МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского**

**А.Д. Перенков**

**Е.А. Василенко**

**В.В. Мохонов**

**Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии.**

**Часть 4. ВВЕДЕНИЕ В ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ИНЖЕНЕРИЮ ПРОКАРИОТ**

*Учебно-методическое пособие*

Рекомендовано методической комиссией

Института биологии и биомедициныдля студентов ННГУ,

обучающихся по направлению подготовки

06.03.01 «Биология»

Нижний Новгород

2019

УДК 577.2(076.5)

ББК Е07-5я73

П62

П62 Перенков А.Д., Василенко Е.А., Мохонов В.В. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 4. Введение в генетическую инженерию прокариот. Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2019. – 27 с.

Рецензент: к.б.н., с.н.с. **А.Г. Точилина**

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов четвертых курсов института биологии и биомедицины, обучающихся по направлению подготовки 06.03.01 «Биология», изучающих молекулярную биологию и биотехнологию. В пособии изложены основные подходы и методы работы с клетками прокариот для получения рекомбинантных белков.

Ответственный за выпуск:

председатель методической комиссии Института биологии и биомедицины ННГУ, к.б.н., **Е.Л. Воденеева**

УДК 577.2(076.5)

ББК Е07-5я73

**© Нижегородский государственный**

**университет им. Н.И. Лобачевского, 2019**

**© Перенков А.Д.,** **Василенко Е.А., Мохонов В.В., 2019**

**СОДЕРЖАНИЕ**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **ВВЕДЕНИЕ**………………………………………………………………….. | | | 4 |
| **1.ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**……………………………………………. | | | 5 |
|  | 1.1 | Введение в генетическую инженерию**.**………..………………....... | 5 |
|  | 1.2 | Получение ДНК изучаемого гена..…………………………………. | 5 |
|  | 1.3 | Векторы, используемые в молекулярном клонировании…………. | 7 |
|  | 1.4 | Ферменты, используемые в генетической инженерии**…………**…. | 12 |
|  | 1.5 | Выбор организма-продуцентарекомбинантного белка …**……**…. | 14 |
|  | 1.6 | Методы трансформации клеток…**……**….…**……**….…**……**……... | 18 |
|  | 1.7 | Селективные маркеры**…**….…**………**….…**……**...….…**……**……... | 19 |
|  | 1.8 | Тельца включения**…**….…**………**….…**……**...….…**……**……......... | 20 |
|  | 1.9 | Хроматографическиеметоды очистки рекомбинантного белка… | 20 |
| **ЛИТЕРАТУРА**……………………………………………………………… | | | 26 |

**ВВЕДЕНИЕ**

Пособие предназначено для оказания помощи студентам в самостоятельной подготовке к занятиям по молекулярной биологии, которое изучается в 7 семестре студентами очной формы обучения по направлению подготовки 06.03.01 «Биология».

Проведение практических занятий направлено на знакомство с методами, используемыми в генетической инженерии прокариот. В соответствии с программой практическим занятиям предшествуют теоретические вопросы по изучаемым темам. Необходимо помнить, что практические занятия проводятся с целью углубления уже полученных ранее теоретических знаний и выработки практических умений и навыков в применении молекулярно биологических методов.

Основное время занятия посвящено выполнению практических заданий под руководством преподавателя. Перед выполнением задания необходимо внимательно изучить и уяснить содержание и особенности всех методов, выслушать инструктаж преподавателя о правилах обращения с лабораторным оборудованием, поскольку несоблюдение может привести к его порче.

В ходе выполнения задания его описание и результаты заносятся в спе­циальную тетрадь, которую после занятия сдают преподавателю для проверки в качестве отчета о выполнении работы.

**1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

**1.1. Введение в генетическую инженерию**

Генетическая инжене́рия (генная инженерия) — совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов, осуществления манипуляций, и введения их в другие организмы, а также получения искусственных организмов после удаления выбранных генов из ДНК. Наиболее простыми организмами, которые уже на протяжении сто­летий на­ходят ши­рокое при­мене­ние в раз­личных сфе­рах че­лове­чес­кой де­ятель­нос­ти (хлебопе­чении, ви­ноде­лии, пи­вова­рении, при при­готов­ле­нии кис­ло­молоч­ных про­дук­тов и т.п.), являются микроорганизмы. Уже в середине 70-х годов микроорганизмы начинают применять в биотехнологическом производстве биологически активных веществ. В нас­то­ящее вре­мя с по­мощью ме­тодов ген­ной ин­же­нерии кло­ниро­вано бо­лее 500 ге­нов раз­личных бел­ков че­лове­ка, ко­торые уже яв­ля­ют­ся лекарственными средствами. Так, например, в ки­шеч­ной па­лоч­ке (*Escherichia coli*) получено более семидесяти белков выс­ших э­ука­ри­от: со­матос­та­тина, ин­су­лина, эн­ке­фали­на, про­те­ин­ки­назы ви­руса сар­ко­мы Ра­уса, гор­мо­на рос­та че­лове­ка, ин­терфе­рона фиб­роблас­тов че­лове­ка, лей­ко­цитар­но­го ин­терфе­рона, ан­ти­гена ви­руса ге­пати­та В, хи­мози­на, гор­мо­на рос­та бы­ка и д.р.

# 1.2 Получение ДНК изучаемого гена

# Первым этапом любой генно-инженерной работы является изучение генетической карты гена интереса. Значительная база данных по генам человека содержится на портале NCBI в разделе Nucleotide. Для удобства работы обычно используют различные пакеты программ, позволяющие создавать карту генов и отмечать необходимые области (например, экзоны и интроны). Одной из пакетов программ является DNASTAR (рис. 1).

Для создания генетической конструкции эукариотического рекомбинантного белка чаще используют мРНК целевого гена, т.к. последовательность не содержит интронов. Если последовательность гена неизвестна, то первым этапом будет проведение секвенирования (описано ранее в методическом пособии №2). После изучения генетической карты выбирают необходимый участок для последующего клонирования. Клонированиегена – это процесс выделения заданной последовательности ДНК и получения множественных копий *in vitro*. Если ген принадлежит эукариотическому организму, то клонирование проводят методом ОТ-ПЦР, предварительно выделив тотальную мРНК из имеющихся клеток (метод выделения описан ранее в методическом пособии №2). Прокариотические гены клонируют с помощью ПЦР и используют в качестве матрицы ДНК организма. Для проведения ПЦР подбирают пару специфических праймеров, используя генетическую карту. Часто праймерами вносят мутации, делеции и/или создают сайты для ферментов (например, участки, кодирующие нерастворимые трансмембранные домены в белке). Метод ПЦР и ОТ-ПЦР описан в предыдущих изданиях, стоит лишь отметить, что в генетической инженерии при проведении этапа ПЦР используют другие ферменты. Проблема часто используемой в ПЦР Taq полимеразы состоит в недостаточной точности синтеза, поэтому обычно используют другие ферменты. Например, полимераза Pfu – высокотермостабильная и гиперактивная мономерная ДНК-полимераза с 5´-3´-полимеразной и 3´-5´-эндонуклеазной активностью. Данная полимераза изолирована из сверхтермофильной морской архебактерии *Pyrococcus furiosis* (Pfu). Фермент используется для проведения ПЦР и считается, что он имеет преимущество перед Taq полимеразой, поскольку обладает способностью узнавать ошибки спаривания нуклеотидов. Pfu-полимераза способна удалять ошибочные 3´-концевые нуклеотиды из комплекса праймер-матрица и включать комплементарные нуклеотиды. Taq-полимераза не обладает такой активностью. Изучение средней частоты ошибок (частота мутаций/дупликаций) разных полимераз показало их увеличение в следующем порядке: *Pfu* (1,3 x 10-6) < *Deep Vent* (2,7 x 10-6) < *Vent* (2,8 x 10-6) < *Taq* (8,0 x 10-6). На базе Pfu -полимеразы создают различные улучшенные модификации, одной из которых является PfuUltraII ДНК-полимераза. PfuUltraII-полимераза сочетает наивысшую точность (1 ошибка на 2,5 млн.п.о.), скорость синтеза (1000 н / 15 сек) и позволяет амплифицировать фрагменты до 19 т.п.о.

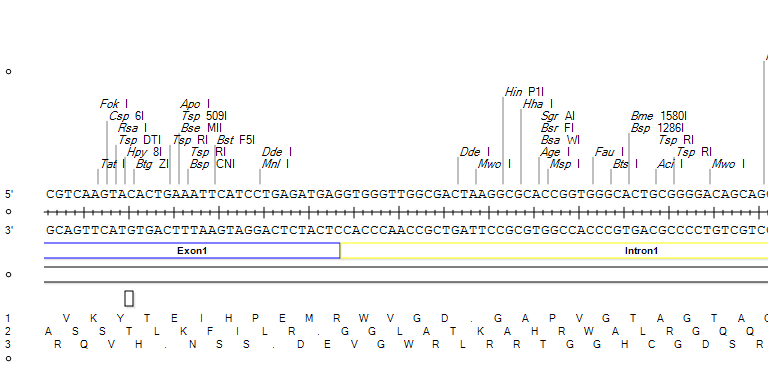
****

Рис. 1. Фрагмент карты гена CD38, полученной с помощью SeqBuilder пакета программ DNASTAR

После получения больших концентраций целевого фрагмента гена производят его очистку от смеси компонентов ПЦР. Для этого проводят электрофорез в агарозном геле с полученной смесью и маркером молекулярной размерности ДНК (метод описан в методическом пособии №3). Затем, ориентируясь по маркеру молекулярной размерности ДНК, вырезают из геля необходимый фрагмент и очищают его от геля с помощью коммерческих наборов согласно инструкции производителя. После такой процедуры получается очищенный фрагмент гена интереса в высокой концентрации, готовый для создания генетической конструкции.

**1.3 Векторы, используемые в молекулярном клонировании**

Вектор (от лат. vector везущий, несущий) – это молекула-переносчик исследуемого фрагмента нуклеиновой кислоты, которая автономно существует в цитоплазме или встраивается в геном клеток и передается вместе со встроенным в нее исследуемым фрагментом нуклеиновой кислоты от одной клетки к другой. Выбор подходящего вектора осуществляют на этапе подбора праймеров для ПЦР, т.к. в некоторых случаях требуется внести мутацию для последующего клонирования целевого фрагмента ДНК.

Вектор должен содержать все необходимые регуляторные элементы, обеспечивающие его репликацию и экспрессию целевого гена в выбранной системе экспрессии (бактериальные клетки, дрожжи, клетки насекомых или млекопитающих и т.д.). В основном, в генетической инженерии прокариот используются плазмидные вектора, представляющие собой модифицированные плазмиды бактерий. Популярность плазмидного вектора связана с дешевизной и простотой работы с такими векторами в отличие от интегративных векторов. Максимальный размер целевого гена, который можно интегрировать в плазмидный вектор может достигать 10 тысяч пар оснований. Так же в генетичекой инженерии используются векторы: фазмидные, комидные, BAC, YAC, MAC и др. Фазмидные векторы представляют собой гибрид между бактериофагом и плазмидой. Они содержат генетические элементы характерные для плазмиды и участки ДНК бактериофага, что позволяет проникать в клетку по типу бактериофага и существовать в ней в виде плазмиды. Подобное совмещение позволяет увеличить емкость целевого гена, вносимого в фазмиду, до 25 тысяч пар оснований. Еще одной разновидностью векторов являются космиды, которые представляют собой плазмиды с cos-сайтами бактериофага лямбда. Cos-сайты способствуют плотной упаковки фрагмента заключенного между ними. Таким образом, плотная упаковка способствует увеличению емкости вектора до 45 тысяч пар оснований. После проникновения внутрь бактериальной клетки космиды начинают проявлять все свойства типичной плазмиды.

Векторные системы, основанные на искусственных хромосомах бактерий называют BAC (bacterial artificial chromosome). В них используется ДНК полового фактора (F-фактора) *E. coli* – большой плазмиды «мужских» бактериальных клеток, которые являются донорами бактериальной ДНК при конъюгации с женскими клетками. Подобные структуры еще называют мини-хромосомами бактерий, что связано с емкостью данного вектора  до 300 тысяч пар оснований.

Аналогичная мини-хромосома создана и для дрожжей  (YAC ̶ yeast artificial chromosome). Векторы YAC существуют в среднем в виде одной копии на клетку и являются челночными. Челночными называют вектора, содержащие участки репликации как в прокариотических, так и в эукариотических клетках.  YAC содержит две теломерные последовательности нуклеотидов TEL, которые необходимы для репликации концов мини-хромосомы, область начала репликации ARS1, соединенную с последовательностью центромеров и ряд селективных маркеров. Все это позволяет увеличить емкость вектора до 700 тысяч пар оснований.

В последнее время особое внимание уделяется созданию векторов на базе искусственных хромосом млекопитающих (MAC ̶ mammalian artificial chromosomes), которые содержат все структурные элементы обычных хромосом (такие как теломеры, центромеры и др.). Такие мини-хромосомы способны нести полноразмерные гены с регуляторными элементами вплоть до миллионов тысяч пар оснований.

Рассмотрим более подробно прокариотический плазмидный вектор, который представляет собой небольшую кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК (5-10 тыс. пар нуклеотидов), несущую ген целевого белка под контролем определённого промотора. Кроме этого в состав вектора входят: точка начала репликации (англ. *origin of replication*), которая способствует поддержанию постоянного количества плазмиды и её наследования дочерними клетками; полилинкерный участок, который содержит короткие (6-8 н.о.), обычно палиндромные последовательности для узнавания специфическими эндонуклеазами рестрикции (гидролизуют двухцепочечную ДНК в определённом месте) и позволяют встраивать целевой ген; а также маркерный ген, который придает бактерии с таким вектором определённое свойство, позволяющее отличать её от немодифицированной бактерии. В качестве маркерного гена обычно используется ген резистентности к определенному антибиотику, что позволяет не только осуществить отбор успешно трансформированных колоний, но и защитить клеточную культуру от заражения нежелательными микроорганизмами. Используют чаще один ген резистентности, но вполне типичным является использование и двух генов резистентности одновременно. Еще одним часто используемым маркерным геном является β-галактозидаза – модифицированный ген *E. coli*, кодирующий фермент β-галактозидазу, которая гидролизует различные галактозиды с образованием окрашенного продукта. Например, при добавлении в среду с модифицированными бактериями 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D галактозида, образуется голубой продукт реакции.

Одним из первых разработанных плазмидных векторов был pBR322, созданный в 1977 году мексиканскими биологами Франциско Боливаром и Раймондом Родригесом (рис. 2). pBR322 расшифровывается как: «p» – от aнглийского слова «plasmid»; буквы «B» и «R» обозначают первые буквы фамилий создавших вектор исследователей; число 322 - цифровое обозначение, взятое из исследовательских протоколов этих ученых. pBR322 содержит 4361 нуклеотидную пару и состоит из участка репликации *ori*; гена *ampR*, кодирующего белок, обеспечивающий устойчивость к ампициллину и гена *tetR*, придающего устойчивость к тетрациклину. Плазмида содержит уникальные сайты рестрикции для более чем 40 рестриктаз, при этом 11 из них находятся внутри гена *tetR*, 6 сайтов – внутри гена *ampR*.

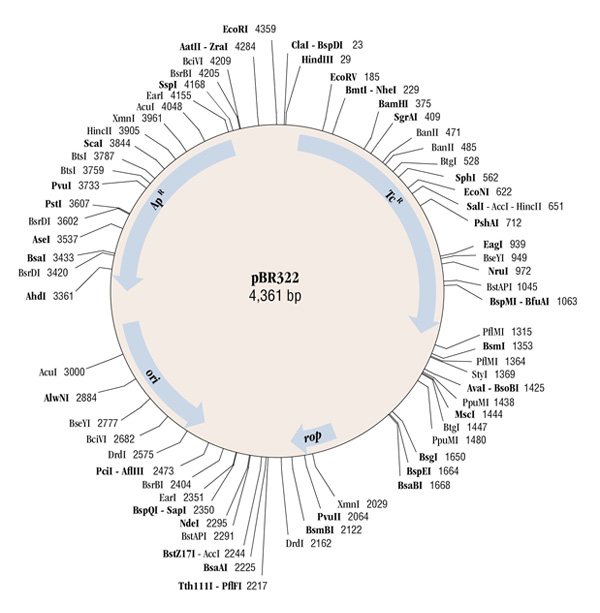


Рис. 2. Физическая карта вектора pBR322 с указанием сайтов рестрикции различными эндонуклеазами

При выборе плазмидного вектора стоит обратить внимание на промотор, который будет активировать экспрессию целевого гена. Промоторы делятся на индуцибельные и конститутивные. Конститутивные промоторы – это нерегулируемые промоторы, обеспечивающие постоянную транскрипцию контролируемых ими генов, а индуибельные – активируют транскрипцию гена добавлением активатора. В генетической инженерии бактерий чаще используют индуцибильные промоторы, что связано с рядом преимуществ. Во-первых, зачастую кодируемые вектором белки оказывают крайне негативное влияние на жизнеспособность бактерии, т.к. токсичны. Поэтому, если вектор начинает активно транскрибировать белки сразу после попадания в клетку бактерий, то последние не успевают сформировать достаточную биомассу, что значительно снижает общий выход белка интереса. Связано это еще и с тем, что синтез векторных белков задействует большое количество ресурсов бактериальной клетки (кодируемые вектором белки составляют около 10% от всех клеточных белков). Кроме того, при использовании конститутивного промотора достаточно сложно отследить начало и конец эксперимента.

Наиболее распространенными индуцибельными промоторами являются:

1) промотор на основе регуляторных элементов лактозного оперона *E. coli* (*lac*-оперона) - Lac-промотор;

2) промотор на основе регуляторного механизма pL бактериофага λ.

Лактозный оперон активируется только при наличии в срезе лактозы и ингибируется наличием в среде глюкозы, что позволяет жестко регулировать его деятельность. Недостатком лактозного оперона является относительно «слабый» промотор, поэтому в штаммах-продуцентах его обычно заменяют на более процессивный. Сила промотора – это частота, с которой молекулы РНК-полимеразы могут связываться с консенсусными последовательностями в промоторе и обеспечивать инициацию транскрипции прилежащего гена. Сильные промоторы часто получают из патогенов организма-продуцента. Наиболее широко используемые в генной инженерии прокариот сильные промоторы выделены из бактериальных вирусов (бактериофагов). Одним из наиболее распространенных является промотор фага Т7. Так как у прокариот нет РНК-полимеразы, которая бы узнавала промоторы бактериофагов, поэтому предварительно в организм-продуцент встраивают ген РНК-полимеразы соответствующего бактериофага. Если такой штамм бактерии трансформировать вектором, несущим целевой ген под контролем комплекса «промотор фага Т7 и *lac*-оперон», то возникнет двухуровневый механизм ингибирования транскрипции целевого гена (рис. 3). При использовании такой конструкции в питательную среду добавляют глюкозу и лактозу. В течение некоторого времени основным источником углерода в клетке будет глюкоза, которая подавляет синтез Т7-РНК-полимеразы, а значит и синтез чужеродного белка полностью подавлен. Это позволит активно делиться клеткам бактерий и наращивать биологическую массу. К моменту истощения в среде глюкозы клетки будут переходить на метаболизм лактозы и начнется синтез Т7-РНК-полимеразы. К этому времени клетки будут обладать уже достаточной биомассой для синтеза целевого белка. Другой вариант использования данной конструкции связан с добавлением в среду индуктора или его более стойкого заменителя непосредственно для начала синтеза целевого гена при оптимальной плотности культуры клеток. В качестве индуктора синтеза белка используют синтетический аналог лактозы – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). ИПТГ запускает транскрипцию lac-оперона, при этом наличие атома серы в составе ИПТГ предотвращает разложение индуктора. Для индукции лактозного оперона ИПТГ используют в концентрациях от 0,01 до 2 мМ.

Рис. 3. Схема работы промотора на основе фага

На основе промотора фага Т7 и регуляции промотора по типу *lac*-оперона создано большое количество плазмидных векторов серии pET (plasmid E.coli T7 promotor). Системы экспрессии, основанные на векторах серии pET, являются самыми мощными на сегодняшний день инструментами для продукции рекомбинатных белков в различных штаммах *E. сoli,* содержащих мРНКТ7-полимеразы. pET векторы являются индуцибельными, что позволяет регулировать уровень наработки целевого белка в широком диапазоне. В настоящий момент разработано более 50 векторных плазмид серии «pET». Векторные плазмиды рЕТ отличаются генами устойчивости к различным антибиотикам, наличием или отсутствием сигнального пептида, а также полилинкерным регионом. Например, pET-9с содержит ген устойчивости к канамицину и полигистидиновую последовательность, но сигнальный пептид у этой плазмиды отсутствует (рис. 4).

Другой распространенный промотор создан на основе регуляторного механизма pL бактериофага λ. Промотор pL репрессируется белком CI, мутантная форма которого является термочувствительной (CI857). Белок CI857 способен репрессировать промотор pL при температуре около 30⁰С, при повышении же температуры до 42ºС он теряет свою репрессорную активность. Поэтому при использовании системы с репрессором CI857 бактериальную культуру выращивают до нужной оптической плотности при 30⁰С и активируют экспрессию, поднимая температуру до 42ºС.

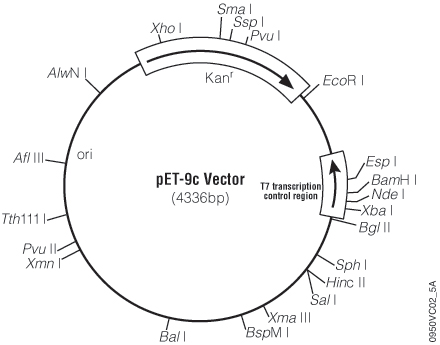


Рис. 4. Физическая карта вектора pET-9с с указанием сайтов рестрикции различными эндонуклеазами

Следующим этапом создания генетической конструкции после получения чистых фрагментов ДНК гена интереса и выбранного вектора является их объединение. Для этих целей используются различные ферменты.

**1.4 Ферменты, используемые в генетической инженерии**

Нуклеазы — это ферменты, разрывающие связи между нуклеотидами в цепи, молекул нуклеиновых кислот (НК). Существуют **дезоксирибонуклеазы, которые разрывают связи в** молекулах ДНК и **рибонуклеазы, разрывающие связи в** молекулах РНК. Некоторые нуклеазы удаляют по одному нуклеотиду с концов нуклеотидной цепи, они называются **экзонуклеазами**. Ферменты, которые разрезают молекулы НК во всех других местах, называются **эндонуклеазами**.

Ферменты рестрикции называются в зависимости от вида бактерий, которые их продуцируют. Обычно название начинается с трех букв. Первая, заглавная, — это первая буква названия рода бактерий, а вторая и третья — первые буквы названия вида. За тремя буквами следуют три римские цифры, обозначающие тип фермента, выделенный из этого вида бактерий. Если фермент выделен из специфического штамма бактерий, то четвертая буква указывает на название штамма. Несколько примеров:

* *EcoRI* — первый фермент, выделенный из *E. coli* штамма RY13;
* *PstII* — второй фермент, выделенный из *Providentia stuartii*;
* *HindIII* — третий фермент, выделенный из *Haemophilus influenzae*.

[Эндонуклеазы рестрикции](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B0%D0%B7%D0%B0_%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B8) вносят разрывы в обе цепи ДНК, расщепляя её на две части. В зависимости от специфичности разрезания ДНК, образуются продукты, имеющие разное строение концов:

* **«Липкие» концы** имеют выступающие одноцепочечные участки. При этом выступающие участки двух образующихся фрагментов [комплементарны](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BC%D0%BF%D0%BB%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B0%D1%80%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%8C_%28%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F%29) друг другу. Ввиду продольной асимметричности молекулы ДНК, концы её цепей неравнозначны. Они обозначаются 3' и 5' в соответствии с нумерацией атомов в [2-R-дезоксирибофуранозиде](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%B5%D0%B7%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%B1%D0%BE%D0%B7%D0%B0). Могут образовываться:
  + **«**липкие**»** концы с 5'-выступающими нуклеотидами (такие продукты образует эндонуклеаза рестрикции BamHI);
  + 3'-выступающие липкие концы, когда неспаренные нуклеотиды заканчиваются 3'-концом (такие продукты образует эндонуклеаза рестрикции AatII).
* **«Тупые» концы** образуются в случае, когда разрезание ДНК происходит строго по оси симметрии узнаваемой последовательности (пример эндонуклеазы рестрикции с такой специфичностью — EcoRV).

По месту рестрикции эндонуклеазы делят на три основных типа:

1) Эндонуклеазы первого типа гидролизуют двухцепочечную молекулу ДНК неподалеку от места узнавания последовательности нуклеиновой кислоты, причем само место гидролиза не строго специфично.

2) Эндонуклеазы рестрикции второго типа вносят разрыв в молекулу ДНК в фиксированной точке внутри участка распознавания.

3) Эндонуклеазы рестрикции третьего типа гидролизуют двойную спираль, отступив определенное число нуклеотидных пар от конца участка распознавания.

В генетической инженерии используют эндонуклеазы второго типа, поскольку именно они содержат фрагменты с одинаковыми последовательностями нуклеотидов (палиндромы) и позволяют конструировать химерные молекулы ДНК. Примером являются эндонуклеазы BamHI и EcoRI (рис. 5).

Эндонуклеазы рестрикции играют важнейшую роль при клонировании фрагментов ДНК. Когда две разные молекулы ДНК обрабатывают одним и тем же ферментом, а затем смешивают эти молекулы с добавлением лигаз, образуется одна новая ДНК — рекомбинантная ДНК.

https://habrastorage.org/files/9d6/e4e/591/9d6e4e5912ef4423b95fbbef6b09526f.gif

Рис. 5 Схема сайтов рестрикции эндонуклеаз BamHI и EcoRI.

ДНК**-**лигазы – это [фермент](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82)ы, [катализирующие](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B0%D1%82%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7) соединение двух молекул ДНК, которые приводят к образованию новой химерной молекулы. ДНК-лигазы делят на два типа:

1) ATФ-зависимые лигазы обнаруживают у бактериальных и эукариотических вирусов, архей, дрожжей, млекопитающих и эубактерий.

2) НАД+-зависимые лигазы имеются в основном у эубактерий.

В генетической инженерии чаще всего применяют ATФ-зависимую лигазу бактериофага Т4. Этот энзим катализирует образование фосфодиэфирных связей между **«**липкими**»** или **«**тупыми**»** концами полинуклеотидных цепей. В результате двухцепочечная структура молекулы ДНК восстанавливается. Также ДНК-лигаза Т4 может образовывать фосфодиэфирные связи между тупыми концами, которые сближаются друг с другом после того, как объединяемые фрагменты ДНК связываются с ферментом. Именно с помощью эндонуклеаз рестрикции и лигаз стало возможно создание рекомбинантной ДНК. С помощью таких ферментов можно объединить ДНК гена интереса и выбранного вектора.

**1.5 Выбор организма-продуцента рекомбинантного белка**

В настоящий момент в производстве рекомбинантных белков в России абсолютным лидером по использованию является *E. coli*. На ее долю приходится около 85% полученных рекомбинантных белков, 8% белков получены с помощью дрожжей и 7% остальных эукариотов. Кроме кишечной палочки так же часто используются *Bacillus* spp.; *Erwinia* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Rhizobium* spp.; *Saccharomyces cerevisiae*; *Pichia pastoris* и др.

К организму-продуценту предъявляют ряд требований: он должен быть безопасным для человека; обладать высокой скоростью размножения; расти на простых и доступных средах; образовывать суспензии высокой плотности. Для улучшения свойств выбранных организмов-продуцентов производят редактирование их генома с по­мощью ме­тодов ген­ной ин­же­нерии, что поз­во­ляет увеличить уровень продукции целевого бел­ка.

Наиболее изученными и экономически выгодными организмами-продуцентами являются прокариотические клетки, в частности *E.coli*. Средняя про­дук­тивность таких сис­те­м экс­прес­сии составляет 1–50 мг/л целевого белка. Однако, они имеют ряд недостатков: 1) отсутствие пострансляционных модификаций (таких как гликозилирование), важных для получения активных белков эукариот; 2) гиперэкспрессия целевого белка часто приводит к некорректному фолдингу и/или агрегации в виде нерастворимых включений (inclusion bodies), что ведет к инактивации белка, поэтому для восстановления биологической активности необходимо проводить дополнительный этап его ре­нату­рации, что иногда оказывается невозможным; 3) отсутствие достаточного количества тРНК, характерных для эукариот. Только аминокислота триптофан кодируется одним кодоном (UGG), а остальные аминокислоты кодируются разными кодонами от 2 до 6 (лейцин, серин, аргинин). Например, кодон GGA, кодирующий глицин у человека, используется в 26% случаев, а у *Escherichia coli* - в 9%; у человека частота использования кодонов UAA, UAG и UGA составляет 0,22, 0,17 и 0,61, соответственно, а у *E. coli* — 0,62, 0,09 и 0,30. Для каждого типа организмов существует своя предпочтительная частота использования кодонов (codon usage). Таким образом, экспрессия целевого гена, имеющего в своем составе редкие для клетки-мишени кодоны может быть затруднена вследствие низкой внутриклеточной концентрации тРНК, узнающей такие кодоны.

Самым распространенным прокариотическим организмом-продуцентом является *E. coli*, что связано с рядом преимуществ: отсутствие факторов патогенности; прос­то­та ус­ло­вий куль­ти­виро­вания; быс­трый рост; низ­кая себесто­имость, вы­сокие уров­ни синтеза рекомбинантных белков. Однако стоит отметить и ряд недостатков: не­эф­фектив­ное фор­ми­рова­ние ди­суль­фид­ных свя­зей, а вследствие, не­эф­фектив­ность ­корректного фол­динга; от­ли­чие набора ко­донов от со­от­ветс­тву­ющих э­ука­ри­оти­чес­ких; минимальные пост­тран­сля­ци­он­ные мо­дифи­кации. По этой причине в настоящее вре­мя уче­ные ак­тивно ра­бота­ют над созданием мутантных штаммов-продуцентов *E. coli*. Например, экспрессионный штамм BL21 CodonPlus имеет генотип F– *ompT* *gal* *dcm* *lon* *hsdSB*(*rB*–*mB*–) Tetr Camr [*malB*+]K-12(λS)[argU ileY leuW], где:

* F– — (F-фактор) это конъюгативная [эписома](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BF%D0%B8%D1%81%D0%BE%D0%BC%D0%B0) клеток [*Escherichia coli*](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B8%D1%88%D0%B5%D1%87%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D0%BF%D0%B0%D0%BB%D0%BE%D1%87%D0%BA%D0%B0) K-12, то есть клеточный элемент, необходимый для одного из типов полового процесса бактерий — [конъюгации](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%8A%D1%8E%D0%B3%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D1%83_%D0%B1%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%B9);
* OmpT — мутация в белковой протеазе VII наружной мембраны, что снижает протеолиз экспрессированных белков;
* *gal* — мутанты не могут метаболизировать галактозу;
* *dcm* — дефект в гене метилтрансферазы, позволяющий блокировать метилирование цитозина в последовательности CC(A/T)GG;
* *lon* — удалена АТФаза-зависимая протеаза Lon;
* *hsdSB*(*rB*–*mB*–) — отсутствие систем рестрикции-модификации ДНК;
* Tetr — устойчивости к тетрациклину;
* Camr — устойчивость к хлорамфениколу;
* [*malB*+]K-12(λS) — наличие мальтозных пермиаз;
* [argU (AGA, AGG), ileY (AUA), leuW (CUA)] — добавлены дополнительные гены тРНК аргинина, изолейцина, лейцина.

Еще один штамм *E. coli* TOP10, который используют для клонирования векторов и имеет генотип F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1, который расшифровывается как:

* mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) – мутации в системе рестрикции-модификации ДНК;
* φ80lacZ ΔM15 – наличие гена lacZ (β-галактозидаза) гидролизующий X-gal в среде. X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D галактозид), при гидролизе образует голубой продукт реакции;
* Δ*lac*X74 – удален lac оперон;
* nupG – мутация в гене, участвующем в транспорте нуклеотидов, приводящая к увеличению эффективности трансформации;
* recA1 – мутации в генах системы рекомбинации клетки;
* araD139 Δ(ara-leu)7697 – мутация в L-ребулоза-фосфат-4 эпимеразе, блокирующая метаболизм арабинозы;
* galE15 galK16 – штаммы не могут метаболизировать галактозу и устойчивы к фагу Р1;
* rpsL(StrR) – ген устойчивости к стрептомицину;
* endA1 λ- – мутация в эндонуклеазе 1, исключающая неспецифическую нуклеазную активность.

В настоящее время ведутся работы по созданию штаммов *E. coli,* способных к образованию корректных дисульфидных связей и пострансляционным модификациям в белке.

Еще одной распространенной системой экспрессии рекомбинантных белков является дрожжевая. Дрож­же­вые сис­те­мы экс­прес­сии обладают рядом преимуществ над прокариотическими, такими как: наличие пострансляционных модификаций белков (например, гликозилирование); возможность использования секреторной системы дрожжей для получения рекомбинантного белка внеклеточно, что упрощает его очистку.Кроме того, дрожжи относят к группе безопасных организмов («generally recognized as safe», GRAS), поэтому белковые препараты медицинского назначения, полученные в таких организмах, не требуют дополнительных исследований на токсичность. Стоит отметить, что дрожжи обладают специфическим типом гликозилирования - N-гликозилирования (гиперманнозилирование) и неэффективной секреций и фолдингом больших белков. Наибольшее распространение получили дрожжи *Pichia pastoris* и *Saccharomyces сerevisiae*. В последнее время разработаны штаммы *P. pastoris,* спо­соб­ные осу­щест­влять N-гли­кози­лиро­вание бел­ков, свой­ствен­ное клет­кам че­лове­ка.

В последние десятилетия в качестве организма-продуцента все больше используют клетки насекомых. Главным источником клеток является кукурузная лиственная совка (*Spodoptera frugiperda*), из которойполучены линии клетокSf9 и Sf21. Основными векторами, используемыми для экспрессии целевых белков в клетках насекомых, являются вирусными, например, используют вирус многоядерного полиэдроза (Autographa californica - AcMNPV), относящегося к группе бакуловирусов. Со времени разработки бакуловирусных систем экспрессии (BEVS) в 80-х годах в клетках насекомых, инфицированных бакуловирусами, успешно синтезированы сотни рекомбинантных белков. BEVS позволяет добиться значительного уровня экспрессии рекомбинантного белка, имеет эффективный фолдинг, N- и O-концевое гликозилирование, которое близко к млекопитающим. Однако, очень сложно получить стабильную клеточную линию для экспрессии белка из-за гибели клеток, вызванной модифицированным вирусом.

Очень привлекательной системой синтеза и накопления рекомбинантных белков  являются и растения. Прежде всего потому, что в растительных тканях нет риска загрязнения рекомбинантного белка вирусами животных и прионами*.* Растительные клетки обеспечивают правильный фолдинг и посттрансляционные модификации рекомбинантного белка, характерную для эукариотических клеток*.* Также растения имеют относительно низкую себестоимость, достаточно просты в освоении и обеспечивают высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка*.* Основными растениями, использующимися в генетической инженерии являются: разные видытабака (*Nicotiana* spp.), кукурузы (*Zea* spp*.*) и картофеля (*Solanum tuberosum*). Для введения вектора в клетки растений обычно используют почвенных агробактерий (Agrobacterium tumefaciens)*,* способной переносить фрагменты ДНК в растительную клетку. Стоит отметить, что растения обладают рядом недостатков при использовании в генетической инженерии: специфический растительный тип N-гликозилирования: (по остаткам ксилозы и фукозы), длительный и трудоемкий процесс достижения высокого уровня экспрессии рекомбинантного белка (таблица 1).

Таблица 1

Сравнение разных экспрессионных систем

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Критерий | Бактерии | Дрожжи | Клетки насекомых | Растения | Клетки млекопитающих |
| Простота в освоении | **+++** | **++** | **̶** | **+** | **̶** |
| Масштабируемость | **+++** | **++** | **+** | **++** | **±** |
| Уровень экспрессии | **+++** | **++** | **+** | **++** | **±** |
| Себестоимость | **+++** | **++** | **+** | **++** | **±** |
| Время получения белка | **+++** | **++** | **+** | **+** | **±** |
| Корректный фолдинг, образование S=S связей | **±** | **+** | **++** | **++** | **+++** |
| Возможность посттрансляционных модификаций | **±** | **+** | **++** | **+** | **+++** |

Самой перспективной системой для экспрессии белков человека являются клет­ки мле­копи­та­ющих. В них можно получить би­оло­гичес­ки ак­тивные бел­ки в на­тив­ной кон­форма­ции за счет корректного фол­динга и пост­тран­сля­ци­он­ных мо­дифи­каций. В настоящее время наибольшее распространение получили клетки линий: NSO (клет­ки ми­ело­мы мы­ши), BHK (клет­ки по­чек хо­мяка), CHO (клет­ки я­ич­ни­ков ки­тай­ско­го хо­мяч­ка), HEK-293 (эм­бри­ональ­ные клет­ки по­чек че­лове­ка). При всех очевидных плюсах, таких как отсутствие токсинов и наличие необходимых пост­тран­сля­ци­он­ных мо­дифи­каций, имеется ряд существенный ограничений: высокая себестоимость культивирования, а также сложность работы с культурами клеток. Выход целевого белка, экспрессируемого в клетках млекопитающих, может превышать 1 г/л, однако стоимость 1 грамма такого белка составляет в пре­делах от 0,3 до 10 тысяч дол­ла­ров США. В фар­ма­цев­ти­чес­ком про­из­водс­тве од­ной из на­ибо­лее рас­простра­нен­ных кле­точ­ных ли­ний мле­копи­та­ющих является СНО, которая хорошо трансфецируется, обладает коротким клеточным циклом деления и высоким потенциалом к продукции белка.

**1.6 Методы трансформации клеток**

Трансформация ̶ направленный перенос и встраивание в генетический аппарат клетки фрагмента чужеродной ДНК. После выбора организма продуцента и создания генетической конструкции необходимо определится с методом трансформации. Для трансформации используют компетентные клетки (это клетки способные к трансформации). В зависимости от метода трансформации компетентные клетки получают разными способами.

Наиболее распространенными методами трансформации являются химическая трансформация и электропорация. Химическая трансформация является самым простым методом, который не требует специального оборудования и позволяет получить выход трансформантов до 105-109 на 1 мкг веторной ДНК. Химические компетентные клетки можно трансформировать неочищенной реакционной смесью сразу после лигирования. Суть метода состоит в том, что клетки *E. coli* и ДНК эффективно взаимодействуют друг с другом при низких температурах в среде, содержащей двухвалентные катионы. Одним из таких методов является кальций-фосфатный, который предполагает смешение ДНК с хлоридом кальция и добавление его в фосфатно-буферный раствор. Образуются нерастворимые комплексы фосфата кальция и ДНК, которые легко поглощаются клетками. Однако стоит отменить что метода достаточно токсичен для клеток, что снижает их выживаемость и эффективность трансформации.

Другим методом трансформации является электропорация. Метод основан на увеличении проницаемости мембран под действием электрического тока. Это способствует переносу через мембраны макромолекул, размер которых превышает диаметр пор. Для проведения электропорации используют специальный прибор электропоратор. Частота трансформации клеток на 1 мкг вектора методом электропорации составляет 108-1011 и необходима дополнительная очистка проб ДНК. Важным этапом электропорации является подготовка электрокомпетентных клеток, суть которой заключается в очищении препарата от солей и добавлении криопротектора, т.к. процедуру проводят на холоде. При работе с неочищенными от солей препаратами проскакивает искра, тем самым резко снижая компетентность клеток, т.к. соли являются хорошим проводником и способны нарушить ионный баланс клетки при повреждении мембраны электрическим током.

**1.7 Селективные маркеры**

После проведения трансформации клеток необходимо отобрать клетки содержащие вектор. Для этих целей используют нехарактерные для организма продуцента гены находящиеся в векторе. Наибольшее распространение в качестве селективных маркеров получили гены устойчивости к различным антибиотикам. Трансформированные клетки для этого пересеивают на среды, содержащие подходящий антибиотик. Колонии клеток, не содержащие вектор, погибают под действием антибиотика, в то время как устойчивые колонии содержат необходимый клонированный фрагмент ДНК. Чаще всего используют гены устойчивости к канамицину, тетрациклину, ампициллину. Существуют и другие способы проведения селекции. Например, используют ген lacZ lac оперона, который кодирует β-галактозидазу (гомотетрамерный белок). Штамм-хозяин *E.coli* имеет делецию в гене lacZ первых 59 нуклеотидов (lacZα), которые содержатся в клонируемом векторе. В таком состоянии активный фермент может формироваться только при совместной экспрессии lacZ в геноме *E.coli* и фрагмента lacZα (α-пептид) в векторе. В гене lacZα вектора содержатся сайты рестрикции для встраивания целевого фрагмента. Если целевой ген встраивается в вектор, то структура lacZα нарушается и активной β-галактозидазы не образуется. Этот фермент превращает синтетический субстрат X-gal (5-бромо-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид) в нерастворимое синее соединение. Поэтому если колонии приобретают синюю окраску, то вектор не содержат вставку гена интереса в вектор, а колонии белого цвета ̶ содержат. Такую селекцию называют бело-голубой, что связано с цветом выросших на среде с X-gal колоний.

После проведения селекции для скрининга последовательности вектора на ошибки используют секвенирование по Сенгеру, описанное в методическом пособии №2. Если ошибок в последовательности не обнаружено, плазмиду используют для получения рекомбинантного белка. После индукции экспрессии проводят лизис клеток штамма-продуцента и анализируют лизаты с помощью электрофореза в полиакриамидном геле (описан в методическом пособии №3). Если на электрофореграмме присутствует полоса, схожая по молекулярной массе с расчетной для белка интереса, то следующим этапом проводят очистку этого белка.

**1.8 Тельца включения**

[Некоторые белки](http://chem21.info/info/1874726), синтезирующиеся в клетках бактерий и дрожжей в [избыточном количестве](http://chem21.info/info/328604), [образуют нерастворимые](http://chem21.info/info/667689) частицы (тельца включения). После дезинтеграции клеток их легко можно отделить от большинства [других клеточных](http://chem21.info/info/615460) компонентов дифференциальным центрифугированием. Тельца включения после центрифугирования оседают на дно пробирки, т.к. они нерастворимы в нативных условиях. Для растворения телец включения применяют высокие концентрации хаотропных солей (8 М мочевина или 6 М гуанидина гидрохлорид). Подобные соли приводят к денатурации белков и потери их активности, поэтому далее проводят ренатурацию исследуемого белка. Обычно ренатурация происходит в ходе диализа в специально подобранных буферных растворах или непосредственно при проведении хроматографической очистки белка. Диализ – это метод очистки коллоидных растворов и субстанций высокомолекулярных веществ от растворённых в них низкомолекулярных соединений при помощи полупроницаемой мембраны. В состав буферных растворов обычно входят вещества, поддерживающие определенный рH в диапазоне от 4 до 10 (такие как 100мМ Hepes, Tris, глицин, ацетат натрия и др.), сахара и спирты (глюкоза, сахароза, глицерин, бутанол и др.), детергенты (Triton X100, Tween 20 и др.), соли металлов, важными компонентами так же являются аргинин, глутатион, натрий хлорид, 2- меркаптоэтанол. Таким образом, получаются около 900 вариантов растворов, в каждый из которых помещают небольшое количество растворенного в хаотропной соли белка и оценивают наличие осадка после инкубации. Затем выбирают буферный раствор с наименьшим осадком исследуемого белка и масштабируют процесс. В обязательном порядке оценивают активность белка после ренатурации.

**1.9 Хроматографические методы очистки рекомбинантного белка**

Основным методом очистки рекомбинантных белков является хроматография. Хроматография (от др.-греч. χρῶμα — «цвет») – это метод разделения и анализа физико-химических свойств смесей веществ. В 1903 году Михаил Цвет предложил использовать хроматографию для разделения растительных пигментов, что и определило название метода. Он основан на распределении веществ между двумя фазами — неподвижной (твердая фаза) и подвижной (жидкая фаза). В качестве неподвижной фазы обычно служит твердое пористое вещество, которое называют сорбентом. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, который вместе с анализируемыми веществами проходит через твердую фазу. Сорбент обычно находится в специальной трубке – колонке. В зависимости от свойств разделяемых белков выделяют разные типы хроматографий (таблица 2): гель-фильтрация, гидрофобная, ионообменная, аффинная.

Таблица 2

Типы хроматографических методов

|  |  |
| --- | --- |
| **Свойство белковой молекулы** | **Тип хроматографии**  **(английское сокращение)** |
| Наличие эпитопов | Аффинная (AC) |
| Наличие сайтов связывания с ионами металлов | Металл-аффинная (IMAC) |
| Заряд | Ионообменная (IEX) |
| Гидрофобность/гидрофильность | Гидрофобная (HIF) |
| Размер | Гель-фильтрация (GF, SEC) |

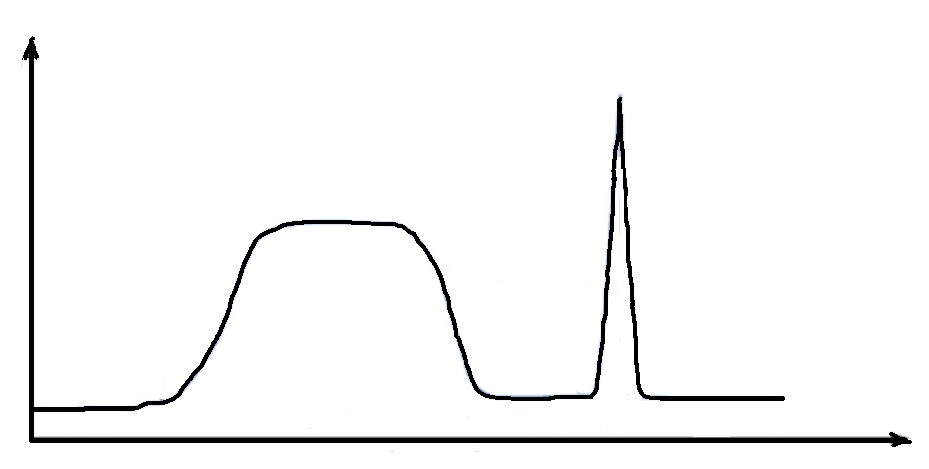
Аффинная хроматография основана на обратимом взаимодействии целевого белка (или комплекса) с лигандом, иммобилизованным на поверхности сорбента. Взаимодействие может быть «биоспецифичным», основанным на взаимодействии двух биологических молекул (аффинная хроматография) или «небиоспецифичным» - на взаимодействии двухвалентных металлов (например, Ni2+, Со2+, Zn2+, Cu2+) с поли-гистидиновой (His-tag), -триптофановой или -цистеиновой последовательностью в целевом белке (металл-аффинная**)**. Примером биоспецифичного взаимодействия являются моноклональное антитело и антиген, фермент и субстрат, рецептор и лиганд (лектин-полисахарид). Важно отметить, что между сорбентом и целевым белком должно быть обратимое взаимодействие, не меняющее свойство белка после диссоциации. Селективный агент, как правило, иммобилизуют на различных производных агарозы (например, сефароза).

Типичная схема аффинной хроматографии включает этапы: 1) уравновешивание сорбента-носителя буферным раствором, в котором находится образец; 2) нанесение образца на колонку; 3) взаимодействие сорбента с исследуемым белком; 4) промывка колонки от несвязавшихся белков; 5) извлечение вещества из твердого носителя вымыванием его подходящим растворителем (элюция белка); 6) регенерация колонки (рис. 6). Элюция может осуществляться с помощью конкурентного лиганда или изменения свойств буфера. Все объемы растворов для проведения хроматографии измеряются объемом используемого сорбента (объем колонки - CV).

Чаще всего для очистки рекомбинантных белков используют металл-аффинную хроматографию. Металл-аффинная хроматография имеет существенные преимущества в сравнении с аффинной: универсальность и коммерческая доступность. К недостаткам метода следует отнести ко-очистку полигистидиновых белков организма-продуцента. Аффинная хроматография может быть как одностадийным процессом, так и методом предварительной очистки белка. Сорбенты, применяемые в аффинной хроматографии, обладают высокой емкостью и специфичностью.

Ионообменная хроматография основана на обратимом взаимодействии заряженного белка с противоположно заряженным сорбентом. Если исследуемый белок имеет положительный суммарный заряд, а сорбент заряжен отрицательно, такой вид хроматографии называют катионообменной. Анионообменной называют вид хроматографии, когда сорбент заряжен отрицательно, а анализируемый белок имеет положительный суммарный заряд. Для выбора вида ионообменной хроматографии необходимо определить изоэлектрическую точку исследуемого белка. Анионообменную хроматографию применяют, если pH раствора, в котором находится исследуемый белок, ниже изоэлектрической точки, и катионообменную – если выше (рис. 7). Для разделения белков поэтапно изменяют pH или концентрацию ионов в подвижной фазе. Обычно элюцию при ионообменной хроматографии осуществляют градиентом NaCl.

UV

****

**1) 2) 3) 4) 5) 6)**

**1-2 СV xCV 2-5 CV >1CV 2-3 CV**

**Объем колонки (СV)**

Рис. 6. Этапы проведения аффинной хроматографии

Гидрофобная хроматография основана на обратимом взаимодействии белков с гидрофобными лигандами на сорбенте. Чаще всего в качестве гидрофобного лиганда используют фениловые, октиловые или бутиловые группы. Связывание гидрофобных групп в белке (аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин) с лигандом происходит в буфере с высокой ионной силой, например, в присутствии 1,5 М сульфата аммония или хлорида натрия. Элюирование осуществляют путём снижения концентрации соли, что ведет к снижению ионной силы раствора. Так же для элюции иногда используют хаотропные соли (гуанидина гидрохлорид или мочевину) или изменяют температуру и pH раствора.

+ H2N COOH

Зона

денатурации

+H3N COOH

2 pH 10

Зона

денатурации

H2N COO-

**-**

Рис. 7. Заряд белков при разных значениях pH буфера

Гель-фильтрация основана на использовании сорбентов с определенной пористостью, что позволяет разделить исследуемые белки по их размеру. В отличие от других видов хроматографии исследуемый белок не связывается с сорбентом. Поэтому важным преимуществом данного метода разделения является возможность использования всех необходимых ионов, детергентов, при высокой или низкой температуре и pH. Материалы сорбента для гель-фильтрации выпускаются в виде сферических гранул с различными размерами пор. Современные сорбенты позволяют разделить белки с молекулярной массой от 0,1 до 80000 кДа. В качестве сорбента выступают гидрофильные полимеры, такие как сефадексы и сефакрилы. Чем больше исследуемый белок, тем быстрее он проходит через колонку (рис. 8). Связано это с тем, что крупные белки не проходят в поры сорбента, в тоже время мелкие белки задерживаются в порах гранул и их подвижность меняется.

UV

**СV**

**1СV 2СV 3СV**

Рис. 8. Схема разделения пептидов методом гель-фильтрации:

̶ cорбент; ̶ крупные пептиды; ̶ средние пептиды; ̶ мелкие пептиды

Выбор способа очистки белка зависит от размера и состава аминокислот. Если белок содержит, например, полигистидиновую последовательность, то его можно очистить с помощью аффинной хроматографии, иногда и в один этап. Однако если материал (например, клеточный лизат) содержит много дополнительных белковых примесей, с большой вероятностью очистка в один этап будет недостаточна. Количество этапов хроматографической очистки напрямую зависит от необходимой чистоты препарата белка и от его аминокислотного состава. Важно перед началом очистки тщательно проанализировать заряд белка, его изоэлектрическую точку, наличие гидрофобных аминокислот и молекулярную массу. На основании полученных характеристик белка выбирают наиболее подходящие способы хроматографии и количество этапов очистки. Стоит учитывать, что чем больше стадий очистки белки, тем ниже конечный его выход и может снижаться его активность. Поэтому обычно максимальное число этапов очистки составляет три. Для первого этапа очистки используют обычно ионообменную, гидрофобную или аффинную хроматографию. Аффинной хроматографии часто достаточно для получения чистого препарата, иногда ее комбинируют с гель-фильтрацией. Для второго этапа очистки применяют ионообменную или гидрофобную хроматографию, в зависимости от того что использовалось в первом этапе. Финишный этап очистки проводят гель-фильтрацией (таблица 3).

Таблица 3

Стадии очистки белков различными видами хроматографий

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Стадия очистки | Вид хроматографии | | | | |
| Первичная | Аффинная | Аффинная | Аффинная | Ионообменная | Гидрофобная |
| Промежуточная | Ионообменная | Гидрофобная | Ионообменная |
| Финишная | Гель-фильтрация | Гель-фильтрация | Гель-фильтрация | Гель-фильтрация |

Хроматографию белков находящихся в «телецах включения» проводят в денатурирующих условиях (в присутствии высоких концентраций хаотропных солей). Процесс ренатурации осуществляют обычно после связывания белка интереса с хроматографической колонкой, путем плавного или ступенчатого понижения концентрации хаотропного агента вплоть до полного его отсутствия. Состав буфера подбирают заранее, как описано выше.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. – М.: МИР. Молекулярное клонирование, 1984. – 478 с.
2. Sambrook J., Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – New-York: CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001. – 2028p.
3. Абрамова З.И. Введение в генетическую инженерию: Учебное пособие для самостоятельной внеаудиторной работы студентов по курсу «Генная инженерия». – Казань: Казанский университет, 2008. – 169 с.
4. Ибрагимов, А.Н., Бикмуллин, А.Г., Сатаева, Д.А., и др. Хроматографические методы очистки белков. Учебно-методическое пособие. –Казань: ФГАОУВПОКФУ, 2013. – 48 с.
5. Широкова О.М., Ведунова М.В. Методы генетической трансформации. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского госуниверситета, 2013. – 30 с.
6. Сы­су­ев, Б.Б., Пок­ров­ская, Ю.С. Рекомбинантные микроорганизмы и клеточные культуры в технологии получения препаратов белков // Научно-производственный журнал. – Москва. 2015. – №13. – С. 96-109.
7. Langley, K. E., Villarejo, M. R., Fowler, A. V., et. al. Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1975. – V. 72. – № 4. – P. 1254–1257.
8. Novogene. pET System Manual 11th Edition [Электронный ресурс] –– Режим доступа: http://home.sandiego.edu/~josephprovost/pET%20Manual.pdf, свободный.
9. Novogene. pETBlue System Manual [Электронный ресурс] –– Режим доступа: http://www.merckmillipore.com/RU/ru/search/pET%20sistem%20manual?search=&TrackingSearchType=SB+-+homepage-search-box+-+OLD&SearchContextPageletU UID=&SearchTerm=pET+sistem+manual, свободный.

Алексей Дмитриевич **Перенков**

Екатерина Андреевна **Василенко**

Владислав Валерьевич **Мохонов**

**Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии.**

**ЧАСТЬ 4. ВВЕДЕНИЕ В ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ИНЖЕНЕРИЮ ПРОКАРИОТ**

***Учебно-методическое пособие***

Федеральное государственное автономное

образовательное учреждение высшего образования

«Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.