

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ПРИНЦИПЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* –
ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы

направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Пушкарёвой Анастасии Николаевны

Научный руководитель

профессор, д-р. биол. наук, доцент

 13.06.25

Д. В. Уткин

Зав. кафедрой:

д-р. биол. наук, профессор

 13.06.25

С. А. Степанов

Саратов 2025

Введение

Возможность воспроизводства рекомбинантных белков с помощью микроорганизмов представляет собой революционное открытие в генетике и биохимии. Способность экспрессировать и очищать нужные рекомбинантные белки в больших количествах позволяет оценивать их биохимические свойства и использовать в промышленных процессах или коммерческих продуктах. Для экспрессии белков необходимо правильно выбрать подходящих продуцентов, и, несмотря на их разнообразие, метод, основанный на экспрессии рекомбинантных генов в *Escherichia coli*, часто рассматривается как наиболее удобный. *E. coli* обладает такими положительными качествами, как хорошо изученная физиология и строение генетического аппарата, простота культивирования, доступность и плотный рост культуры. Однако, стандартная методика не всегда дает положительный результат, и в таких случаях требуется более точный расчет индивидуальной методики или подбор более удачных штаммов *E. coli*.

Как пример важного для медицины рекомбинантного продукта, мы приводим фермент эндолизин, который в современном мире может стать инновационным средством против эпидемических вспышек *Staphylococcus aureus*, наравне с антибиотиками и бактериофагами. Значение исследований по культивированию штаммов-продуцентов рекомбинантного антистафилококкового белка, эндолизина, заключается в необходимости в сохранении ферментативных свойств белка. Особенностью продукции многих рекомбинантных ферментов является необходимость получения белка в растворимой фазе, поскольку стандартное для многих технологических процессов получение целевого белка в виде телец включения с последующей ренатурацией не применимо для ферментов вследствие частой необратимой потери ферментативных свойств.

Безусловно, известны общие принципы культивирования рекомбинантных белков, которые лежат в основе любого процесса получения

рекомбинантного продукта. Но условия получения конкретного продукта полностью определяются характеристиками самого продукта. Новизна данного исследования заключается в задаче получения целевого продукта, эндолизина, белка с сохранёнными ферментативными свойствами. Антистафилококковая активность эндолизина основана на сохранности каталитических центров белковой молекулы, функциональность которых обеспечивается стереометрически правильным положением двухвалентных ионов металлов. При переходе в нерастворимую форму рекомбинантный эндолизин теряет свои ферментативные свойства, и в процессе ренатурации, ферментативные свойства эндолизина не восстанавливаются. Следовательно, новизной данного исследования является определение уникальных для каждого рекомбинантного фермента оптимальных условий продукции белка в растворимой форме с сохранением его энзиматической активности.

Целью работы является выявление параметров культивирования энзиматически активного модельного ферментативного продукта, рекомбинантного эндолизина, в экспрессионной системе *E. coli* BL21(DE3)-pET.

Для реализации указанной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить штамм *E. coli* BL21(DE3)-pET21a, продуцент рекомбинантного литического белка.
2. Получить озвученный бактериальный лизат с высоким процентным содержанием рекомбинантного литического белка, эндолизина, в растворимой форме.
3. Проверить антистафилококковую активность целевого рекомбинантного белка на живых клетках *Staphylococcus aureus*.

Материал и методы

Объектами исследования служили *E. coli* BL21, *E. coli* DH5 α . Клинические штаммы метициллин-резистентных *S. aureus* и метициллин-чувствительных *S. aureus*. Векторная плазмида pET21a.

Метод трансформации использовался для трансформации клеток штамма-реципиента *E. coli* BL21(DE3) плазмидой pET21a, содержащей ген LysRC03, кодирующий синтез эндолизина, штамма *E. coli* BL21 получен штамм-продуцент эндолизина.

Так же использовали метод индукции экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный целевой белок и накопление биомассы клеток с рекомбинантным белком.

Для разрушение клеток бактерии-продуцента с высвобождением целевого белка эндолизина использовали метод Озвучивание биомассы клеток при помощи ультразвукового дезинтегратора.

Использовали метод SDS-PAGE рекомбинантных белков. Состав тотального белка в осветленном лизате и процент содержания целевого рекомбинантного белка проводили согласно протоколу [9]. Приготовили разделяющий и концентрирующий полиакриламидные гели. Использовали 12 % акрила-мидный раствор для разделяющего геля и 4 % – для концентрирующего. Залили разделяющий гель в нижнюю часть стеклянной кассеты. Оставили на 20–30 минут для полимеризации. После полимеризации разделяющего слоя аккуратно залили концен-трирующий гель сверху и вставили гребёнку для формирования лунок. Дожда-лись полной полимеризации (около 20 минут). Приготовили буфер для образцов: смешали 91 % Laemmli-буфера с 9 % β -меркаптоэтанола. Смешали белковые образцы с подготовленным буфером в соотно-шении 1:1. В каждый образец добавляли по 7 мкл буфера и 7 мкл пробы. Прогревали смесь в твердотельном термостате при температуре 95 °C в течение 5 минут для денатурации белков. После прогрева пробы остужали до комнатной температуры и кратко центрифугировали. Подготовили электродный буфер: 70

мкл 10X трис-глицинового буфера (ТГБ) разводили 630 мкл дистиллированной воды (конечная концентрация 1X). Установили стеклянную кассету с полимеризованным гелем в камеру вертикального электрофореза и залили разбавленным ТГБ как внутреннюю, так и внешнюю камеры. Аккуратно загрузили в сформированные лунки геля исследуемые белковые образцы и белковый маркер. В качестве маркера использовали жидкий стандарт «FastRuler Low Range». Подключили электрофоретическую установку, установив напряжение 200 В. Проводили электрофорез в течение приблизительно 30 минут, до тех пор, пока фронт красителя не достиг нижнего края геля. По завершении электрофореза отключили питание и извлекли гель из кассеты. Поместили гель в раствор красителя Кумасси (Coomassie Brilliant Blue) и инкубировали в нём 30–60 минут при умеренном покачивании. После окрашивания промывали гель водой или обесцвечивающим раствором (метанол:уксусная кислота:вода в соотношении 3:1:6) до появления чётких полос белков. При необходимости гель сохраняли в 5 % растворе уксусной кислоты при температуре +4 °С. Оценка литической активности рекомбинантного белка турбидимет-рическим методом.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 30 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 40 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 8 рисунками.

Основное содержание работы

Первым этапом эксперимента было получение рекомбинантного штамма *E. coli* BL21(DE3)/pET21a, продуцента целевого рекомбинантного белка. Для этого, подготовленные компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали рекомбинантным вектором экспрессии pET21a с клонированный целевым белком следующим способом. Культуру *E. coli*

BL21(DE3) поставили на орбитальный шейкер в течение 2 ч, после проверили оптическую плотность. Перелили культуру из колбы в замороженные пробирки. Охлаждали воду и культуру в пробирке во льду, в холодильнике. Далее ставили пробирку с культурой и воду в центрифугу (+ 2 °C, 4000 об/мин, 20 мин).

Пробирки со средой избавили от бульона, сохранили осадок и его с 20 мл стерильного хлористого кальция. Уравновесили культуру с водой. Культуру убрали в холодильник на 29 мин. Далее достали и поставили в центрифугу (+ 2 °C, 4000 об/мин, 10 мин).

Достали и слили жидкость, добавили 2 мкл хлористого кальция. Перенесли по 1 мл суспензии в пробирки для *E. coli* BL21(DE3). Поставили центрифугу (5 мин, 5000 об/мин). Убрали жидкость, сохранили осадок. В одной пробирке смешивали 150 мкл *E. coli* BL21(DE3), CaCl₂, 5 мкл ДНК. Данный состав поставили в лёд на 30 минут. Делали водяную баню при температуре +43 °C и опускали пробирку в баню на 3 минут (тепловой шок), а затем опускали обратно в лёд на 3 мин. Перенесли состав в колбы с питательным бульоном и поставили в орбитальный шейкер.

Трансформированные клетки *E. coli* BL21(DE3) высевали на питательную среду LB с добавлением 100 мг/л ампициллина. Всего было получено 368 колоний, из которых 10 колоний выбрали случайным образом и использовали для выделения плазмидной ДНК. Все образцы ДНК содержали одинаковую по размеру плазмиду. Один из проверенных образцов ДНК использовали для дальнейшей работы.

Далее проводили получение бактериальной массы *E. coli* BL21(DE3)/pET21a, продуцента целевого рекомбинантного белка. Свежеполученные ночные колонии *E. coli* BL21(DE3)/pET21a использовали для получения бактериальной массы. Поставили на орбитальный шейкер в питательном бульоне (1,5 ч). Затем провели спектрофотометрию, физико-химический метод анализа, основанный

на измерении оптической плотности (светопропускания) проходящего через образец света определенной длины волны. В микробиологии спектрофотометрия применяется для определения концентрации бактериальных клеток [4]. Измеряли мутность культуры против контроля (контроль - ростовая среда). При длине волны 600 нм измеряли оптическую плотность, равную 2.5.

Затем полученную культуру высевали из первоначальной колбы в 4 большие колбы (по 5 мл культуры на 100 мл бульона). Добавляли ампициллин в большие колбы с бульоном, так чтобы итоговая концентрация составляла 50мкг/мл. После чего ставили в орбитальный шейкер. Бактериальную культуру растили до показателя оптической плотности равного 0,6-0,7.

На этом этапе колбы с культурой помещали в ледяную баню на 30 мин, после чего добавили в каждую колбу по 100 мкл ампициллина и посредством добавления ИПТГ (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид) индуцировали продукцию целевого рекомбинантного белка. В дальнейшем культуру инкубировали в орбитальном шейкере (16 °C, 18 ч).

Далее перешли к этапу получения осветленного бактериального лизата с целевым рекомбинантным белком. Бактериальную массу продуцента целевого рекомбинантного белка перемещали в пробирки типа Фалькон по 50 мл и центрифугировали при 6000 об/мин 20 минут при температуре +4 °C. Полученный осадок суспендировали в физрастворе и снова центрифугировали при 6000 об/мин 20 минут при температуре +4 °C. Получали концентрированную биомассу, которую хранили при -18 °C.

Следующим этапам проводили ультразвуковую дезинтеграцию (УЗД) бактериальной суспензии. С помощью данной методики разрушали клеточные стенки путём воздействия на них сильной вибрации, при которой искомый белок покидает клетку. Пробирки типа Эппендорф с образцами помещали в лёд, и опускали в центр пробирки типа Эппендорф ультразвуковой зонд. Затем

выбирали подходящую программу дезинтеграции (амплитуда 30, время процесса 1:15).

После произведённого УЗД полученный ультразвуковой лизат центрифугировали 20 минут при 12000 об/мин. Полученный супернатант содержал растворимые фракции белка штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET21a.

В результате ультразвуковой дезинтеграции осуществляется разрушение клеток бактерии штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3) с высвобождением рекомбинантного белка. При этом, необходимо было получить белок преимущественно в растворимой форме. При переходе в нерастворимую форму рекомбинантный белок терял свои ферментативные свойства и в процессе ренатурации ферментативные свойства белка не восстанавливались. После этапов центрифугирования нами был получен осветленный супернатант, который в дальнейшем подвергли анализу и хроматографической очистке для получения очищенного целевого белка.

Анализировали озвученный лизата после ультразвуковой дезинтеграции методом электрофореза белков в полиакриламидном геле. Для определения состава тотального белка в осветленном лизате и процента содержания целевого рекомбинантного белка использовали метод электрофореза белков в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) — метод разделения смесей белков в полиакриламидном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью, в зависимости от их молекулярной массы. Основным принцип электрофореза заключается в том, что силы электрического поля смещают по раствору молекулы, имеющие определённый заряд, к противоположно заряженному электроду. «Электрофорез белков (Serum Protein Electrophoresis, SPE) — это способ разделения смеси белков на фракции или индивидуальные белки с помощью электрического тока в проводящей среде в зависимости от их размера и заряда» [5]. Аминокислотный состав белков с одинаковым рН влияет на заряд этих белков, по причине того, что диссоциация белковых цепей

приводит к образованию групп с положительным или отрицательным зарядом. Таким образом, под влиянием электрического тока, компоненты системы распределяются согласно зарядам и приобретают соответствующую скорость движения. Скорость движения будет зависеть от различных факторов, например, от величины и форм пор геля, заряда ионов, величины ионов, типа взаимодействия между движущимися ионами и матрицей геля. Готовили разделяющий и концентрирующий гель. Использовали концентрацию 12 % для разделяющего геля и 4 % - для концентрирующего. Разделяющий гель заливали внизу, концентрирующий гель сверху.

Далее смешивали 91 % буфера и 9 % β -меркаптоэтанола. Смешивали с образцами в пропорции 1/1 по 7 мкл. Смесь прогревали в твердотельном термостате (5 мин при температуре 95 °C). Трис-глициновый буфер (ТГБ) 70 мкл разводили 10^X с 630 мкл воды. Помещали стёкла в буфер. Использовали жидкий маркер «FastRuler Low Range». На гель выгружали маркер и образцы. А затем подключали 200 Вт. Через 30 мин доставали гель и заливали его красителем Кумасси. В результате проведенного SDS-PAGE анализа озвученного лизата в полиакриламидном геле было показано присутствие рекомбинантного целевого белка молекулярной массой 53 кДа.

Далее анализировали антистафилококковую активность озвученного лизата турбидиметрическим методом. Турбидиметрический метод – количественный анализ состава и свойств веществ, основанный на измерении количества света, поглощённого суспензией. Этот метод используется для определения антимикробной активности исследуемых субстанций, вызывающих лизис живой культуры. Об литической активности субстанции судят по изменению оптической плотности среды, которую измеряют фотометрически [6].

Клинический метициллин-резистентный штамм *S. aureus* Sa2 использовали для оценки литической активности озвученного лизата *E. coli*

BL21(DE3)/pET21a. Для этого готовили смесь озвученного лизата и клеток *S. aureus* Sa2 в соотношении 1:10.

Для определения кинетики лизиса живых клеток *S. aureus* использовали планшетный спектрофотометр Bio-Rad xMark при длине волны 600 нм в трехкратной повторности в буфере 150 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl, 10 мМ DTT, pH 7.5, каждые 20 сек в течении 25 минут. Специфическую антимикробную активность рекомбинантного белка в каждой точке определяли, как изменение показателя OD600 за вычетом усредненных значений для контрольного образца без литического агента. Для контроля турбидиметрических показателей высевали культуру *S. aureus* после лизиса рекомбинантным эндолизином на поверхность питательной среды. Полученные данные показали, что все исследованные образцы озвученного лизата клеток *E. coli*, содержащего целевой рекомбинантный белок, эндолизин, обладают выраженным антистафилококковым эффектом.

Этот эффект выражается в значительном уменьшении показателя OD600 с течением времени, что связано с разрушением живых клеток *S. aureus*. Контрольные образцы без литического агента, эндолизина, сохраняли в течении 25 минут показатель OD600 на исходном уровне, что демонстрирует отсутствие литического эффекта без добавления рекомбинантного литического белка.

Заключение

В результате трансформации плазмидой pET21a, содержащей ген LysRC03, кодирующий синтез эндолизина, штамма *E. coli* BL21 получен штамм-продуцент эндолизина. При культивировании штамма-продуцента эндолизина на среде LB с добавлением 100 мг/л ампициллина, обнаружили его рост, что свидетельствовало о присутствии в нем рекомбинантной плазмиды.

В результате ультразвуковой дезинтеграции осуществлено разрушение клеток бактерии штамма-продуцента *E. coli* BL21 с высвобождением белка эндолизина. При этом, необходимо было получить белок преимущественно в

растворимой форме. При переходе в нерастворимую форму рекомбинантный белок терял свои ферментативные свойства и в процессе ренатурации ферментативные свойства белка не восстанавливались. После этапов центрифугирования нами был получен осветленный супернатант, который подвергли хроматографической очистке для получения целевого белка.

В результате проведенного электрофореза очищенного белка в полиакриламидном геле в присутствии SDS были получены специфические для белка эндолизина полосы, молекулярной массой 15–20 кДа.

Антимикробную активность рекомбинантного эндолизина на клинические штаммы *S. aureus* проверяли турбидиметрическим методом. В случае наличия белка эндолизина в исследуемой пробе, происходил подъем спектра поглощения. По результатам турбидиметрии, выявили активный процесс угнетения бактерий вида *S. aureus*, при этом положительный результат выглядит как гипербола. Отрицательный результат, то есть отсутствие микробиологической активности, изображен в виде прямой - выявлен в меньшем количестве проб. Для контроля турбидиметрических показателей после лизиса эндолизином высевали культуру *S. aureus* на поверхность плотной питательной среды. Показано, что рекомбинантный эндолизин *Lys* способен инактивировать клетки клинических штаммов *S. aureus*, что свидетельствует о сохранении его ферментативной активности.

Выводы

В ходе исследования были успешно решены все поставленные задачи.

1. Штамм *E. coli* BL21(DE3)-pET21a, продуцент рекомбинантного литического белка, был получен путем трансформации рекомбинантного

штамма *E. coli* BL21(DE3) векторной плазмидой pET21a, обеспечивающей экспрессию целевого белка.

2. После культивирования штамма *E. coli* BL21(DE3)-pET21a был получен озвученный бактериальный лизат с высоким содержанием рекомбинантного литического белка (эндолизина) в растворимой форме.

3. Антистафилококковая активность рекомбинантного литического белка была подтверждена на живых клетках *S. aureus* методом турбидиметрии, что свидетельствует о его способности лизировать клетки стафилококка.

Таким образом, все задачи исследования выполнены успешно

Список использованных источников

1 Makrides, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli* / S. C. Makrides // Microbiol. – 1996. – Vol. 60, Iss. 3. – P. 512–538. doi: 10.1128/mr.60.3.512-538.1996.

2 Sezonov, G. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth / G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, R. D'Ari // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189, Iss. 23. – P. 8746–8749. doi: 10.1128/JB.01 368-07

3 Choi, J. H. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli* / J. H. Choi, K. C. Keum, S. Y. Lee // Chem. Eng. Sci. – 2006. – Vol. 61, Iss. 9. doi: 10.1016/j.ces.2005.03.031

4 Pope, B. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli* / B. Pope, H. M. Kent // Nucleic Acids Res. – 1996. – Vol. 24, Iss. 3. – P. 536–537. doi: 10.1093/nar/24.3.536

5 Demain, A. L. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms / A. L. Demain, P. Vaishnav // Biotechnol. – 2009. – Vol. 27, Iss. 3. – P. 297–306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

штамма *E. coli* BL21(DE3) векторной плазмидой pET21a, обеспечивающей экспрессию целевого белка.

2. После культивирования штамма *E. coli* BL21(DE3)-pET21a был получен озвученный бактериальный лизат с высоким содержанием рекомбинантного литического белка (эндолизина) в растворимой форме.

3. Антистафилококковая активность рекомбинантного литического белка была подтверждена на живых клетках *S. aureus* методом турбидиметрии, что свидетельствует о его способности лизировать клетки стафилококка.

Таким образом, все задачи исследования выполнены успешно

Список использованных источников

1 Makrides, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli* / S. C. Makrides // Microbiol. – 1996. – Vol. 60, Iss. 3. – P. 512–538. doi: 10.1128/mr.60.3.512-538.1996.

2 Sezonov, G. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth / G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, R. D'Ari // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189, Iss. 23. – P. 8746–8749. doi: 10.1128/JB.01 368-07

3 Choi, J. H. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli* / J. H. Choi, K. C. Keum, S. Y. Lee // Chem. Eng. Sci. – 2006. – Vol. 61, Iss. 9. doi: 10.1016/j.ces.2005.03.031

4 Pope, B. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli* / B. Pope, H. M. Kent // Nucleic Acids Res. – 1996. – Vol. 24, Iss. 3. – P. 536–537. doi: 10.1093/nar/24.3.536

5 Demain, A. L. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms / A. L. Demain, P. Vaishnav // Biotechnol. – 2009. – Vol. 27, Iss. 3. – P. 297–306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

6 Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli* / L. Vidal [et al.] // Journal of biotechnology. – 2008. – Vol. 134, Iss. 1. – P. 127–136. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.01.011.

7 Poole, E. S. The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli* / E. S. Poole, C. M. Brown, W. P. Tate // The EMBO Journal. – 1995. – Vol. 14, Iss. 1. – P. 151–158. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb06985.x.

8 Sørensen, H. P. Advanced genetic strategies for recombinant expression in *Escherichia coli* / H. P. Sørensen, K. K. Mortensen // J Biotechnol. – 2005. – Vol. 115, Iss. 21. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.

9 A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli* / L. Briand [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. doi: 10.1038/srep33037.

10 Efficient soluble expression of disulfide bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* in fed-batch fermentations on chemically defined minimal media / A. Gąciarz [et al.] // Microbial Cell Factories. – 2017. – Vol. 16. – P. 100–108.

11 An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli* / B.C Joseph [et al.] // Journal of Cell Science & Therapy. – 2015. – Vol 6, Iss. 66. – P. 1–4.

12 Solar, G. Plasmid copy number control: an ever-growing story / G. Solar, M. Espinosa // Mol. Microbiol. – 2000. – Vol. 37, Iss. 3. – P. 492–500. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02005.x

