

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Т.Г. Волова

подпись

инициалы, фамилия

«_____» _____ 20__ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Получение гибридного белка сурвивин-обелин и исследование его свойств как
биоспецифичного биолюминесцентного репортера

Руководитель

подпись, дата


профессор, д.б.н.

должность, учёная степень

Л.А. Франк

инициалы, фамилия

Выпускник



подпись, дата

Н.С.Панамарев

инициалы, фамилия

Красноярск 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1.1 Структура белка	6
1.2 Функции в организме и клетке	8
1.3 Сурвивин как маркер рака.....	11
1.4 Использование Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов в качестве метки для иммуноанализа	13
1.5 Коммерческие наборы для определения концентрации сурвивина в биологических образцах.....	18
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
2.1 Вещества и реактивы	21
2.2 Получение генетической конструкции, кодирующей гибридный белок сурвивин-обелин	22
2.3 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> XL1-Blue плазмидной ДНК и ПЦР-скрининг колоний	22
2.4 Выделение плазмидной ДНК.....	23
2.5 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> RIPL плазмидной ДНК	23
2.6 Культивирование рекомбинантных клеток <i>E. coli</i>	23
2.7 Экстракция и очистка рекомбинантных белков	24
2.8 Активация обелинового домена гибридного белка целентеразином	24
2.9 Белковый электрофорез.....	25
2.10 Сравнительный биолюминесцентный твердофазный анализ рекомбинантных сурвивинов.....	25
2.11 Модельный биолюминесцентный твердофазный анализ конкурентного типа.....	26
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	27
3.1 Изучение экспрессии белка для полученной генно-инженерной конструкции и получение очищенного препарата гибридного белка.....	27
3.2 Изучение биолюминесцентных свойств гибридного белка	30
3.3 Твердофазный биолюминесцентный анализ гибридного белка на аффинность к антителам	32

3.4 Получение очищенного препарата сурвивина и его сравнение с коммерческим аналогом.....	33
3.5 Модельный биолюминесцентный твердофазный анализ конкурентного типа.....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	37
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	39

ВВЕДЕНИЕ

На переходно-клеточный рак мочевого пузыря приходится 2,8% случаев заболевания раком в России у обоих полов, а у мужчин доходит до 4,7%. Также он занимает седьмое место по встречаемости среди самых распространённых типов рака[1]. Цистоскопия, которая является стандартом для определения данного типа рака и прогнозирования выживаемости после лечения, является инвазивным и дорогим методом. Дополнением к этому методу служит уринарный цитологический анализ, при помощи которого хорошо выявляется болезнь на поздней стадии, однако у него не хватает чувствительности для обнаружения опухолей на начальной стадии. Также этот метод дорогой и сильно зависит от квалификации проводящего её цитопатолога. Поэтому необходима разработка нового неинвазивного, чувствительного и высоко специфичного метода для обнаружения и прогнозирования рака мочевого пузыря.

Отличительной чертой карциногенеза человека является нарушение регуляции апоптоза: клетки рака способны сопротивляться программируемой смерти благодаря изменённой экспрессии антиапоптотических белков, в число которых входит сурвивин. Он вовлечён в ингибирование апоптоза и контроль митоза и способен вызывать изменения в генах, связанных с инвазивностью клеток опухоли.

Сурвивин экспрессируется совершенно по-разному в нормальных и злокачественных клетках: в нормальных тканях сурвивина почти нет, но в злокачественных образованиях его количество значительно повышено. Это делает сурвивин удобным маркером для диагностики рака[2,3].

Для разработки конкурентного анализа по определению сурвивина необходимо получить белок, обладающий одновременно аффинностью сурвивина к антителам и свойствами высокочувствительной метки.

Целью работы являлось получение гибридного белка, содержащий домены сурвивина и обелина, и исследование его свойств как биоспецифичного биолюминесцентного репортера.

Исходя из поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Сконструировать плазмидную ДНК, несущую ген гибридного белка сурвивин-обелин;
2. Изучить экспрессию белка с помощью полученной генно-инженерной конструкции в клетках штамма *E.coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIPL);
3. Получить очищенный препарат белка, изучить его биолюминесцентные свойства;
4. Показать сродство домена сурвивина к анти-сурвивин антителам биолюминесцентным твердофазным микроанализом;
5. Исследовать полученный белок на пригодность в качестве репортера для выявления сурвивина в конкурентном биолюминесцентном микроанализе.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структура белка

Сурвивин относится к группе белков-ингибиторов апоптоза (IAP), все члены которого имеют как минимум 1 бакуловирусный IAP повтор (BIR), который состоит примерно из 70 аминокислот. Данный повтор обеспечивает их взаимодействие с проапоптотическими белками.

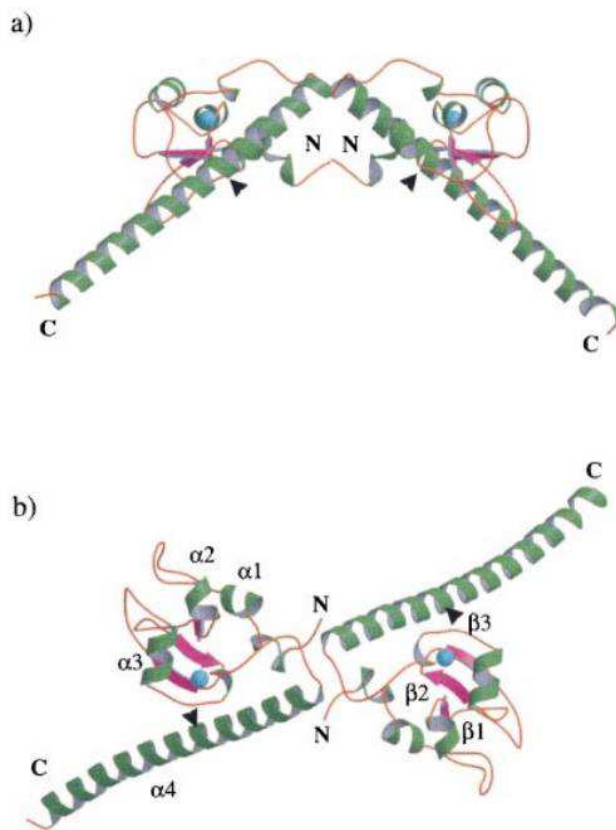


Рис.1.1. Структура димера сурвивина [4]

Зеленым и фиолетовым обозначены α -спирали и β -цепи соответственно, голубым – атомы цинка. Черным стрелками обозначены сайты расщепления трипсином
(а) 2-кратная ось димера находится в плоскости рисунка
(б) 2-кратная ось перпендикулярна плоскости рисунка.

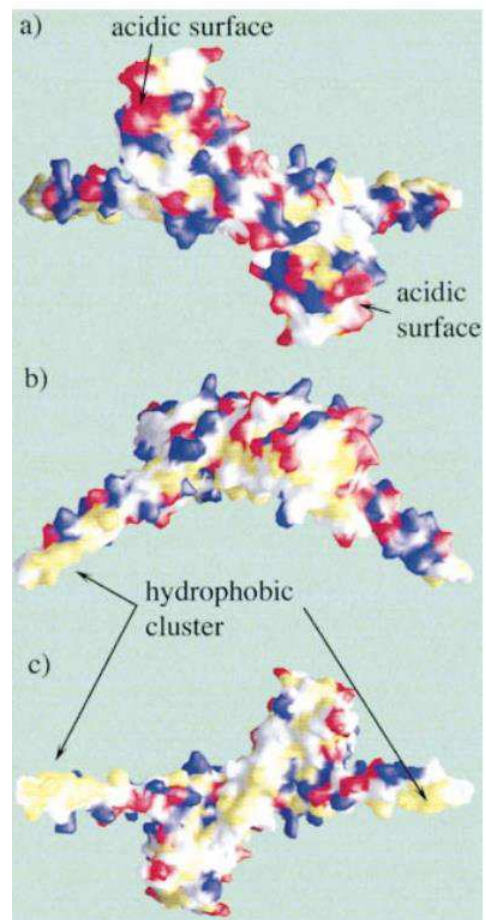


Рис.1.2. Молекулярная поверхность димера сурвивина [4]

Аминокислоты обозначены в соответствии с их химическими свойствами: кислотные, основные, полярные и гидрофобные в красный, синий, белый и жёлтый цвета соответственно.

- а) – внешняя, «выпуклая» поверхность;
- б) – вид сбоку;
- с) – вогнутая, внутренняя поверхность.

Мономер данного белка состоит из глобулярного N-концевого домена цинкового пальца (1-88 а.о.), линкерного участка (89-97 а.о.) и длинной C-концевой спирали (98-142 а.о.). Домен цинкового пальца и спираль плотно упакованы вместе. В общем мономер содержит 4 спирали, имеющих больше одного оборота, 3 цепи β -листа. VIR мотив состоит из 3х α -спиралей и трёхцепочечного антипараллельного β -листа

В растворе сурвивин образует стабильные димеры (структура на рис.1.1), которые не диссоциируют при разведении раствора, в котором он находится. Димер имеет уникальную форму галстука-бабочки. Поверхность сурвивина (рис.1.2) имеет разные химические свойства, обусловленные их аминокислотным составом. Так, выпуклая поверхность представлена небольшими вкраплениями основных, кислотных, гидрофобных или полярных аминокислот. Вогнутая же сторона состоит в основном из гидрофобных аминокислот, в частности два крупных гидрофобных кластера расположены на C-конце спирали $\alpha 4$. Эти кластеры участвуют в межбелковых взаимодействиях, например, связываются с микротрубочками.

В образовании димера вовлечены: N-концевой регион белка, линкерная часть и N-концевая часть спирали $\alpha 4$. Граница на которой взаимодействуют димеры в основном гидрофобна, т.к. на 75% состоит из неполярных аминокислот [4].

1.2 Функции в организме и клетке

С биологической точки зрения, сурвивин – мультифункциональный белок, способный ингибировать апоптоз, регулировать деление клеток и способствовать ангиогенезу. В некоторых исследованиях указывается, что главной функцией белка является контроль митоза. Ингибирование сурвивина вызывает дефекты в сегрегации хромосом, цитокинезе и нарушает финальные стадии деления клетки. Также его ингибирование значительно подавляет ангиогенез в моделях опухолей, что указывает на взаимосвязь функций сурвивина и ангиогенеза[5].

В нормальных тканях синтез и деградация сурвивина полностью зависят от клеточного цикла, что подтверждает его роль в регуляции митоза. При митозе сурвивин функционирует небольшой промежуток времени во время метафазы и анафазы, при этом локализуясь в двух субклеточных пулах. Один пул сурвивина участвует в полимеризации тубулина посредством взаимодействия с центросомами, микротрубочками метафазного и анафазного веретена деления и остатками митотического аппарата, главным образом регулируя их динамику. Второй пул сурвивина локализован у кинетохора митотической хромосомы. В этом пуле сурвивин ассоциирован с регуляторами цитокинеза, такими как киназа aurora B, внутренний белок центромеры (inner centromere protein, INCENP), и бореалин (Borealin/Dasra), которые поддерживают роль сурвивина как часть комплекса белков-хромосомных пассажиров (chromosomal passenger complex - CPC) [6]. Этот комплекс участвует в регуляции ключевых митотических событий: прикрепление микротрубочек к кинетохору, активация сборки и дальнейшая регуляция веретена деления и сократительного аппарата, управляющего цитокинезом[7].

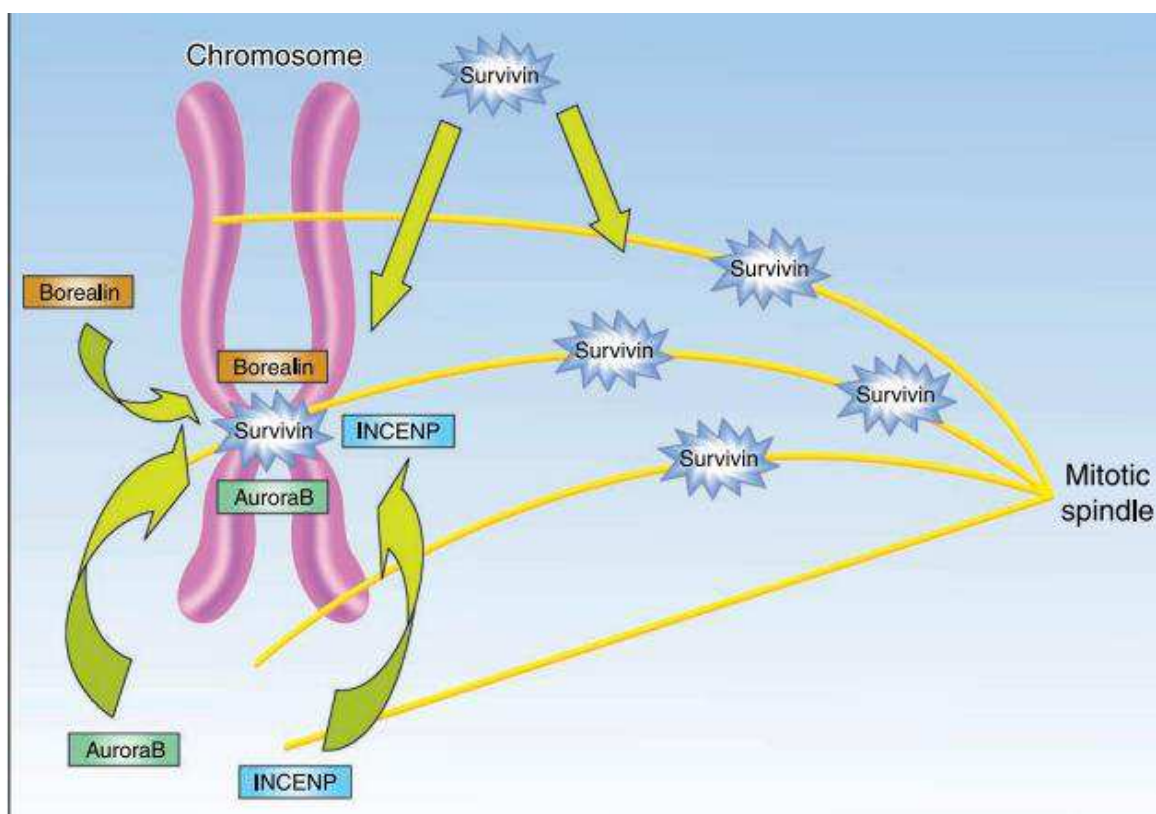


Рис.1.3. Функции сурвивина при митозе. Сурвивин компонент CPC, который необходим для правильной сегрегации хромосом и цитокинеза. Дополнительно, отдельный пул сурвивина связан с полимеризацией тубулина и способствует регуляции динамики микротрубочек[6].

Роль сурвивина в ингибировании апоптоза была предметом многочисленных дискуссий. Изначально считалось, что сурвивин и другие IAP избирательно связывают и способствуют деградации каспаз 3, 7 и 9. Однако дальнейшие эксперименты показали, что сурвивин ингибирует только каспазу 9, при этом требуется присутствие кофактора-белка, взаимодействующего с X – белком вируса гепатита В (hepatitis B X-interacting protein, HBXIP). Также есть предположение что антиапоптотическая роль сурвивина может быть связана с белком-ингибитором апоптоза XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein - XIAP), с которым сурвивин взаимодействует через бакуловирусный домен, при этом повышая стабильность XIAP, что приводит к синергетическому ингибированию активации каспазы-9 [6].

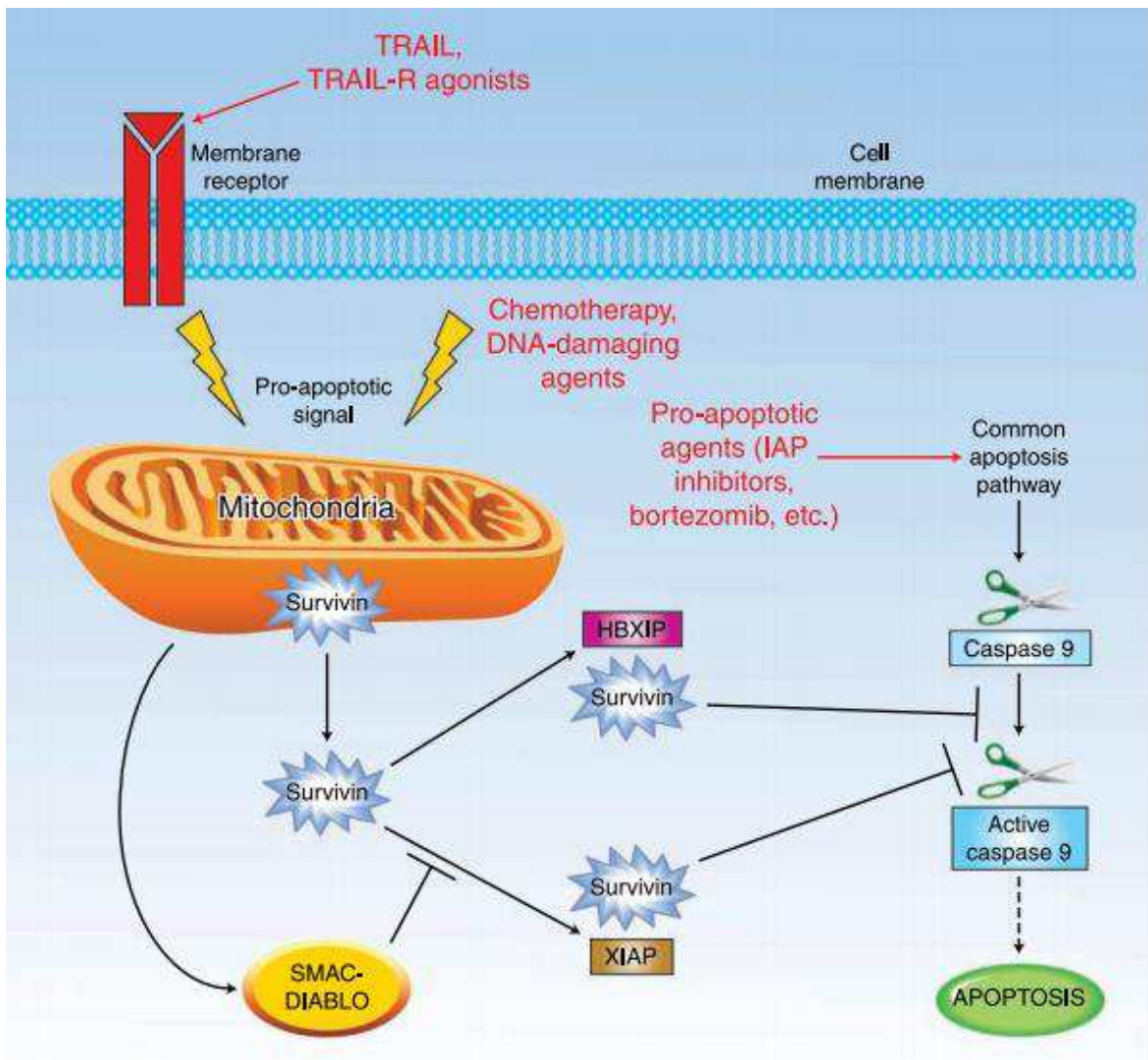


Рис.1.4. Функции сурвивина как ингибитора апоптоза. После активации проапоптотического клеточного сигнального пути сурвивин освобождается из митохондрии в цитозоль и ингибирует активацию каспазы-9. Эта функция требует ассоциации с HBXIP и/или XIAP и ингибируется митохондриальным белком Smac/Diablo [6].

Ангиогенез – физиологический процесс, характеризующийся образованием новых кровеносных сосудов из уже существующих. Данный процесс увеличивает доставку кислорода и питательных веществ, что необходимо для существования и роста возникшей опухоли. Процесс образования новых сосудов включает в себя следующие этапы: 1) освобождение проангиогенных факторов из опухолевых клеток; 2) изменения в морфологии эндотелиоцитов; 3) освобождение протеолитических ферментов, разрушающих базальную мембрану; 4) миграция и формирование трубчатых структур; 5) пролиферация эндотелиоцитов и 6) дифференциация в капилляры. Среди всех

белков, участвующих в этих процессах особенно важным является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor - VEGF), т.к. он участвует во всех этапах, за исключением первого. Фактор роста эндотелия сосудов связывается с соответствующими рецепторами (семейства VEGFR) и через сигнальный путь PI3K/Akt способствует выживанию и пролиферации эндотелиальных клеток.

Сурвивин так же способствует активации данного пути (пока ещё не известным способом), который в свою очередь через ряд других механизмов увеличивает экспрессию VEGF.

1.3 Сурвивин как маркер рака

Сурвивин практически отсутствует в нормальных тканях взрослого человека, но при этом сверхэкспрессируется практически во всех злокачественных опухолях, включая рак мочевого пузыря, рак лёгких, рак молочной железы, желудка, пищевода, печени, яичника и других [8]. В настоящее время сурвивин рассматривают как потенциальный маркер генитоуретальных типов рака, так при таких типах болезни белок попадает в мочу, где он может быть легко обнаружен при помощи теста на основе антител. Это позволяет создать простой, неинвазивный и относительно дешёвый метод для диагностики таких типов рака. Данный метод может быть очень полезен для диагностики рака мочевого пузыря, так как он плохо обнаруживается стандартными методами (цистоскопия, цитологические методы) на ранних стадиях, которые к тому же являются инвазивными, из-за чего вызывают дискомфорт у пациентов. Также рак мочевого пузыря имеет высокую вероятность рецидива, что требует обследования пациента минимум раз в три месяца. Помимо этого, эффективность цистоскопии и уринарной цитологии сильно зависят от врача, проводящего диагностику, что сильно сказывается на результатах. Чувствительность цистоскопии оценивается в 47-52%, а у

цитологического исследования клеток осадка мочи (urine cytology) в 40-60% при опухолях на низкой стадии и до 95% при высокой[9].

Таблица 1. Сверхэкспрессия белка сурвивина при различных типах рака[9]

Тип рака	Увеличение экспрессии, %
Рак лёгких	85,5
Рак пищевода	80
Рак груди	70,7-90,2
Рак поджелудочной железы	76,9-88
Рак яичников	73,5
Злокачественная меланома	67
Гепатоцеллюлярная карцинома	41-87
Колоректальный рак	63,5
Рак мочевого пузыря	57,8
Острый миелоидный лейкоз	54,8
Острый лимфобластный лейкоз	68,8
Рак ротовой полости	72-75

S. Ziaee et al проверили пригодность сурвивина как маркера рака мочевого пузыря. Они разделили испытуемых на 2 группы: исследуемую, включающую больных раком мочевого пузыря пациентов (N=20) и контрольную (имеют другие нарушения мочеиспускательного тракта, N=18). В итоге положительные результаты в тесте (ОТ-ПЦР – метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) на сурвивин были получены для 18 участников из исследуемой группы и 9-ти из контрольной, т.е. в данном случае тест обладает 90% чувствительностью и 50% специфичностью. При этом в исследуемой группе было 10 пациентов, у которых цитологическое исследование не выявило наличие рака, однако все из них имели положительный результат в тесте на сурвивин. Позже было выявлено, что 9 пациентов из этой группы имели опухоли ранней стадии. Результаты данного эксперимента продемонстрировали, что тест на сурвивин имеет лучшую чувствительность чем стандартные методы

(цистоскопия и цитологическое исследование клеток осадка мочи) при диагностике рака на низкой стадии[10].

Также в работе Srivastava A.K. et al [11] при помощи ИФА была определена концентрация сурвивина в моче 48 здоровых участников контрольной группы и 117 пациентов с гистологически подтвержденной уротелиальной карциномой. Было обнаружено, что сурвивин значительно выше в группе случаев ($P < 0,05$). Было предложено пороговое значение сурвивина 17,7 пг/мл с приблизительной чувствительностью 82,9% и специфичностью 81,1% ($P < 0,0001$), тогда как цитология мочи имела чувствительность 66,7% и специфичность 96,0%.

1.4 Использование Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов в качестве метки для иммуноанализа

Иммуноанализ - это разнообразная группа аналитических методов, используемых во всех клинических лабораториях. С 1959 года, когда Розалин Ялов и Соломон Берсон разработали принципы иммуноанализа, развитие метода в плане повсеместности применения и создания оригинальных схем анализа растёт экспоненциально. Вне зависимости от применения и лежащей в основе технологии анализ включает в себя четыре компонента: антиген (Ag); обнаруживаемое антитело (Ab), используемое для обнаружения; способ разделения комплекс антиген-антитело (Ag-Ab) из несвязанных реагентов (в случае если это гетерогенный анализ) и метод обнаружения комплекса Ag – Ab. Множество форматов иммуноанализа было разработано в течение последних лет[12]. Схема проведения самых распространённых из них представлена на рисунке 1.5.

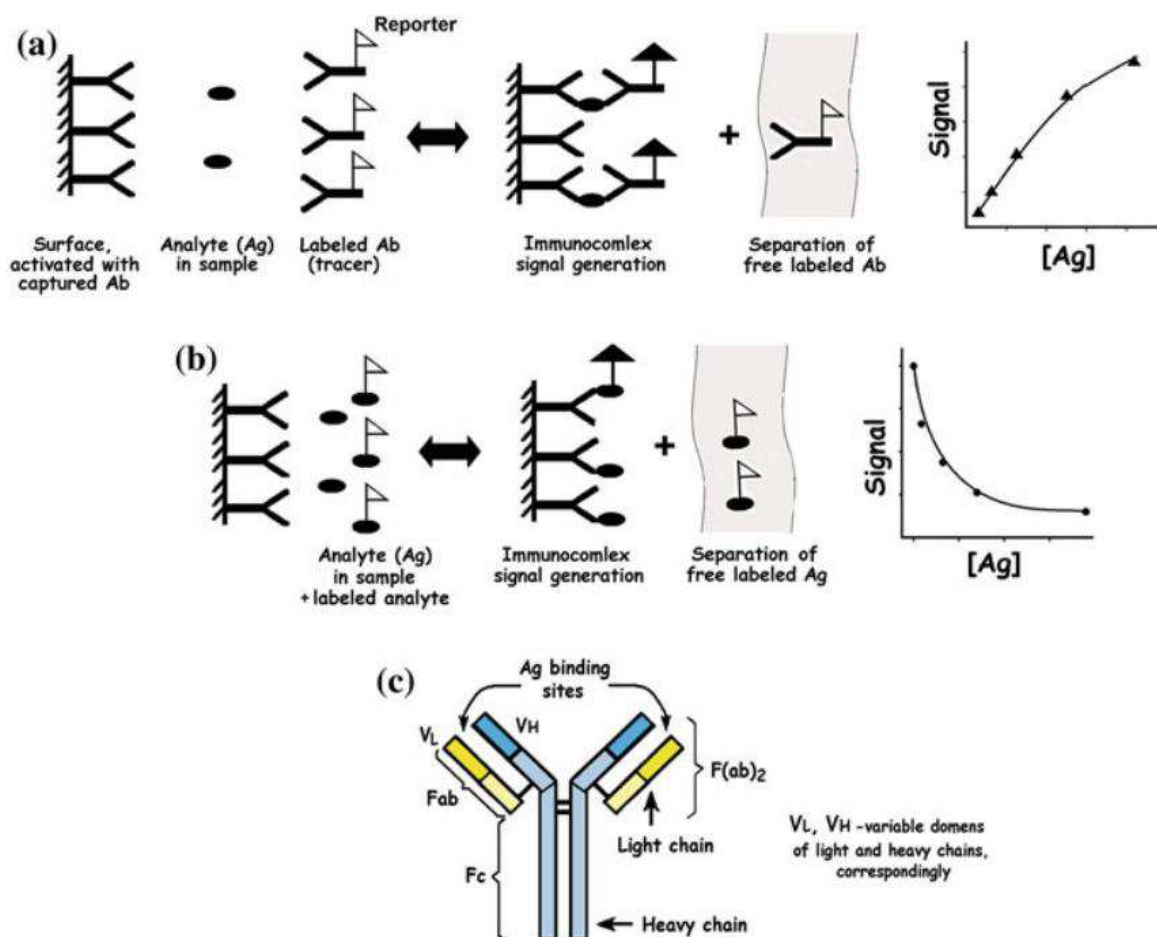


Рис.1.5. Схема для: **a** «сэндвич» и **b** конкурентного иммуноанализов; **c** - структура антитела (человеческий IgG), показывающая пары идентичных тяжёлых (выделены светло-голубым) и лёгких (выделены светло-жёлтым) цепей. Обе пары цепей содержат вариабельные домены, V_H и V_L , отвечающие за связывание с антигеном[12].

Эффективность любого иммуноанализа зависит от двух факторов: эффективность формирования иммунокомплекса и способность детектирующей системы обнаруживать этот комплекс с высокой чувствительностью. Формирование комплексов обеспечивается аффинностью антител к антигену. Антитела - это белки, которые вырабатываются у животных в результате иммунологического ответа на наличие чужеродного вещества (рис. 1.7 схематично представляет строение антитела). Антитела являются важнейшим компонентом иммуноанализа, который обеспечивает его большую эффективность, благодаря их способности связываться с чрезвычайно широким спектром природных и искусственных молекул, клеток и вирусов.

Исключительная специфичность для анализируемого вещества позволяет анализировать его в сложных биологических средах (сыворотка, моча и т.д.).

Система обнаружения иммунокомплекса (генерация сигнала плюс устройство для измерения) влияет на чувствительность иммуноанализа. Основным требованием для системы обнаружения является уровень сигнала метки, который должен быть выше фонового шума. Множество разновидностей меток применяются в иммунологическом анализе. Первыми использовались радиоактивные метки, но проблемы, связанные с радиоактивными отходами и нестабильность, присущая радиоактивно-меченым реагентам, стимулировали развитие нерадиоактивных меток.

Ферменты, катализирующие химические реакции с визуальными сигналами (например, цвет или свет) теперь используются чаще, чем другие метки. Ферменты могут быть обнаружены в очень низкой концентрации, потому что одна молекула фермента может катализировать множество реакций, при этом оставаясь стабильной. Таким образом, сигнал и, следовательно, чувствительность анализа увеличивается на несколько порядков в отличие от метки, которая производит только одно сигнальное событие. Чтобы стать репортёром, фермент ковалентно связывают с антителом или антигеном (в зависимости от формата анализа).

Чтобы соответствовать требованиям для использования в качестве метки, любой фермент должен выполнять еще несколько условий: доступность, устойчивость к химической модификации; стабильность при хранении, простота использования и отсутствие токсичности. Поиск ферментов, отвечающих этим требованиям, продолжается. В настоящее время люциферазы представляют интерес, потому что они имеют высокий квантовый выход биолюминесцентной реакции и, благодаря возможностям современных фотометров, их обнаружение возможно вплоть до аттомоля. Поэтому они являются отличными репортерами при использовании в большом разнообразии иммуноанализов.

В настоящее время среди биолюминесцентных белков наиболее известны те, которые получены из светлячков, морских бактерий, кишечнорастворимых и вешногих ракообразных. Однако большинство люцифераз не обладают необходимыми свойствами для использования в качестве метки: некоторые из них нельзя искусственно синтезировать в рекомбинантных бактериальных клетках, некоторые теряют свою активность при хранении или химическом конъюгировании. Но Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины светящихся морских кишечнорастворимых, такие как обелин и акворин, не имеют таких недостатков. Последовательности ДНК, кодирующие данные белки, были клонированы в клетки бактерий и экспрессированы с большим выходом белка. Рекомбинантные апопротеины эффективно активируются синтетическим целентеразином в условиях отсутствия кальция и в присутствии кислорода. Они всесторонне изучены относительно биохимических и биофизических свойств, третичной структуры, механизма биолюминесценции (механизм и характеристики биолюминесценции акворина и обелина представлены на рис.1.6). Эти знания наряду с возможностью получения практически неограниченного количества рекомбинантных белков служат основой для разработки уникальной биолюминесцентной детекционной системы, которая является «автономной», легко запускаемой, быстрой, высокочувствительной и неопасной[13].

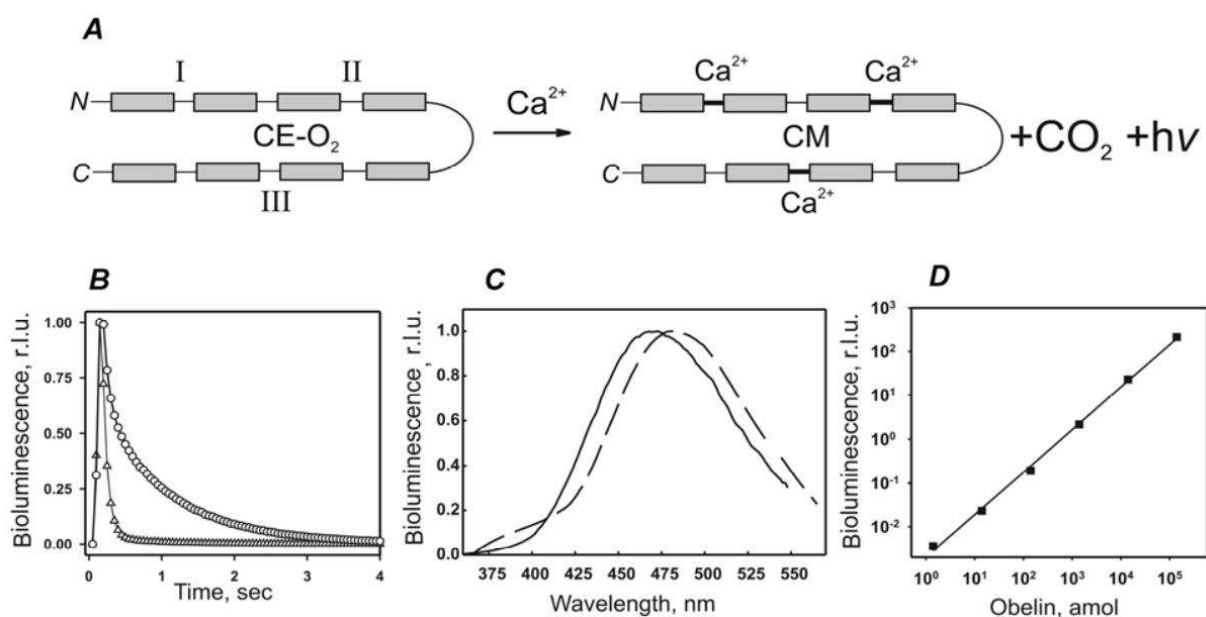


Рис.1.6. Биолуминесценция Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов. (А) Схема реакции: фотопроtein – комплекс из одноцепочечного полипептида, содержащего Ca^{2+} -связывающие сайты (I, II, III) and предокисленный целентеразин (CE-O_2). Связывание Ca^{2+} приводит к декарбоксилированию целентеразина с образованием стабильного комплекса полипептида, трёх ионов Ca^{2+} и целентерамида (CM), при этом выделяется CO_2 и квант света. (В) Кинетика биолуминесцентных сигналов акворина (-○-) и обелина (-Δ-). (С) Спектр биолуминесценции акворина (сплошная линия) и обелина (прерывистая линия). (D) Количество обелина в зависимости от биолуминесценции [13].

Чтобы использовать фотопrotein в иммуноанализе его необходимо связать с каким-либо биоспецифическим участником анализа. Это можно сделать через химическое конъюгирование. Однако при этом белок существенно теряет в активности, что уменьшает чувствительность анализа. Для решения данной проблемы был разработан другой метод – соединение генов биоспецифического белка и фотопroteина, что позволяет экспрессировать монолитный гибридный белок, обладающий функциональными доменами родительских белков. Главная задача при конструировании гибридного белка - сохранить функции родительских белков. Распознаваемый элемент в гибридном белке может обладать универсальной биоспецифичностью (как, например, в случае системы биотин-стрептавидин, которая работает как мост между молекулами), или исключительной специфичностью (как, например, в случае взаимодействия антител с антигеном). Множество биолуминесцентных

репортёров такого типа было разработано, и теперь они широко используются при проведении анализов *in vitro* и *in vivo*[14].

1.5 Коммерческие наборы для определения концентрации сурвивина в биологических образцах

В настоящее время в продаже можно встретить множество коммерческих наборов для определения концентрации сурвивина в образце. Чаще всего встречаются стандартные Sandwich-ELISA наборы с колориметрическим типом определения концентрации (иностранные фирмы NovusBiologicals[15], Cloud-Clone corp[16], FineTest[17], Abcam[18]). Они устроены по типу метода авидин-биотинового комплекса (ABC-method)[19]. Механизм можно рассмотреть на примере набора Human Survivin ELISA SimpeStep Kit (Abcam). Схема представлена на рисунке 1.7.

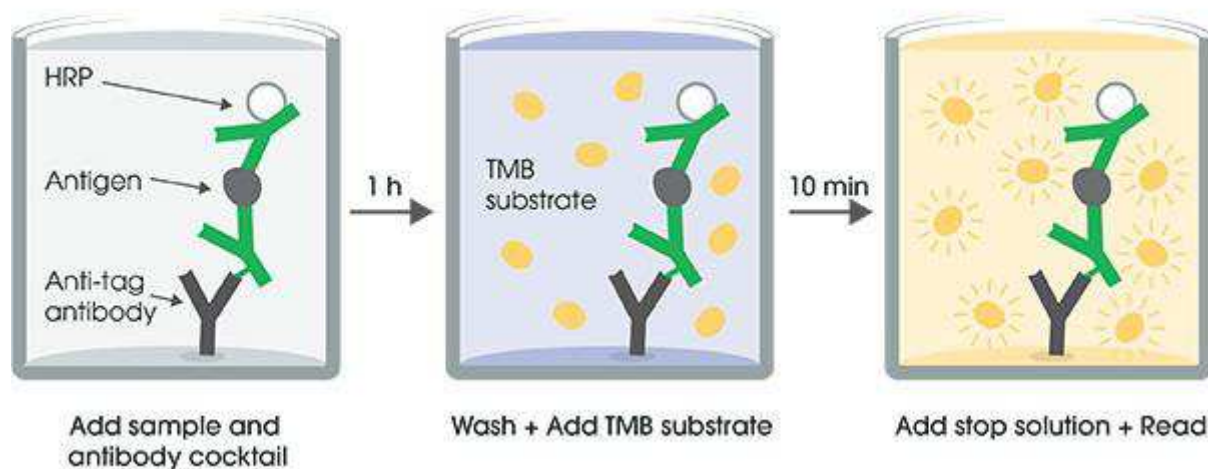


Рис.1.7. Схема проведения анализа Human Survivin ELISA SimpeStep Kit (Abcam)[18]

В планшет, покрытый универсальными моноклональными антителами(anti-tag antibody), добавляют смесь детектирующего и захватывающего антител вместе с образцом. Захватывающие антитела к сурвивину конъюгированы с аффинной меткой, к которой специфичны универсальные моноклональные антитела, что позволяет им прилипать к поверхности лунки планшета. Детектирующие антитела связаны через

биотиновый мостик с гликопротеином авидином, имеющим 4 места для связывания с биотином. Через 3 оставшихся биотиновых мостика к авидину присоединена пероксидаза хрена, которая катализирует окисление хромогенного субстрата (тетраметилбензидин). После добавления в растворе образуются комплексы из антигена, захватывающего и детектирующего антител. Комплексы через аффинную метку захватывающего антитела связываются с антителами на поверхности лунки планшета.

После промывки в лунки планшета добавляют раствор с субстратом, который под воздействием пероксидазы окрашивается. По интенсивности окраски определяют концентрацию антигена. Определяемый диапазон концентраций для наборов такого типа в среднем 30-4000 пг/мл, предел чувствительности 2-20 пг/мл.

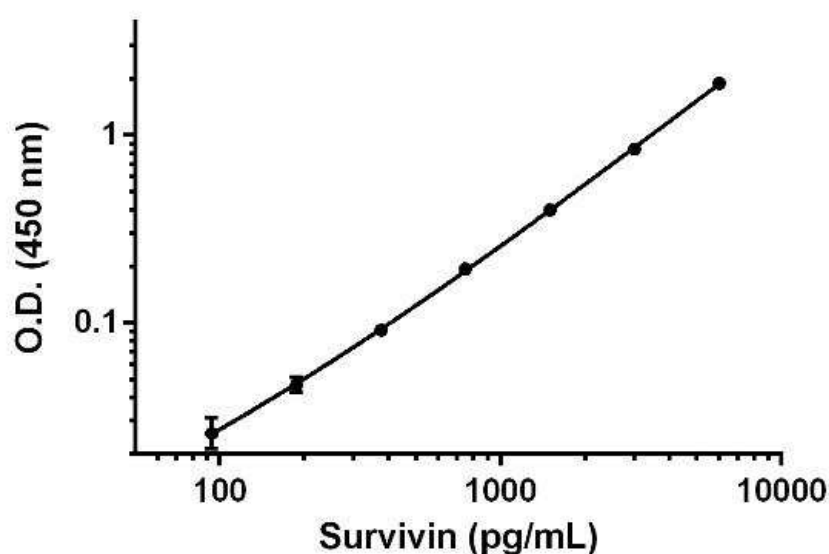


Рис.1.8. График зависимости оптической плотности от концентрации сурвивина для набора Human Survivin ELISA SimpeStep Kit (Abcam) [18]

Реже встречаются наборы с флуоресцентной меткой, например, набор фирмы ThermoFisher - Survivin Human ProcartaPlex [20]. Главным отличием от предыдущих наборов состоит в том, что здесь не используется поверхность лунки планшета, детектируемые комплексы образуются на поверхности магнитных шариков. Детектирующее антитело устроено по похожему принципу,

только вместо авидина антитело связывается через биотиновый мостик со стрептавидином, конъюгированным с R-фикоэритрином (который и используется в качестве флуоресцентной метки). Диапазон определяемых концентраций данного набора 108-440000 пг/мл. Более высокий нижний диапазон определяемых концентраций компенсируется возможностью одновременного определения нескольких белков-мишеней.

В результате поиска не было обнаружено российских наборов для определения концентрации сурвивина в биологических образцах. Кроме того, все перечисленные ранее наборы предназначены только для исследовательских целей, поэтому разработка чувствительных наборов для определения сурвивина в настоящее время является актуальной задачей.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Вещества и реактивы

Таблица 2 – Состав буферных растворов и сред, используемых в работе

Название	Состав
SOC-среда	20 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl ₂ , 10 мМ MgSO ₄ pH 7,0 + 20 мМ глюкозы
LB-среда	20 г/л бакто-триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5-7 г/л NaCl, pH 7,4
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
Буфер А	6 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl, 5 мМ CaCl ₂
Буфер Б	0-1 М ацетата натрия в буфере А
Буфер Т	20 мМ Tris-HCl pH 7,0
Буфер ТЕ	Буфер Т + 5 мМ ЭДТА
Кальциевый буфер	0,1 М CaCl ₂ , 0,1 М Tris-HCl pH 8,8
Промывочный буфер	PBS, 0,1% Tween 20, 5 мМ ЭДТА
Буфер PBS 7,5	0,1 М Na ₂ HPO ₄ , 0,1 М K ₂ HPO ₄ 0,15 М NaCl
Буфер TGB	25 мМ Tris-base , 250 мМ глицина, 0,1% SDS

В работе использованы следующие реактивы: бактотриптон (Panreac, Испания), дрожжевой экстракт (Медиген, Россия), агар бактериологический (ДИА-М, Россия), агароза LE, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (ДИА-М, Россия), Tris base, мочевины, ЭДТА-натриевая соль, кальций хлорид (Sigma-Aldrich, США) бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США),

антитела к сурвивину (AbSurv) получены от фирмы Abcam (Великобритания). Для электрофореза белков использовали акриламид, бис-акриламид (Медиген, Россия), ТЕМЕД (Helicon, Россия), персульфат аммония, додецилсульфат натрия, стандартные смеси белков для электрофореза (Abcam, Великобритания).

Последовательность гена, кодирующего сурвивин, оптимизированная для бактериальной экспрессии была синтезирована и клонирована в вектор pMALc5x (NEB, Великобритания) фирмой Евроген, Россия.

2.2 Получение генетической конструкции, кодирующей гибридный белок сурвивин-обелин

Информация закрыта ЛАФранк

2.3 Трансформация компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue плазмидной ДНК и ПЦР-скрининг колоний

К суспензии компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue (45 мкл) добавили 5 мкл раствора смеси плазмид, инкубировали при 0°C в течение 30 мин, затем прогревали (42°C, 45 сек) и снова переносили на лед. Далее в пробирку добавляли 450 мкл среды SOC (таблица 2.1), инкубировали 1 час при 37°C, высевали на LB-агар (таблица 2.1), содержащий ампициллин (200 мкг/мл), и растили при 37°C.

Выросшие колонии отбирали и ресуспендировали в 20 мкл стерильной воды, одновременно пересевая в новую чашку, после чего инкубировали 10 мин при 95°C и центрифугировали (2 мин). Анализ размера вставок проводили ПЦР-скринингом, используя 8 мкл клеточной смеси, Taq ДНК-полимеразу, стандартные T7 праймеры. Условия ПЦР: 95°C в течение 1 мин; 20 циклов (95°C – 20 с, 56°C – 30 с, 72°C – 1 мин); 72°C в течение 7 мин. Концентрацию и

молекулярный вес ПЦР-продуктов определяли электрофоретически в 1% агарозном геле вместе с 1 kb ДНК-маркером молекулярного веса.

2.4 Выделение плазмидной ДНК

Каждую индивидуальную колонию штамма *E. coli* XL1-Blue, содержащую целевую плазмиду, помещали в 10 мл LB среды с ампициллином (200 мг/л) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Клетки центрифугировали 10 мин при 8000 g, супернатант сливали. ДНК выделяли из клеточного осадка с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США), в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию ДНК определяли электрофоретически в 1% агарозном геле вместе с 1 kb ДНК-маркером молекулярного веса. Также концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные нуклеотидные последовательности проверяли секвенированием в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

2.5 Трансформация компетентных клеток *E. coli* RIPL плазмидной ДНК

К суспензии компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIPL) для (45 мкл) добавили 1 мкл раствора соответствующей плазмидной ДНК и инкубировали при 0°C в течение 30 мин. Затем суспензию прогревали при 42°C на водяной бане WB-4MS («Biosan», Латвия) в течение 30 сек и снова переносили на лед. Далее клетки обрабатывали, как описано выше для штамма XL1-Blue.

2.6 Культивирование рекомбинантных клеток *E. coli*

Рекомбинантные клетки RIPL трансформированные плазмидой pET19b – Surv и pET19b-Surv-O1 в 200 мл LB-среды, содержащей ампициллин (200 мг/л), культивировали с активным перемешиванием при 37°C до плотности равной 0,6 при длине волны 590 нм (ОП₅₉₀). Индукцию синтеза белков проводили добавлением ИПТГ (1 мМ), культивировали еще в течение 3-х часов, а после осаждали клетки центрифугированием (4000 g, 20 мин, 4°C).

Плазида pET19b–Surv, несущая ген сурвивина, сконструирована сотрудником лаборатории биолюминесцентных и экологический технологий ИБФ СО РАН к.б.н. Башмаковой Е.Е.

2.7 Экстракция и очистка рекомбинантных белков

Информация закрыта ЛАФранк

2.8 Активация обелинового домена гибридного белка целентеразином

Активацию проводили 1,2-кратным молярным избытком целентеразина в десятикратном объеме буфера TE (таблица 2), содержащем 10 мМ ДТТ, при 4°C в течение суток.

Активированные фотопротеины отделяли от незаряженных апобелков с помощью ионообменной хроматографии с использованием колонки Mono Q HP (5 мл) на хроматографической системе АКТА purifier (GE Healthcare, Великобритания). Элюцию белков с колонки проводили градиентом NaCl (0-1M) в буфере TE по следующей программе: 0-55 мл – буфер TE (нанесение образца и элюирование примесей слабо ионного характера), 55-75 мл – градиент 1M NaCl

в буфере TE от 0 до 100% (элюция белка), 75-80 мл – 1М NaCl в буфере TE и 80-85 мл (очистка колонки).

2.9 Белковый электрофорез

Белковый электрофорез проводили в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% SDS, по методу Лэммли [21] с использованием камеры (Corning, США) в буфере TGB (таблица 2) и с постоянной подачей тока 15 mA. Денатурированные образцы готовили с использованием лизирующего буфера (0,1 М Tris, pH 7,0, 3% SDS, 10% глицерол, 0,05% бромфеноловый синий), кипятили в течение 5 мин и наносили на гель.

Для окрашивания гелей использовали раствор Coomassie G-250 (Bio-Rad, США) в смеси 7,5% уксусной кислоты в 50% этаноле с последующей промывкой дистиллированной водой. Съемку гелей при естественном освещении осуществляли в камере AlphaImager (AlphaInnotech, США).

2.10 Сравнительный биолюминесцентный твердофазный анализ рекомбинантных сурвивинов

В лунки стрипового планшета (Costar, США) вносили по 50 мкл серию последовательных разведений сурвивина (от 2,3 нг/мл до 150 нг/мл) в двух повторах. Параллельно в лунки вносили коммерческий фьюз сурвивина с кальмодулином аналогичным образом. В контрольную лунку вносили 50 мкл буфера Т. Инкубировали при 37°C в течении 1 часа со встряхиванием (350 об/мин), и промывали 5 раз промывочным буфером(таблица 2). Для забивки свободной поверхности в лунки вносили по 150 мкл 1% раствора БСА в буфере PBS 7,5. Инкубацию и промывку проводили так же, как и после предыдущего шага. После в лунки внесли по 50 мкл раствора антител к сурвивину с концентрацией 1 мкг/мл. Проинкубировали как описано выше и промыли. В

качестве метки использовали proZZ-обелин, добавив его в каждую лунку 0,1 мкг/мл по 50 мкл.

Биолюминесценцию сформированных на поверхности комплексов измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия), снабженного высокоскоростным автоматическим инжектором, сразу после впрыскивания 60 мкл кальциевого буфера. Время экспозиции 5 секунд. В результатах учитывали полученное усреднённое значение биолюминесцентного сигнала (2 повтора).

2.11 Модельный биолюминесцентный твердофазный анализ конкурентного типа

Информация закрыта ЛАФранк

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Изучение экспрессии белка для полученной генно-инженерной конструкции и получение очищенного препарата гибридного белка

Биомассу клеток *E.coli*, трансформированных плазмидой pET-19b – Surv-OL(строение плазмиды и гибридного белка представлены на рисунке 3.1), разрушили ультразвуком и центрифугировали. Белковый состав образцов, полученных при анализе экспрессии белка и его распределении в клетках проводили с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях

Информация закрыта ЛАФрэнк

Рис.3.1. Строение плазмиды (а) и гибридного белка (b).

Результат электрофореза (рис.3.2) показал следующее: искомый белок активно экспрессируется, накапливаясь в тельцах-включениях. Состав белков до и после индукции сильно изменился, полосы с молекулярной массой целевого белка наблюдались в клетках после индукции и в тельцах-включениях. Затем белок растворили в 6М мочеvine.

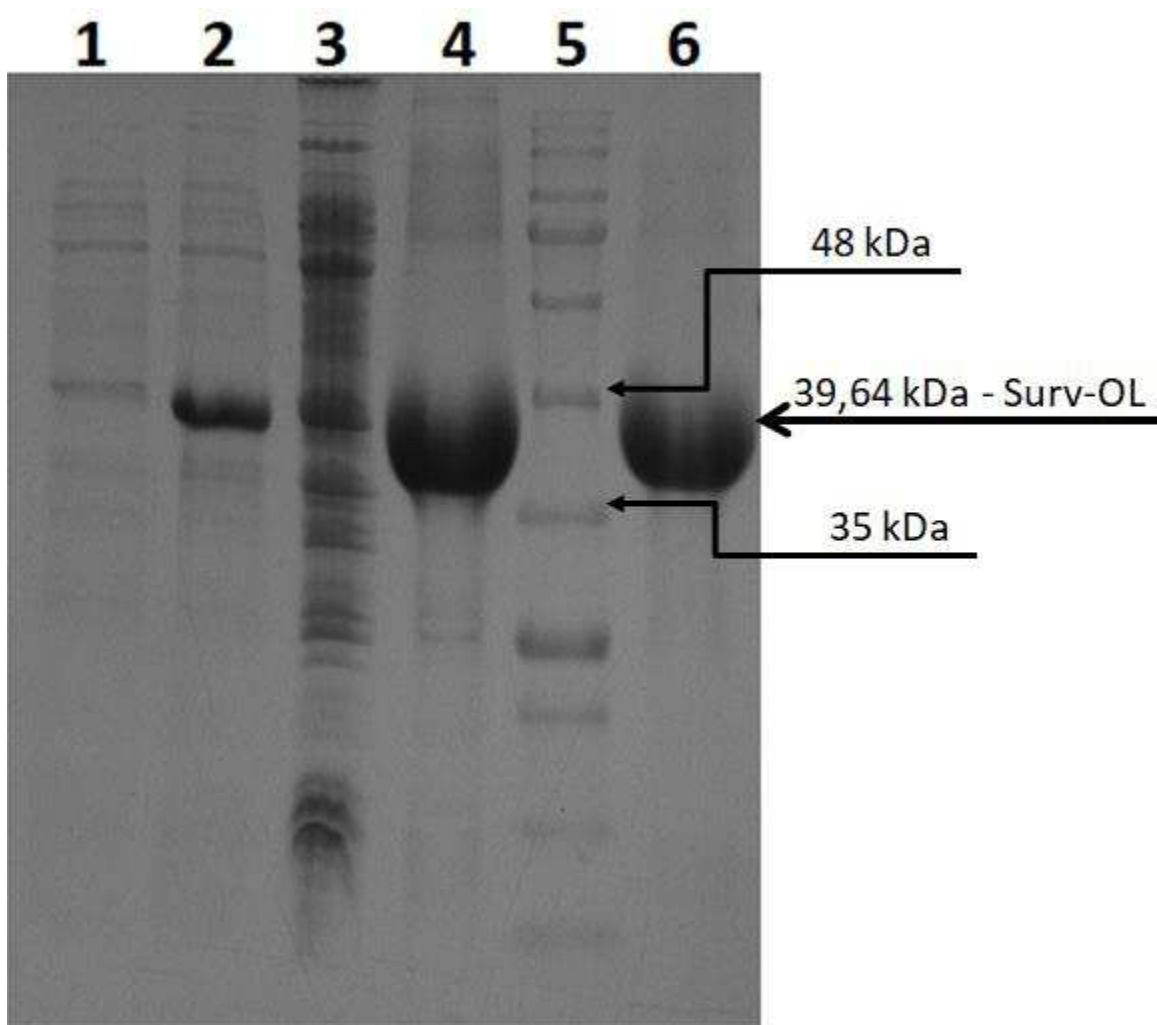


Рис.3.2. 12,5% ПААГ-электрофорез образцов при получении и очистке гибридного белка сурвивин-обелин (Surv-OL):1, 2 – клетки до и после индукции;3 – цитоплазматические белки;4 – тельца-включения (раствор в 6М мочеvine);5 – маркерные белки;6– белок после хроматографической очистки на колонке HiTrap DEAE FF

Целевой белок из полученного раствора выделяли с помощью ионообменной хроматографии в денатурирующих условиях (все буферы содержали 6 М мочеvinу). Использовали колонку HiTrap DEAE FF заполненную DEAE Sepharose Fast Flow - агарозой с иммобилизованными группами диэтиламиноэтила. Эта смола – слабый анионообменник, подходящий для разделения отрицательно заряженных молекул по величине заряда. После нанесения белок элюировали в градиенте ацетата натрия (0-1М).. Профиль элюции представлен на рисунке 3.3.

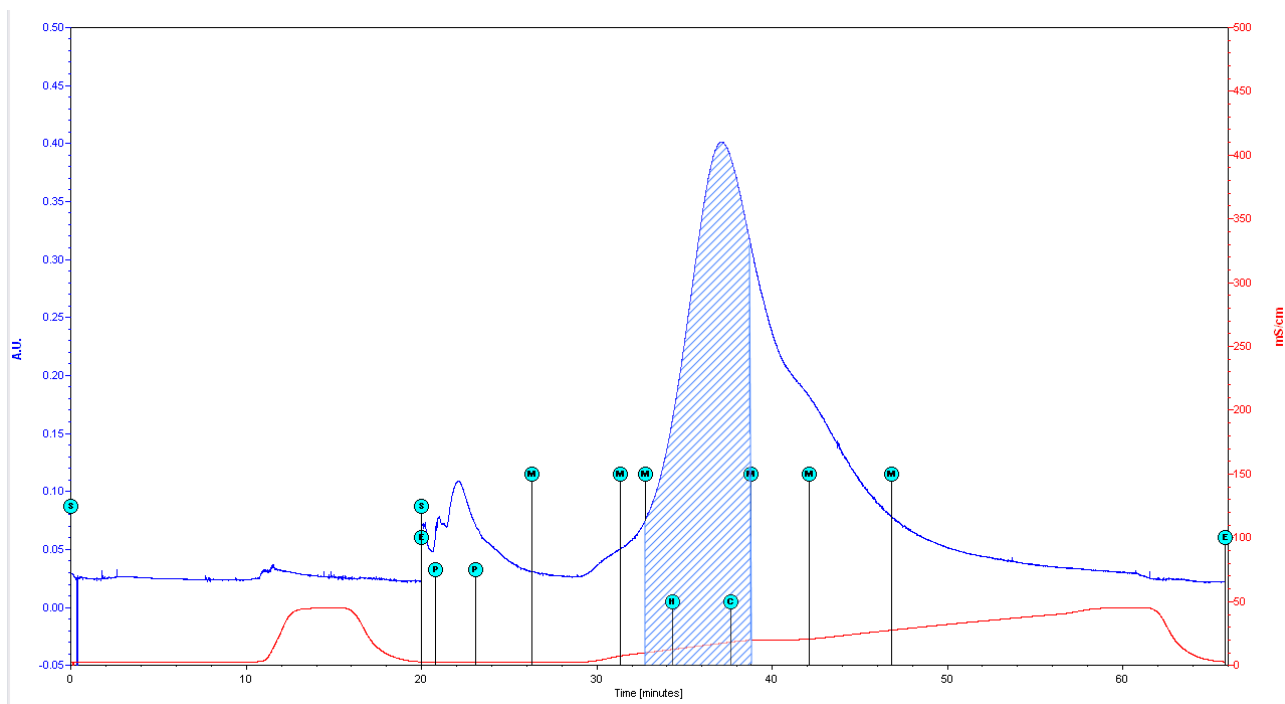


Рис.3.3. Профиль элюции хроматографической очистки телец включений, содержащих сурвивин-обелин

Синяя линия – оптическое поглощение элюируемых веществ (280 нм), красная – электропроводность элюата, отражающая концентрацию солей в элюате. Выделенная область – отобранная фракция, содержащая наибольшее количество целевого белка

Из фракции, содержащей основное количество белка отобрали аликвоту, перевели гель-фильтрацией в буфер без мочевины и определили концентрацию белка спектофотометрически по методу Лоури для расчета количества целентеразина необходимого для активации апобелка.

Активацию проводили 1,1 молярным избытком целентеразина в десятикратном объеме буфера. Активированные фотопротеины отделяли от незаряженных белков с помощью ионообменной хроматографии на колонке Mono Q HP градиентом NaCl в пределах 0-1М. Профиль элюции представлен на

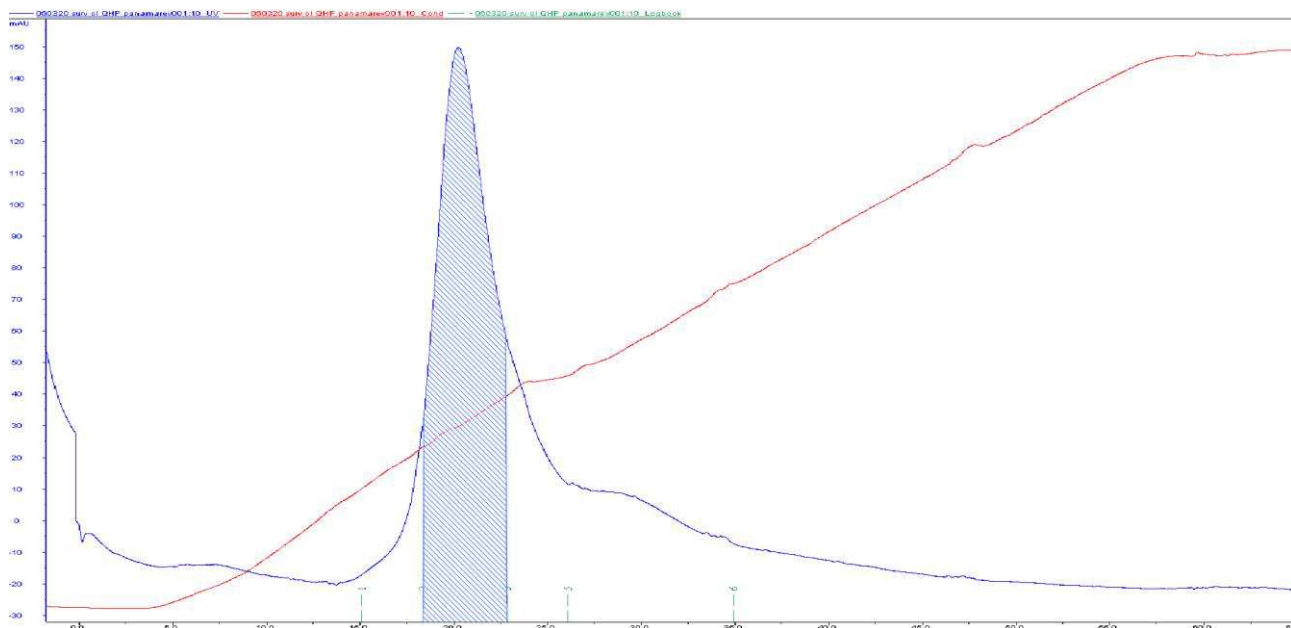


Рис.3.4 Профиль элюции хроматографической очистки сурвивин-обелина после активации целестерином

Синяя линия – оптическое поглощение элюируемых веществ (280 нм), красная – электропроводность элюата, отражающая концентрацию солей в элюате. Выделенная область – отобранная фракция, содержащая наибольшее количество целевого белка

В полученном образце измерили биолюминесцентную активность и концентрацию белка по Лоури (0,55 мг/мл). К раствору белка добавили бычий сывороточный альбумин в концентрации 0,1% и полученный препарат хранили при -20°C .

3.2 Изучение биолюминесцентных свойств гибридного белка

Пределом обнаружения фотопротейна считается такое количество белка, при котором сигнал от образца в 2-2,5 раза превышает сигнал от контрольной лунки, содержащей равный объем буфера. Для определения предела обнаружения в лунки иммунологического микропланшета вносили по 85 мкл раствора белка с диапазоном концентраций от 10 нг/мл до 0,001 нг/мл. В контрольную лунку вместо раствора белка внести буфер. Биолюминесцентный сигнал измеряли при быстром автоматическом впрыскивании раствора CaCl_2 с

помощью планшетного биолюминометра. Результаты представлены на рисунке 3.5.

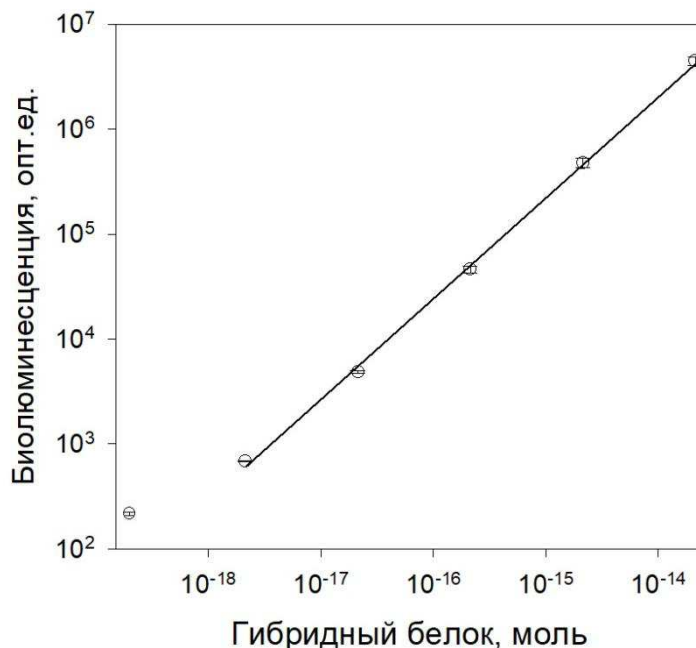


Рис.3.5. Зависимость биолюминесценции гибридного белка от его количества. Отдельно стоящая точка – контрольная лунка. Каждая точка - среднее значение сигнала от 3х независимых измерений \pm SD.

Предел обнаружения полученного нами гибридного белка составил 2,1 амоль, что близко к таковому для рекомбинантного обелина дикого типа — 1,4 амоль.

Стабильность обелинового домена оценивали по отношению Ca^{2+} -индуцированной биолюминесценции и Ca^{2+} -независимой биолюминесценции. Ca^{2+} -независимую биолюминесценцию измеряли при помощи кюветного биолюминометра в 500 мкл раствора с концентрацией белка 0,1 мг/мл. Константу спада биолюминесцентного сигнала рассчитывали по 5 независимым кривым спада сигнала путём экспоненциальной аппроксимации. Полученные значения занесены в таблицу 3.

Таблица 3. Сравнение биолюминесцентных характеристик гибридного белка и обелина дикого типа [22]

	Обелин дикого типа	Сурвивин-обелин
Безкальциевое выгорание, 10^{-6} (0,1 мг/мл)	0,9	11
Константа спада биолюминесцентного сигнала, s^{-1}	10,2	$7,27 \pm 0,05$
Предел обнаружения, амоль	1,4	2,1

По результатам изучения биолюминесцентных характеристик белка видно, что гибридный белок сопоставим с обелином дикого типа, что подтверждает пригодность гибридного белка для использования в качестве биолюминесцентного репортёра.

3.3 Твердофазный биолюминесцентный анализ гибридного белка на аффинность к антителам

Способность домена сурвивина в гибридном белке связываться с со специфичными антителами проверяли при помощи биолюминесцентного твердофазного микроанализа. Анализ проводили следующим образом: готовили серию разведений антител от концентрации 1000 нг/мл до 3,9 нг/мл. В контрольную лунку вместо раствора антител добавили буфер. Сорбцию антител на поверхность лунок планшета проводили как описано в экспериментальной части. На оставшуюся свободную поверхность сорбировали сывороточный бычий альбумин. Далее добавили в каждую лунку раствор гибридного белка

сурвивин-обелин в концентрации 23 нг/мл. В каждой лунке сформировались комплексы из антитела и гибридного белка, количество которых прямо пропорционально количеству сорбированных антител. Планшет поместили в биолюминометр, и измерили биолюминесценцию сформированных комплексов как описано ранее. По результатам измерения был построен график (рис.3.6).

Информация закрыта ЛАФранк

Рис.3.6. Зависимость биолюминесценции гибридного белка Surv-OL от концентрации антител к сурвивину (anti-Surv Ab), сорбированных на поверхности микропланшета, схема анализа показана вверху.

Исходя из результата анализа видно, что гибридный белок способен связываться со специфичными anti-Surv антителами. При этом была получена линейная зависимость сигнала от концентрации антител при сорбции.

Таким образом нами показано, что оба домена гибридного белка обладают свойствами исходных белков, благодаря чему данный гибрид может использоваться для проведения биолюминесцентного конкурентного анализа.

3.4 Получение очищенного препарата сурвивина и его сравнение с коммерческим аналогом

Клетки *E.coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIPL), трансформированные плазмидой pET-19b – Surv, кодирующей белок сурвивин культивировали в LB среде с ампициллином. Затем культуральную жидкость отделили от биомассы клеток центрифугированием. Деструкцию биомассы, промывку телец включений проводили способом, идентичным для гибридного белка (сурвивин-обелин). Тельца-включения с белком растворили в 6М мочеvine и очистили

хроматографией на колонке HiTrap DEAE FF. Электрофорез образцов при получении и очистке сурвивина представлен на рисунке 3.7.

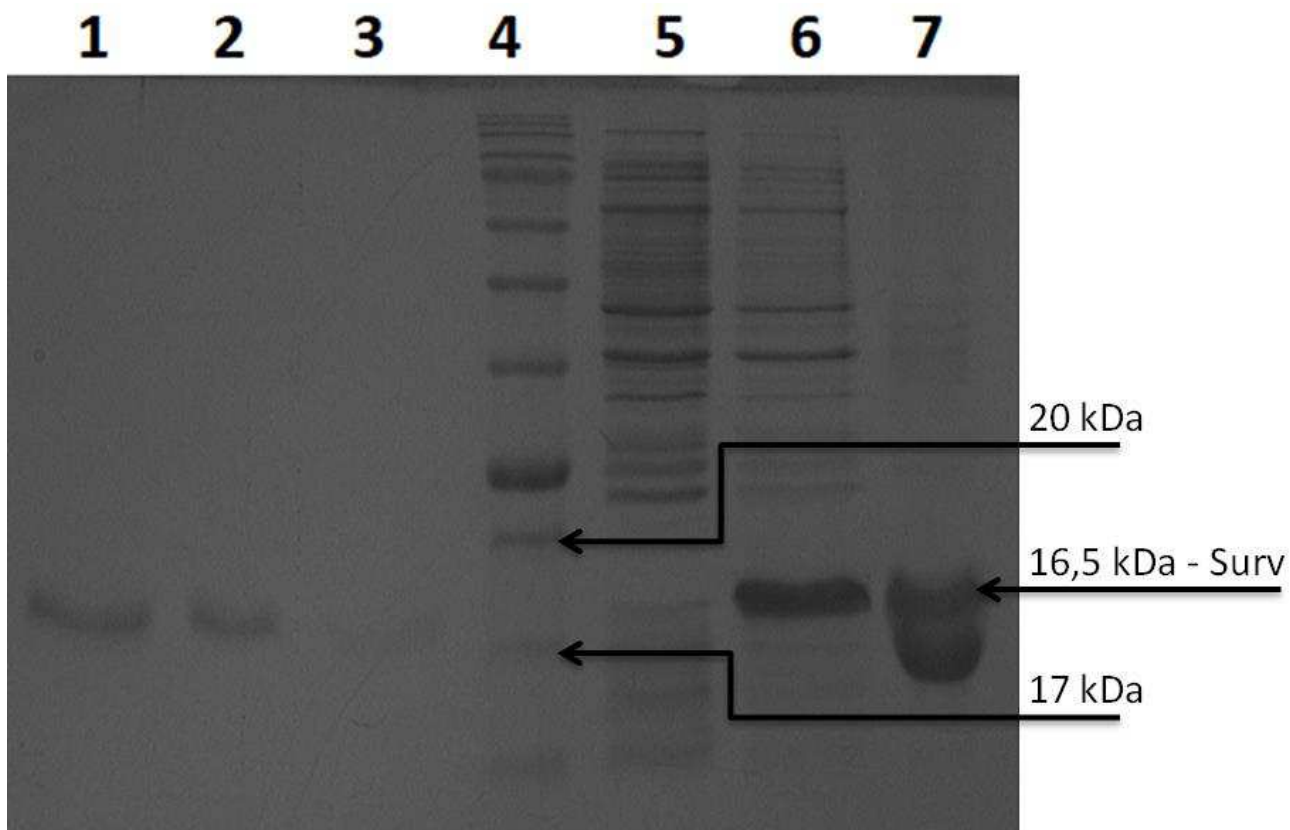


Рис.3.7. 15 % ПААГ- электрофорез образцов при получении и очистке сурвивина (Surv-OL): 1-3 – фракции смываемые с колонки градиентом AcNa; 4 – маркерные белки; 5,6 – клетки до и после индукции; 7 – тельца включения, растворённые в мочевице

Способность полученного рекомбинантного сурвивина связываться с соответствующими ему антителами проверяли при помощи биолюминесцентного твердофазного микроанализа. Для сравнения в том же анализе использовали коммерческий белок, представляющий собой гибрид сурвивина с кальмодулином.

Информация закрыта ЛАФрэнк

Рис.3.8.Схема проведения биолюминесцентного твердофазного анализа (стадии анализа показаны сверху вниз):

Анализ проводили следующим образом (схема на рис.3.8): на поверхности лунок планшета иммобилизовали в разных концентрациях сурвивин в диапазоне от 150 нг/мл до 2,3 нг/мл. После инкубирования и промывки на оставшуюся свободную поверхность сорбировали бычий сывороточный альбумин. Далее в каждую лунку добавили раствор анти-Surv антител в одинаковой концентрации. Антитела связались с сурвивином, лишнее смылось при промывке. В качестве белка-репортёра использовали гибридный белок pZZ-обелин, в состав которого помимо обелина входит домен В из белка А золотистого стафилококка, обладающий аффинностью к константным участкам (Fc) иммуноглобулинов класса G[23]. В каждой лунке сформировались комплексы, количество которых прямо пропорционально количеству иммобилизованного сурвивина. Планшет поместили в биолюминометр, и измерили биолюминесценцию сформированных комплексов как описано ранее. Результаты представлены на рис.3.9.

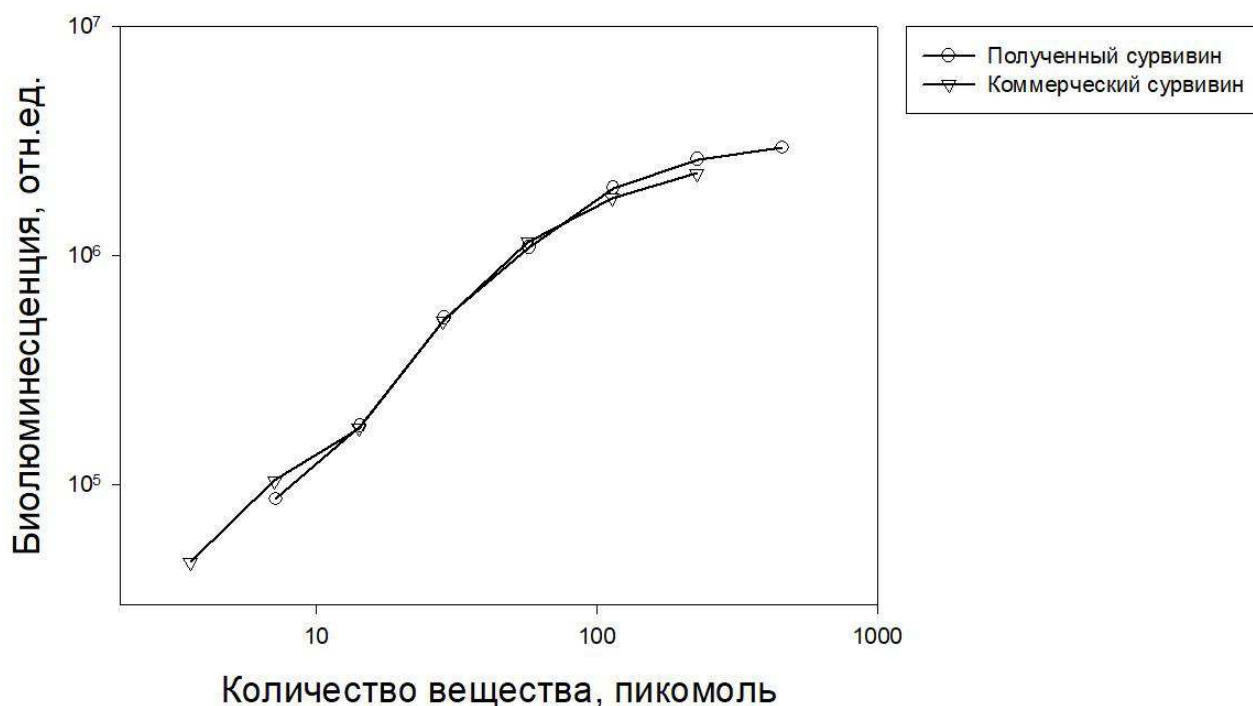


Рис.3.9. Зависимость биолюминесцентного сигнала от количества сурвивина

По результатам видно, что полученный сурвивин обладает способностью связываться со специфичными антителами, практически такой же как у коммерческого варианта сурвивина.

3.5 Модельный биолюминесцентный твердофазный анализ конкурентного типа

Информация закрыта ЛАФранк

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время поиск чувствительных онкомаркеров для диагностики рака и разработка тест-системы на их основе — это актуальная задача современной биотехнологии и биомедицины. Одним из важнейших онкомаркеров является белок сурвивин.

В данной работе разработан способ получения и очистки гибридного белка сурвивин-обелин, а также исследованы его свойства как специфичного биолюминесцентного белка-репортёра. В результате проведенного исследования были получены следующие результаты:

1. Получена генетическая конструкция, кодирующая гибридный белок сурвивин-обелин. Правильность полученной генетической конструкции подтверждена секвенированием.
2. Получен рекомбинантный штамм-продуцент *E. coli*, несущий плазмидную ДНК с геном гибридного белка и обеспечивающий синтез целевого белка. После выделения и хроматографии получен препарат гибридного белка высокой очистки.
3. Изучены биолюминесцентные свойства гибридного белка и показано, что они близки таковым рекомбинантного обелина дикого типа.
4. Биолюминесцентным твердофазным микроанализом показано, что домен сурвивина гибридного белка обладает способностью специфично связываться с анти-сурвивин антителами.
5. Модельным биолюминесцентным твердофазным микроанализом конкурентного типа показано, что гибридный белок пригоден для определения концентрации сурвивина в диапазоне 3-700 пг/мл.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

IAP – группа белков-ингибиторов апоптоза;

BIR – бакуловирусный IAP повтор (BIR);

INCENP – inner centromere protein, внутренний белок центромеры;

CPC – chromosomal passenger complex, комплекс белков-хромосомных пассажиров;

HBXIP – hepatitis B X-interacting protein;

XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis protein;

VEGF – vascular endothelial growth factor, ростовой фактор эндотелия сосудов

SDM – site directed mutagenesis, сайт-направленный мутагенез;

LB-среда (Lysogeny broth);

SOC-среда (Super Optimal broth with Catabolic repressor);

ИПТГ – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

OL – обелин;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ДТТ – дитиотреитол

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Каприна А.Д, Старинский В.В, Петрова В.Г. Злокачественные новообразования в России в 2017 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2018, 250 С.
2. Shariat S.F et al. Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer // J Urol – 2004, № 171(2 pt 1), P. 626-630
3. Xuefeng Li, Yaming Wang, Jianjun Xu, Qingyun Zhang. Sandwich ELISA for detecting urinary Survivin in bladder cancer // Chinese Journal of Cancer Research – 2013, № 25(4), P.375-381
4. Laurent Chantalat, Dimitrios A. Skoufias et al. Crystal Structure of Human Survivin Reveals a Bow Tie–Shaped Dimer with Two Unusual α -Helical Extensions // Molecular Cell – 2000, № 6(1), P. 183-189
5. V. Margulis, Y. Lotan et al. Survivin: a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer // World J Urol – 2008, № 26(1), P.59-65
6. Alain C. Mita, Monica M. Mita et al. Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics // Clin Cancer Res – 2008, № 14(16), P. 5000-5005
7. Mar Carmena, Michael Wheelock et al. The Chromosomal Passenger Complex (CPC): From Easy Rider to the Godfather of Mitosis // Molecular Cell Biology – 2012, № 13(12), P.789-803
8. Praveen Kumar Jaiswal, Apul Goel et al. Survivin: A molecular biomarker in cancer // The Indian Journal of Medical Research – 2015, № 141(4), P. 389–397
9. Jennifer D. Sharp, Derek A et al. Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis // Frontier in bioscience – 2002, № 7, P. 36-41
10. S. Ziaee, S. Moula et al. Diagnosis of Bladder Cancer by Urine Survivin, an Inhibitor of Apoptosis // Urology Journal – 2006, № 3(3), P. 150-153

-
11. Srivastava AK, Singh PK, Srivastava K et al. Diagnostic role of survivin in urinary bladder cancer // Asian Pac J Cancer Prev – 2013, № 14(1), P.81-85
 12. Frank L.A., Krasitskaya V.V. Application of Enzyme Bioluminescence for Medical Diagnostics // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology – 2014, №144, P. 175-197
 13. Frank L.A. Ca²⁺-Regulated Photoproteins: Effective Immunoassay Reporters // Sensors – 2010, №10, P. 11287–11300
 14. Frank L.A. Creation of Artificial Luciferases to Expand their Analytical Potential // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening – 2015, №18, P. 919-929
 15. Novus Biotechnologicals: Human Survivin ELISA Kit (Colorimetric) URL: https://www.novusbio.com/products/survivin-elisa-kit_ka0441 (дата обращения: 27.04.2020)
 16. Cloud-Clone corp: ELISA Kit for Survivin (Surv) URL: <http://www.cloud-clone.com/products/SEC045Hu.html> (дата обращения: 27.04.2020).
 17. FineTest: Human Surv(Survivin) ELISA Kit URL: <https://www.fine-test.com/product/eh0277/> (дата обращения: 27.04.2020).
 18. Abcam: Human Survivin ELISA Kit (ab183361) URL: <https://www.abcam.com/human-survivin-elisa-kit-ab183361.html> (дата обращения: 27.04.2020).
 19. Bratthauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods // Immunocytochemical Methods and Protocols – 2010, № 588, P. 257-270
 20. ThermoFisher Scientific: Survivin Human ProcartaPlex™ Simplex Kit URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EPX01A-12158-901?SID=srch-srp-EPX01A-12158-901#/EPX01A-12158-901?SID=srch-srp-EPX01A-12158-901> (дата обращения: 27.04.2020).
 21. Laemli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature – 1970, № 227, P. 680–685.

-
- 22 . Eugenia E. Bashmakova, Vasilisa V. Krasitskaya, Alexander N. Kudryavtsev, Vitaly G. Grigorenko and Ludmila A. Frank Hybrid Minimal Core Streptavidin–Obelin as a Versatile Reporter for Bioluminescence-based Bioassay // Photochemistry and Photobiology – 2017, №93, P. 548–552.
23. Frank L.A, Illarionova V.A, Vysotski E.S. Use of proZZ-obelin fusion protein in bioluminescent immunoassay // Biochemical and Biophysical Research Communications – 1996, №219, P. 475-479

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой



подпись

Т.Г. Волова

инициалы, фамилия

« ____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Получение гибридного белка сурвивин-обелин и исследование его свойств как
биоспецифичного биолюминесцентного репортера

Руководитель



подпись, дата

профессор, д.б.н.

должность, учёная степень

Л.А. Франк

инициалы, фамилия

Выпускник



подпись, дата

Н.С.Панамарев

инициалы, фамилия

Красноярск 2020