

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.  
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

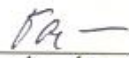
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 3 курса 331 группы  
направления подготовки 06.04.01 Биология  
профиль «Общая биология»  
биологического факультета  
Шпак Юлии Валерьевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

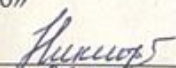
  
10.12.24  
дата, подпись

А.А. Галицкая

Научный консультант:

д.м.н., зав. сектором генной  
инженерии ФКУН Российский  
противочумный институт «Микроб»

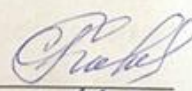
Роспотребнадзора

  
04.12.24  
дата, подпись

К.А. Никифоров

Заведующий кафедрой:

д.б.н., профессор

  
10.12.24  
дата, подпись

С.А. Коннова

Саратов 2024

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Инфекционные заболевания входят в десятку основных причин смерти во всем мире, ежегодно унося более четырёх миллионов жизней (по данным ВОЗ за 2020 год). Быстрое, чувствительное и видоспецифичное обнаружение патогенов является ключевым компонентом предотвращения распространения заболеваний [1].

К любому медицинскому изделию для *in vitro* диагностики, используемому в лабораторной практике предъявляют следующие требования: высокая чувствительность и специфичность, удобство и простота применения, стабильность в течение длительного времени, высокая воспроизводимость результатов, минимизация влияния человеческого фактора. Использование внешних и внутренних контрольных образцов в ПЦР-РВ позволяет контролировать ход всех стадий ПЦР-РВ в каждой пробирке с реакционной смесью, даёт возможность убедиться в работоспособности и сохранности всех компонентов РС ПЦР-РВ, позволяет проводить проверку ПЦР-РВ на отсутствие в них ДНК вследствие контаминации и обнаруживать ложноположительные результаты. Внесение положительного контроля на стадии экстракции ДНК даёт возможность определить, насколько эффективно прошло выделение ДНК в конкретной пробе и исключить контаминацию проб. Положительный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо материала клинического образца вносится контрольный препарат ДНК исследуемого возбудителя [2].

Положительный контрольный образец, используемый в каждой постановке ПЦР, должен соответствовать следующим требованиям:

- быть стабильным в течение срока хранения тест-системы;
- иметь точно измеренную концентрацию ДНК или РНК в препарате;
- быть стерильным; [3].

ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» выпускает наборы реагентов для выявления ДНК возбудителей особо опасных

инфекционных болезней, таких как холера, чума, сибирская язва, бруцеллёз и туляремия, как с электрофоретическим, так и с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов. Основным недостатком производимых препаратов, является отсутствие положительного контроля (ПКО). Важность присутствия ПКО в диагностических наборах отражается в руководстве по ПЦР-тестированию пищевых патогенов предложенная Европейским комитетом по стандартизации (CEN) в сотрудничестве с Международной организацией по стандартизации (ISO).

В связи с этим перспективным направлением является разработка положительных контрольных образцов для проведения ПЦР-РВ для разных ДНК-мишеней. Положительный контрольный образец (ПКО) в ПЦР представляет собой искусственно синтезированную олигонуклеотидную последовательность, строго соответствующую искомой. Для данной работы была выбрана тест система «Ген *Y. pestis* индикация-РГФ», так как чума является одной из наиболее разрушительных болезней, с которыми сталкивалось человечество за свою историю. Согласно историческим данным, от чумы погибли сотни миллионов человек.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы являлось получение штамма *E. coli* TOP10, генетически модифицированного коммерческим вектором pAL2-T, несущим последовательность гена *yihN* *Y. pestis* в качестве положительного контроля ПЦР-РВ тест-системы «Ген *Y. pestis* индикация-РГФ(регистрация графика флуоресценции)»

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Подобрать вектор для клонирования ДНК, наработать нуклеотидную последовательность для последующего получения рекомбинантного штамма;
2. Клонировать продукт амплификации;
3. Проверить полученный штамм на наличие специфического фрагмента ДНК с использованием ПЦР в режиме реального времени.

**Структура магистерской работы:** работа состоит из списка сокращений, введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор написан с использованием 47 источников, в нём рассмотрены следующие вопросы: актуальность разработки новых методов лабораторной диагностики чумы в настоящее время и использование методов генной инженерии для медико-биологических задач, получение нуклеотидной последовательности для последующего получения рекомбинантного штамма и отбор трансформированных клеток и клонирование клеток с рекомбинантной ДНК.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы исследования.** В качестве материалов для исследования использован штамм *Y. pestis* 400, для получения требуемой нуклеотидной последовательности путём проведения ПЦР. В качестве штамма, используемого для трансформации, был штамм *E. coli* TOP-10.

Далее в разделе описаны основные методы, использованные в работе: экстракция ДНК, Получение ампликонов специфического фрагмента ДНК – гена *yihN*, электрофорез в агарозном геле, очистка олигонуклеотидов и коротких фрагментов ДНК, клонирование и выделение плазмидной ДНК.

### **Результаты и обсуждение.**

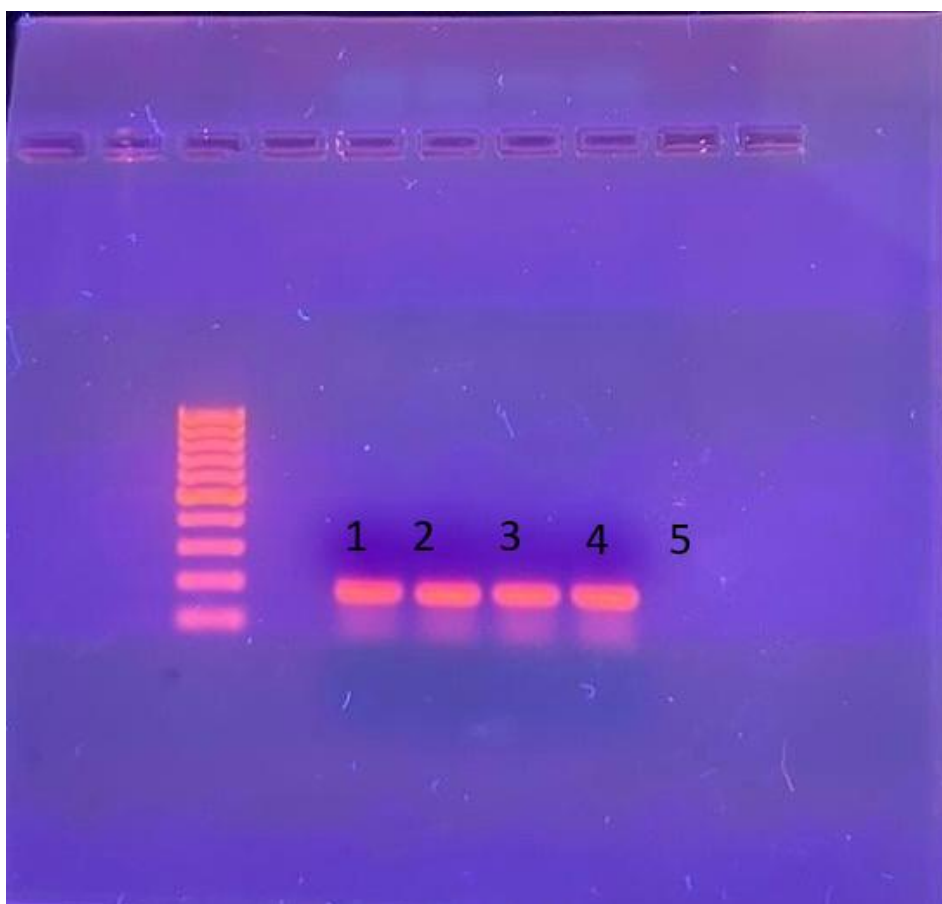
В ходе проведения исследования при постановке ПЦР была наработана нуклеотидная последовательность гена *yihN*, для последующего клонирования продуктов амплификации при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров *yihN*-S (CCAATATCGTGGCTATCGTG) и *yihN*-As (CGCGGTGTGATTGATGTACT) и фермента Taq-полимеразы.

Для подтверждения наличия ожидаемых продуктов ПЦР по завершении амплификации 10 мкл образца каждой ПЦР-реакции подвергали электрофорезу в 2 % агарозном геле.

Результаты электрофореза регистрировали в присутствии бромистого этидия, интеркалирующего вещества, образующего с фрагментами ДНК устойчивое соединение.

Визуализацию полученных результатов проводили с помощью трансиллюминатора ETX - Intense Signal с использованием маркера молекулярных масс - 100 bp DNA Ladder, (Thermo Fisher Scientific, США).

После проведения электрофореза образовались фрагменты анализируемой ДНК в виде чётких светящихся полос представленных на рисунке 12, где 1 клон – *E. coli* №1, 2 клон - *E. coli* №2, 3 клон- *E. coli* №3, 4 – положительный контрольный образец, 5 – отрицательный контрольный образец на котором отсутствует фрагмент, что говорит об отсутствии контаминации на этапе ПЦР.



1-Клон *E. coli* №1

2-Клон *E. coli* №2

3-Клон *E. coli* №3

4-Положительный контрольный образец

5- Отрицательный контрольный образец

Рисунок 12- Результаты электрофореза

Фрагмент ДНК, предназначенный для клонирования, был очищен от реакционного буфера на колонках.

Подготовленные вектор рAL2-Т и последовательность фрагмента гена *yihN* лигировали с использованием ДНК лигазы бактериофага Т4. Далее была выполнена трансформация с помощью электропоратора. С целью создания электростатического поля в растворе ячейки суспензию клеток набрали пипеткой в пластиковую кювету, по бокам которой расположены два алюминиевых электрода. Для бактериальной электропорации использовалась суспензия объёмом 50 микролитров. Установили напряжение и емкость, и вставили кювету в электропоратор. Процесс требует прямого контакта электродов с суспензией, следовательно сразу после электропорации к бактериям добавили один миллилитр жидкой среды (в кювете или в пробирке Эппендорфа), и пробирку инкубировали при оптимальной температуре бактерий 37 °С в течение часа при покачивании в среде богатой питательными веществами (SOC) чтобы обеспечить восстановление клеток с последующим культивированием бактерий на агаровых чашках.

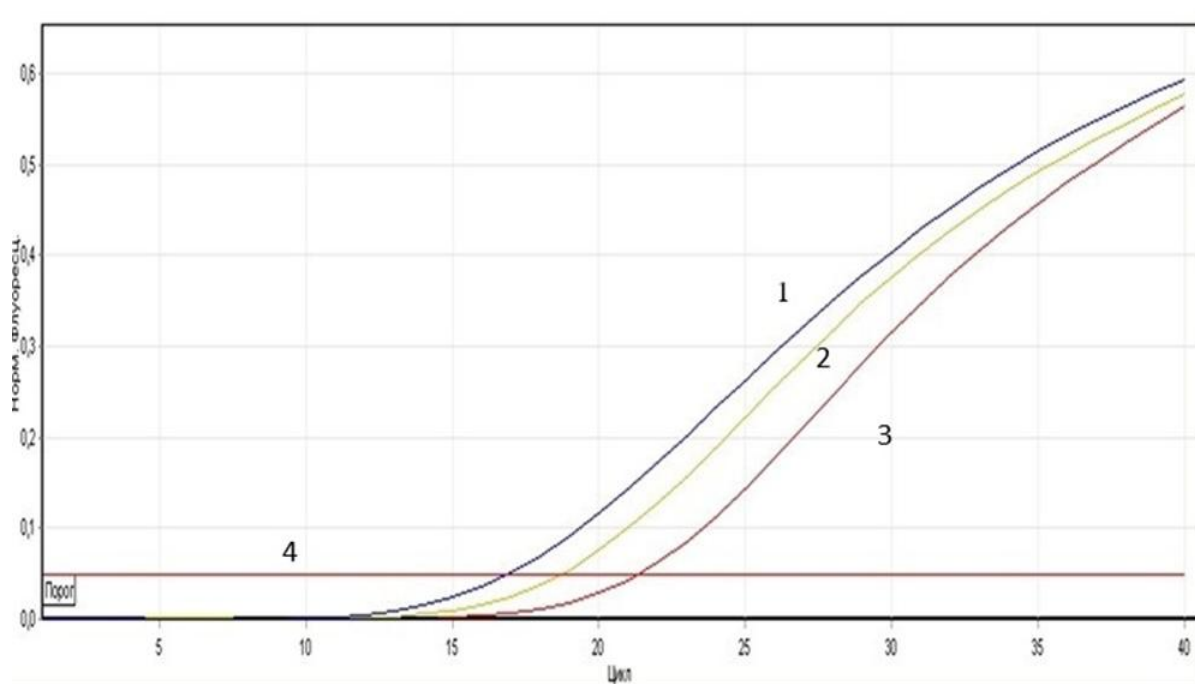
После трансформации произвели пересев бактерий на чашку Петри с агаризованной селективной средой LB с ампициллином и инкубировали в термостате при +37 °С в течение 14-16 ч, в результате был получен рост колоний, где, на 10 микролитров выросло 34 колонии, на 100 мкл – 325 колоний. В результате трансформации компетентных клеток *E. coli* TOP10 лигазными смесями были получены клоны, несущие ген *yihN* *Y. pestis*.

Далее выполнили повторный пересев четырех колоний на среду LB с ампициллином с последующей инкубацией в термостате при +37 °С. Произвели отбор колоний для последующего приготовления температурных лизатов. Приготовили и подписали пробирки типа эппендорф и добавили дистиллированную воду для последующего добавления бактериальных колоний. Прогрели данную суспензию в твердотельном термостате при +37 °С 10 мин.

Далее с полученными образцами выполнили экстракцию ДНК с применением комплекта реагентов «РИБО-преп» согласно прилагаемой инструкции производителя. Перед проведением экстракции ДНК произвели обеззараживание исследуемого материала согласно МУ 3.1.3.2355-08 «Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации»

Для выявления рекомбинантных колоний следующим этапом был скрининг колоний методом ПЦР-РВ. В составе реакционной смеси присутствовал флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизовался с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего произошло нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволило регистрировать наличие вставки нуклеотидной последовательности гена *yihN* путём измерения интенсивности флуоресцентных сигналов.

В представленном ниже графике на рисунке 13, кривая флуоресценции имеет стандартный S-образный вид, зона экспоненциального роста начинается в среднем с 15 цикла, плавно выходя на плато в районе 40 цикла. Значение порогового числа циклов (Ct) положительного контроля равно 22, значение Ct клона 1 *E. coli* равно 17, значение Ct клона 2 *E. coli* равно 19, кривая флуоресценции отрицательного контроля осталась неизменной, что свидетельствует об отсутствии контаминации на этапе ПЦР.



- 1- Клон *E. coli* №1
- 2- Клон *E. coli* №2
- 3- Положительный контроль
- 4- Отрицательный контроль

Рисунок 13 – График флуоресценции полученный с использованием тест системы «Ген *Y. pestis* индикация-РГФ» с ДНК генетически модифицированных штаммов

Плазмиды с фрагментом гена успешно выявилась с помощью ПЦР, это подтверждает, что все интересующие последовательности были правильно лигированы в плазмидные векторы и могут быть использованы в качестве положительных контрольных образцов. Для длительного хранения и последующего применения штаммы находятся в виде суспензии микроорганизмов в стабилизирующем растворе в замороженном состоянии при температуре минус 70 °С.

Таким образом, разработан положительный генноинженерный контроль тест системы «Ген *Y. pestis* индикация-РГФ». Созданный вариант ПКО может успешно применяться в производстве ПЦР тест-систем для



верификации получаемых результатов и позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с недостатком положительных контролей в тест системах, производимых ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, актуальна была разработка такого контроля для ПЦР тест-системы «Ген *Y. pestis* индикация-РГФ».

В качестве положительного контроля выступал ген чумного микроба *yihN*. Его последовательность была получена методом ПЦР с использованием специфических праймеров, затем она была лигирована с плазмидным Т-вектором pAL2-T.

Далее методом электропорации этот вектор с встроенной в него последовательностью фрагмента гена *yihN* был привнесён в клетки штамма *E. coli* TOP-10. Затем на основании наличия селективного признака (ампициллинрезистентность), кодируемого плазмидой pAL2-T, были отобраны колонии, несущие эту плазмиду.

Затем после накопления биомассы отдельных клонов, был осуществлён их лизис, и проведена ПЦР-РВ (с праймерами и зондом тест-системы «Ген *Y. pestis* индикация-РГФ») для оценки наличия последовательности фрагмента гена *yihN*, и был отмечен рост сигнала флуоресценции в пробах.

Описанное выше свидетельствует о том, что нами был получен генно-инженерный продукт, который в дальнейшем поможет улучшить индикацию чумы, возбудителем которой является бактерия *Yersinia pestis*.

Таким образом, в результате проведения данной работы был разработан положительный контроль для тест-системы «Ген *Y. pestis* индикация-РГФ» для диагностики чумы на основе метода ПЦР-РВ.

## ВЫВОДЫ

1. Подобран вектор для быстрого клонирования продукта ПЦР (pAL2-T), представляющий собой линейризованную плазмиду, имеющую на концах выступающие остатки тимина, что обеспечило нам эффективное клонирование продукта ПЦР без использования рестрикции. В ПЦР Нарботана нуклеотидная последовательность фрагмента гена *yihN* для последующего получения рекомбинантного штамма *E. coli*.

2. Продукты амплификации лигированы с вектором pAL2-T, что позволило использовать их для трансформации компетентных клеток *E. coli* TOP-10.

3. Получен штамм *E. coli* TOP-10, несущий плазмиду pAL2-T с фрагментом гена *yihN* чумного микроба. Созданный штамм предложен к использованию в качестве положительного контроля в ПЦР тест-системе «Ген *Y. pestis* индикация-РГФ».

## Список использованных источников

- 1 Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli* / P. Jonasson [et al.] // Biotechnol Appl Biochem. – 2002. – Vol. 35. N.2. – P. 91- 105.
- 2 García, J. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* / J. García // VacciMonitor. – 2013. – Vol. 22, N. 2. – P. 30-39.
- 3 Блюм, Я.Б. Биотехнология в современном мире: польза и риски / Я.Б. Блюм // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36. – №1. – С. 59-80.

