделен из *E.coli* штамма BL-21

После был проведен анализ локализации белка - в тельцах включениях или в растворимой форме (проверялся бесклеточный экстракт и нерастворимый осадок) – для чего необходимо было очистить целевой белок.

Перед непосредственной очисткой целевого белка производилось разрушение бактериальных клеток ультразвуком и осветление клеточного экстракта низкоскоростным центрифугированием.

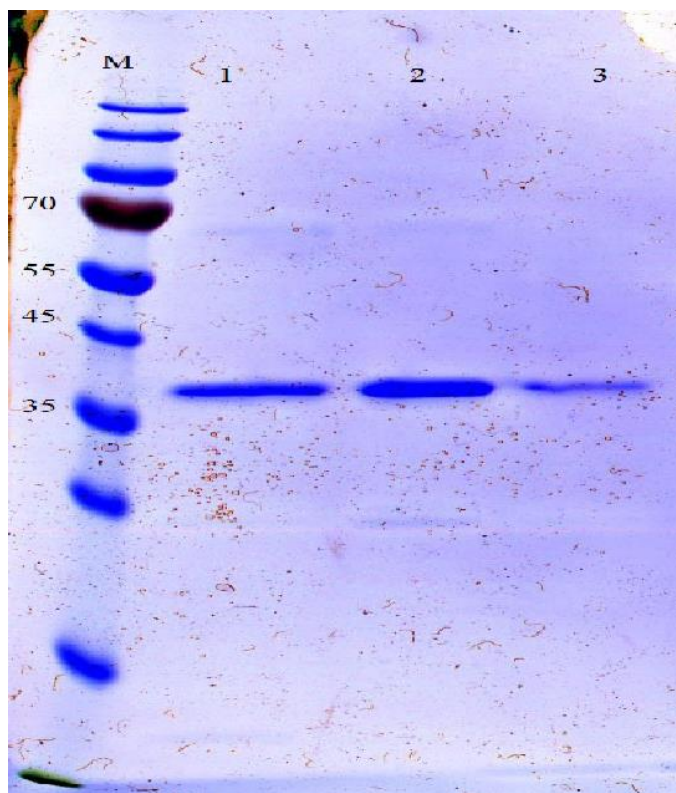
Очистка целевого рекомбинантного белка производилась металл-аффинной хроматографией, что позволяло провести быструю и параллельную оценку экспрессии нескольких экспрессионных вариантов. Связывание белка с сорбентом происходило за счет остатков гистидина.

Результаты анализов показали наибольшее присутствие целевого белка в супернатанте, что свидетельствует о нахождении белка в растворимой форме.

Необходимо было подобрать оптимальный протокол экспрессии целевого белка НАН_0240. Для этого использовалось параллельное культивирование трех штаммов (BL-21, BL-Rosseta, C41) в двух различных средах (LB и ZYP) при разных температурах (27 до 37 °С). Пробы отбирались каждый час.

В результате был подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок НАН_0240, а именно наилучший результат показывал штамм BL- Rosseta в LB среде при температурах от 28 до 30 °С, проба была взята через 5 часов добавления ИПТГ.

Перед очисткой целевого белка производилось разрушение бактериальных клеток ультразвуком и осветление клеточного экстракта низкоскоростным центрифугированием. Для крупномасштабной очистки осветленный клеточный лизат клеток штамма-продуцента рекомбинантного белка НАН_0240 был подвергнут металл-аффинной хроматографии на колонке Poros 20 MC. Полученные образцы проверяли с помощью белкового электрофореза, показавшего наличие в образцах низкомолекулярных примесей. Окончательную очистку белка производили при помощи гель-фильтрационной хроматографии (рисунок 3).

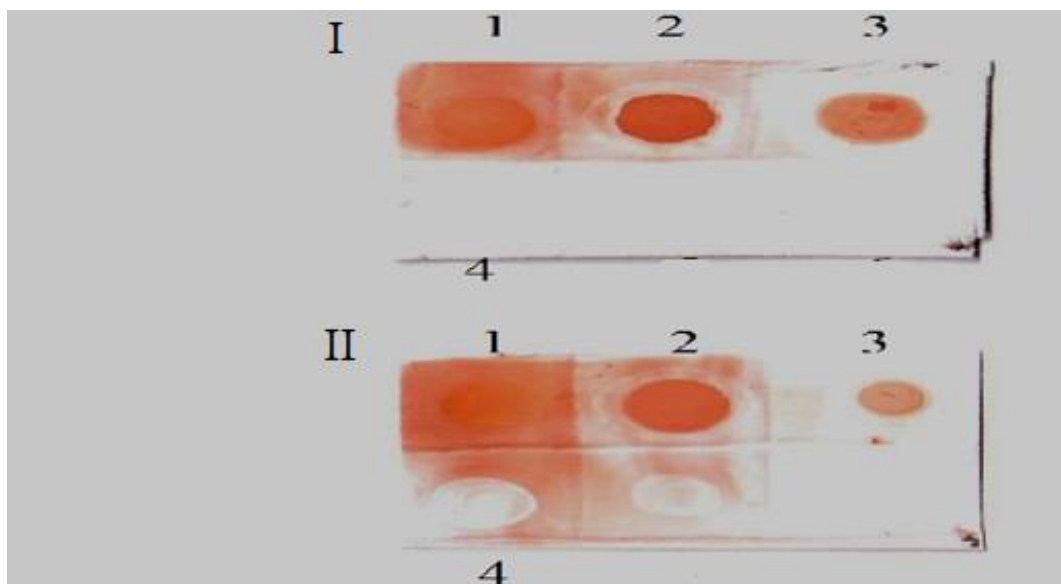


«М» – маркер молекулярной массы, «1–3» – фракции, очищенного рекомбинантного белка NAN_0240, которые были собраны на этапе элюции

Рисунок 3 – Электрофореграмма фракции, полученных после геле-фильтрационной хроматографии, содержащих целевой белок NAN_0240 с His-tag

Далее проводилась иммунизация кроликов рекомбинантным белком NAN_0240 курсом состоящем из трех инъекций. Кроликов иммунизировали рекомбинантным белком NAN_0240 курсом состоящем из трех инъекций. Был осуществлен забор крови (после 2 и 3 иммунизации) в небольшом количестве (2 мл) из крайней ушной вены. Кровь отстаивалась в термостате 1 час при температуре 37 °С, после чего образец центрифугировался и отбирался супернатант.

Сыворотки крови, полученные после гипериммунизации кролика рекомбинантным белком NAN_0240, использовались для постановки дот-анализа (рисунок 4). Анализ показал качественную реакцию антител к рекомбинантному белку NAN_0240.



«I» – мембрана с антителами, взятыми на 28-ой день иммунизации, «II» – мембрана с антителами, взятыми на 42-ой день иммунизации, «1» – рекомбинантный белок HAN_0240, «2» – исходный гликолизированный белок HAN_0240, «3» – белок в составе ТАТ-нитей, «4» – бычий сывороточный альбумин (БСА)

Рисунок 4 – Взаимодействие антител с рекомбинантным белком HAN_0240, осуществленное методом дот-анализа

Полученные в работе антитела использовали для определения уровня специфичности антител к белку HAN_0240 с помощью Вестерн-блоттинга, который показал специфичность реакции антител ко всем тестируемым формам исследуемого белка, а именно, к рекомбинантному белку HAN_0240, к исходному гликолизированному белку HAN_0240 и к белку в составе ТАТ-нитей.

Для количественного определения взаимодействия антител к каждому белковому образцу использовался метод иммуноферментного анализа в варианте ELISA (рисунок 5). Полученные результаты свидетельствовали о том, что антитела реагируют практически одинаково как с рекомбинантным белком HAN_0240, так и с исходным гликолизированным белком. Однако, белок в составе ТАТ-нитей показал более низкую степень взаимодействия с антителами, что предположительно может быть связано с тем, что некоторые из детерминант HAN_0240 в полимере

участвуют в межсубъединичных взаимодействиях, и доступ к ним антител затруднён.

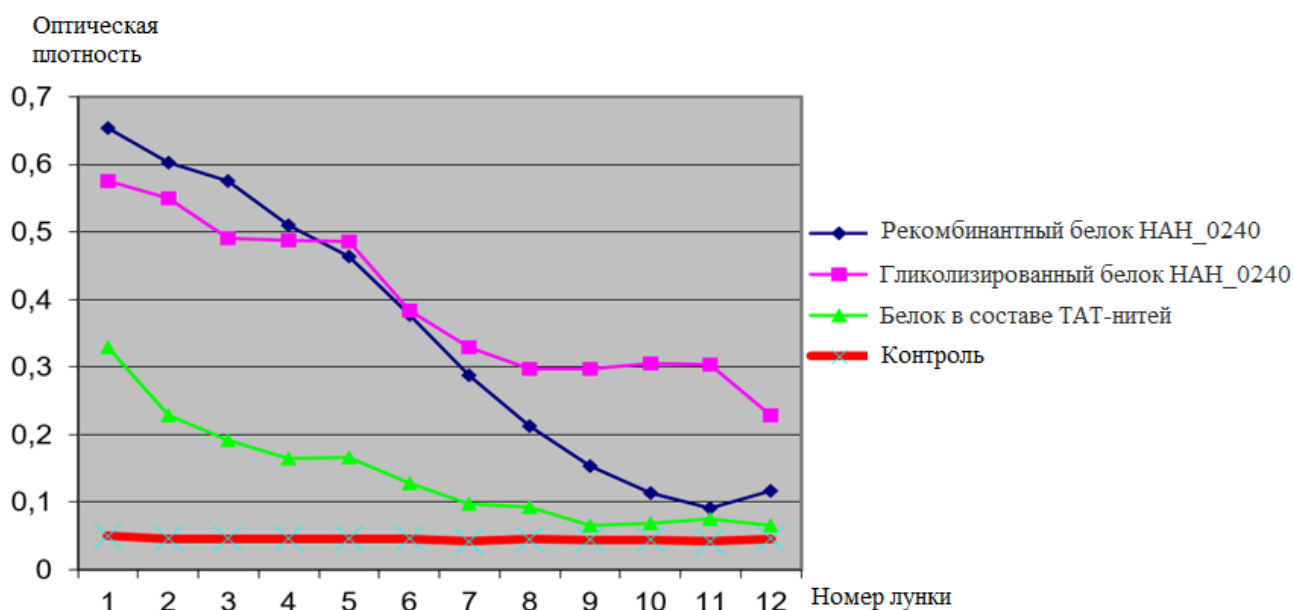


Рисунок 5 – Количественная оценка взаимодействия белков с полученными антителами

Заключение

Проведены исследования, целью которых являлось получение рекомбинантного белка НАН_0240 галоархей *Haloarcula hispanica* в *Escherichia coli*.

Собрана генетическая конструкция *pET22b + hah_0240*, которой трансформировались компетентные клетки *E. coli*, для экспрессии рекомбинантного белка НАН_0240.

Получен очищенный рекомбинантный белок НАН_0240 с использованием метало-аффинной хроматографии. Очистка белка проводилась в денатурирующих и нативных условиях.

При анализе локализации рекомбинантного белка НАН_0240 в клетках *E. coli* было показано, что белок находится в растворимой форме.

Подобран оптимальный протокол экспрессии белка НАН_0240. Наибольшая экспрессия наблюдалась у штамма BL-Rosetta в LB среде при температуре от 28 до 30 °С.

На основе рекомбинантного белка НАН_0240 получены поликлональные кроличьи антитела, которые показали хорошую степень взаимодействия с рекомбинантным и с природным белком. Белок в составе ТАТ-нитей показал более низкую степень взаимодействия с антителами.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ару', is written over a diagonal line that crosses the text area.