

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

институт

Базовая кафедра биотехнологии

кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Т.Г. Волова

подпись инициалы, фамилия

« ____ » _____ 20 __ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

код – наименование направления

Получение и изучение аффинных магнитных микрочастиц

как биоспецифичных носителей

Руководитель

подпись, дата

профессор, д.б.н.

должность, ученая степень

Л.А. Франк

инициалы, фамилия

Научный консультант

подпись, дата

к.б.н., с.н.с. ИБФ СО РАН

должность, ученая степень

В.В. Красицкая

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

П.А. Ваулин

инициалы, фамилия

Красноярск 2021

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 6 |
| 1.1 Аффинная хроматография..... | 6 |
| 1.2 Носители для аффинной хроматографии..... | 9 |
| 1.3 Линкер..... | 11 |
| 1.4 Лиганды и вспомогательные белки..... | 12 |
| 1.4.1 Иммуноглобулины..... | 12 |
| 1.4.2 Стрептавидин и авидин..... | 16 |
| 1.4.3 Кальмодулин..... | 19 |
| 1.4.4 S-белок..... | 19 |
| 1.4.5 Глутатион..... | 20 |
| 1.4.6 Полисахариды..... | 20 |
| 1.4.7 Иммобилизованные ионы металлов и His-tag..... | 21 |
| 1.4.8 Halo-tag..... | 22 |
| 1.5 Удаление вспомогательных фрагментов..... | 23 |
| 1.6 Биоспецифичные носители для биотехнологии..... | 24 |
| 1.6.1 Частицы как носители для анализа..... | 24 |
| 1.6.2 Частицы как носители для отбора специфичных ДНК аптамеров ... | 30 |
| 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 35 |
| 2.1 Вещества и реактивы..... | 35 |
| 2.2 Выделение и очистка рекомбинантного стрептавидина..... | 37 |
| 2.3 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК, несущей ген кБСЖК..... | 38 |
| 2.4 Культивирование рекомбинантных клеток <i>E. coli</i> | 38 |
| 2.5 Выделение и очистка рекомбинантного кБСЖК..... | 38 |

| | | |
|------|---|----|
| 2.6 | Определение концентрации белков..... | 39 |
| 2.7 | Ковалентное присоединение стрептавидина и кБСЖК к магнитным частицам..... | 39 |
| 2.8 | Определение количества ковалентно присоединенного к магнитным частицам стрептавидина..... | 41 |
| 2.9 | Иммобилизация биотинилированного олигонуклеотида на стрептавидин-активированных магнитных частицах..... | 41 |
| 2.10 | Выявление кБСЖК, ковалентно связанного с поверхностью магнитных частиц, с помощью конъюгата фотопротеина обелина с антителом к кБСЖК... | 42 |
| 3 | РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ..... | 43 |
| 3.1 | Получение препарата рекомбинантного стрептавидина..... | 43 |
| 3.2 | Выделение и очистка рекомбинантного кБСЖК..... | 44 |
| 3.3 | Ковалентное присоединение стрептавидина к магнитным частицам..... | 46 |
| 3.4 | Ковалентное присоединение кБСЖК к магнитным частицам..... | 49 |
| 3.5 | Применение полученных активированных магнитных частиц как биоспецифичных носителей..... | 52 |
| | ВЫВОДЫ..... | 55 |
| | СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 56 |
| | СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ..... | 58 |

ВВЕДЕНИЕ

Поверхностно-активированные сорбенты широко используются для аффинной хроматографии, а также в качестве биоспецифичных носителей для биотехнологии. Они подразделяются на неорганические, представленные в основном носителями на основе диоксида кремния, а также магнитными частицами, синтетическими органическими, например носители на основе полистирола, полиметакрилата, а также биополимерами, в основном представленными различными полисахаридами и их модификациями. Использование магнитных частиц в качестве носителя позволяет легко разделять реакционные смеси просто прикладывая внешнее магнитное поле, которое позволяет свободно отделить раствор от частиц с иммобилизованными на них веществами. Представленные на поверхности функциональные группы могут использоваться в неизменном виде или активироваться различными реагентами.

Благодаря высоко специфичному связыванию с помощью аффинных сорбентов выделяют целевые молекулы используя необработанный клеточный лизат, что значительно ускоряет процесс очистки целевого соединения. Также поверхностно-активированные сорбенты могут использоваться в качестве биоспецифичных носителей для биотехнологии. Например, разработаны методы отбора специфичных ДНК-аптамеров с использованием в качестве носителей магнитных микро- и наночастиц, а также различные методы анализа, например, анализ на аутоантитела и антитела к инфекционным агентам.

Целью работы являлось разработать способ получения магнитных микрочастиц, активированных белками интереса — рекомбинантными стрептавидином *Streptomyces avidinii* и кардиальным белком, связывающим жирные кислоты (кБСЖК), а также показать их использование в биотехнологии в качестве аффинных магнитных сорбентов и носителей.

Исходя из цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить высокоочищенные препараты рекомбинантных стрептавидина и кБСЖК;
2. Исследовать условия ковалентного связывания стрептавидина и кБСЖК с магнитными микрочастицами и синтезировать образцы, активированные соответствующими белками;
3. Изучить свойства полученных материалов как аффинных носителей для биотехнологии.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Аффинная хроматография

Аффинная хроматография – один из видов жидкостной хроматографии, в основе которой лежит специфические и обратимые взаимодействия (например, антиген-антитело, фермент-субстрат, гормон-рецептор и др.) целевых молекул и лигандов, иммобилизованных на носителе. Общая схема аффинной хроматографии выглядит следующим образом (рисунок 1). Как правило, лиганды к интересующим молекулам иммобилизуют на твёрдой подложке через соответствующий линкер, чтобы исключить влияние поверхности на связывание молекулы-мишени с лигандом. Затем смесь (например, клеточный лизат), содержащую целевые молекулы, инкубируют с данным аффинным сорбентом и промывают буфером, чтобы удалить неспецифически связавшиеся молекулы. Затем специфически связавшиеся молекулы элюируют с использованием свободного лиганда в качестве конкурента за связывание или путём изменений условий связывания (например, ионной силы или pH раствора).

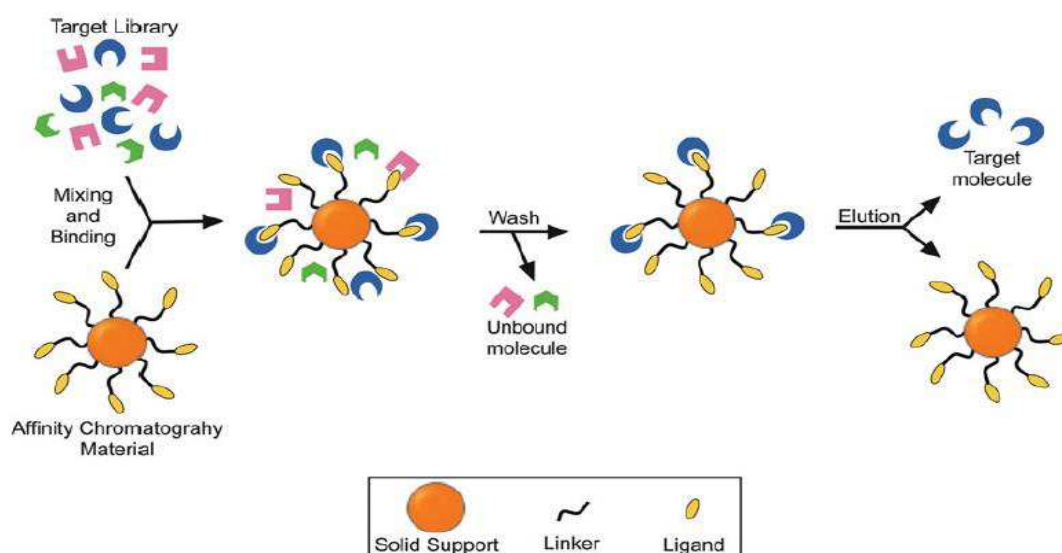


Рисунок 1. - Общая схема аффинной хроматографии [1].

Целевой белок можно очистить из клеточного лизата или других сложных смесей, используя специфические биологические взаимодействия. Очистку белков с помощью аффинной хроматографии можно разделить на подходы с использованием вспомогательных белков и без них. Например, антитела и белки, связывающие нуклеиновые кислоты, могут быть выделены и очищены без использования вспомогательных белков. В очистке антител используется специфическое взаимодействие между Fc областью антитела и белком А или белком G, которые представляют собой белки клеточной стенки бактерии *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.* соответственно [1]. Белки, связывающие нуклеиновые кислоты, например, такие как факторы транскрипции, могут быть очищены с помощью гепарина, который представляет собой высокосульфатированный гликозаминогликан [1]. Также последовательности ДНК или РНК, с которыми связывается целевой белок, могут быть использованы для его выделения и очистки [1].

В отличие от упомянутых выше антител и белков, связывающих нуклеиновые кислоты, большинство клеточных белков не имеют специфических взаимодействий с молекулами, которые можно было бы использовать в качестве лигандов. Поэтому с помощью технологии рекомбинантной ДНК к последовательности кодирующей целевой белок, к его С- или N-концу, добавляется последовательность вспомогательных белков, которая и будет использоваться для взаимодействия с лигандом. Данные вспомогательные фрагменты могут быть короткими полипептидами или более крупными белками (рисунок 2). Помимо облегчения выделения и очистки белков вспомогательные белки также могут использоваться для увеличения экспрессии белка и его растворимости. Например, глутатион S-трансфераза (glutathione S-transferase, GST) и мальтоза-связывающий белок (maltose-binding protein, MBP) хорошо растворимы и, при слиянии этих белков с нерастворимым или мало растворимым целевым белком, можно сделать его растворимым [1]. Вспомогательные белки можно разделить на группы по типам взаимодействия

с лигандами, например, взаимодействие фермент-субстрат, взаимодействие антитело-антиген, другие белок-белковые взаимодействия, взаимодействия полигистидина и иона хелатированного металла (например, с ионом Ni^{2+}).

Идеальный вспомогательный белок не нарушает структуру и функцию целевого белка, и позволяет эффективно выделять и очищать этот целевой белок. Однако в действительности у каждого используемого вспомогательного фрагмента есть свои преимущества и недостатки и выбор зависит от типа клетки, в которой происходит экспрессия рекомбинантного белка и от свойств самого белка.

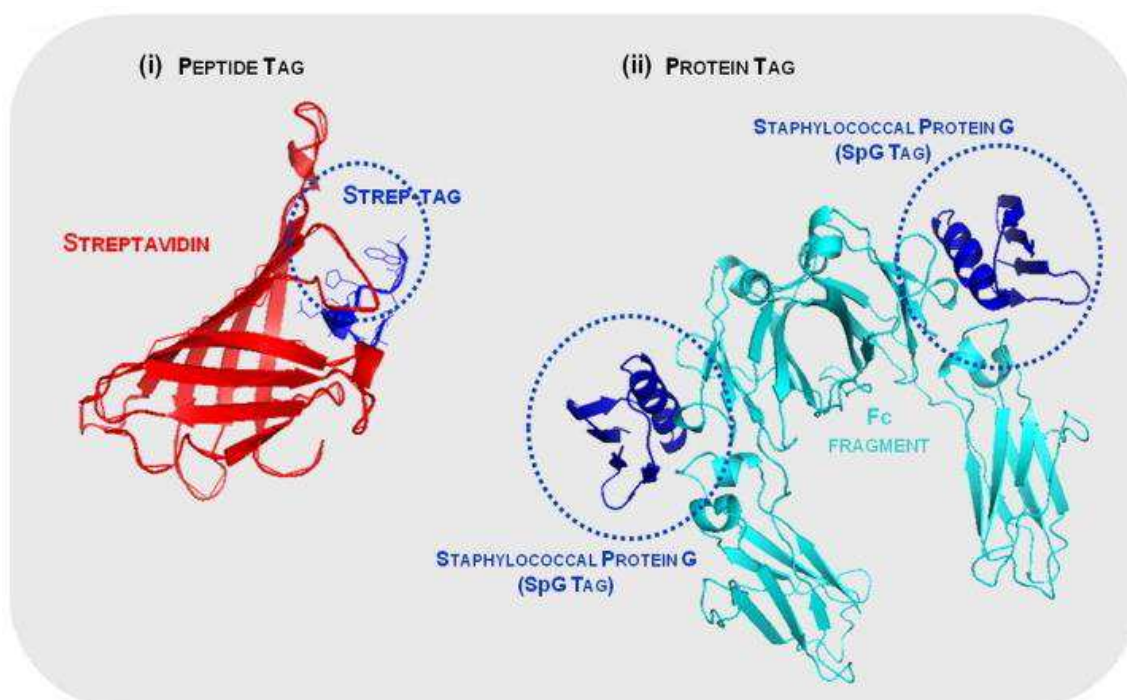


Рисунок 2. - Пример пептидных и белковых вспомогательных фрагментов. (i) Strep-tag – пептид, состоящий из 8 аминокислот и обладающий высокой аффинностью к стрептавидину; (ii) SpGTag – белок G массой 58 или 65 кДа, обладающий высокой аффинностью к Fc фрагменту иммуноглобулина G; на рисунке показано взаимное ориентирование белков в получившихся комплексах (области контакта молекул обведены кружками) [1].

1.2 Носители для аффинной хроматографии

Носитель для аффинной хроматографии в идеале должен быть однороден, химически и механически стабилен, иметь гидрофильную поверхность, поскольку выделение целевого вещества происходит как правило в водных растворах. Носитель должен минимально неспецифически связывать белки, а также иметь соответствующие функциональные группы на своей поверхности для иммобилизации лиганда и высокое отношение площади поверхности к объему. Неспецифическое связывание белков происходит в основном за счет гидрофобных или ионных взаимодействий с носителем, потому предпочтительнее использовать умеренно гидрофильные носители, а достичь химической и механической стабильности можно за счёт композитной конструкции носителя [1].

Носители, используемые в аффинной хроматографии, в основном делятся на следующие группы: носители на основе полисахаридов, носители на основе синтетических органических полимеров, носители на основе диоксида кремния. Гранулы на основе агарозы, декстрозы, целлюлозы уже давно используются в качестве носителей в аффинной хроматографии. Преимуществом данных носителей является относительно высокое отношение площади поверхности к объему. Недостатком является их низкие механические качества, данные носители выдерживают только низкое давление. Для того чтобы компенсировать этот недостаток была создана поперечно-сшитая агароза, представленная на рынке под торговой маркой Sepharose™. Сефароза имеет повышенную химическую и механическую стабильность, может выдерживать широкий диапазон pH (pH=3-12), может использоваться с большинством водных растворителей (включая денатурирующие) и со многими органическими растворителями [1].

Носители на основе синтетических органических полимеров обычно более устойчивы к различным органическим растворителям и давлению по

сравнению с носителями на основе полисахаридов. Также использование органических полимеров удобно для иммобилизации гидрофобных лигандов. Примером данной группы носителей может выступить TOYOPEARL™, представляющий собой производное полиметакрилата [1]. Также есть носители на основе полимеров, состоящих из трех видов метакрилатов и этиленгликоля, они имеют монолитную структуру и демонстрирует низкий уровень неспецифического связывания белков [1]. Ещё одним примером подобного типа носителей являются дисперсные латексные бусины, состоящие из полистирена и полиглицидил метакрилата [1]. Внешний слой бусин умеренно гидрофильный и потому демонстрирует низкий уровень неспецифического связывания белков, а также может легко модифицироваться различными функциональными группами, которые затем можно использовать для иммобилизации лиганда [1].

Носители на основе диоксида кремния имеют высокую механическую прочность и относительно высокое отношение площади поверхности к объему. Однако данные носители могут использоваться только в узком диапазоне рН (обычно при рН=2-8), поскольку в щелочных условиях подвержены гидролизу [1]. Потому в основном используются носители на основе диоксида кремния с полимерным покрытием [1].

Также существует аффинная хроматография с использованием магнитных частиц. Аффинные магнитные частицы получают путём захвата ионов оксида железа агарозой или другим полимерным материалом. В настоящее время на рынке доступны парамагнитные аффинные бусины, например, такие как Dynabeads™, в не модифицированной форме или с поверхностью покрытой лигандами, например, такими как стрептавидин, глутатион, белок А, антитела и др. [1].

Таблица 1 – Коммерчески доступные носители для аффинной хроматографии

| Название | Материал матрицы | Размер частиц (мкм) |
|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Sepharose | Agarose | 40-165 |
| SG beads TM | Polystyrene and polyGMA | 0,2 |
| Dynabeads TM | Polystyrene | 1-5 |
| Bio-Gel P-100 TM | Polyacrylamide | 90-180 |
| AllTech Macrosphere TM | Silica | 7 |
| Affi-Gel TM | Agarose | 75-300 |
| TOYOPEARL TM | Polymethacrylate | 20-300 |
| FG beads TM | Polystyrene, polyGMA, ferrite | 0,2 |
| SiCORE TM | Silica | 1 |

1.3 Линкер

Линкер в аффинной хроматографии представляет собой как правило длинноцепочечную молекулу, которая связывает лиганд с носителем. Прямая иммобилизация лигандов на носителях часто снижает эффективность очистки целевой молекулы из-за возникающих пространственных затруднений, то есть может быть затруднен доступ к участку лиганда, взаимодействующему с целевой молекулой [1]. Использование правильно сконструированных линкеров может снизить пространственные затруднения, создавая лучшие условия для захвата целевой молекулы. Также соответствующий выбор линкера важен для уменьшения неспецифического связывания белков. Например, линкеры, содержащие полиметиленовую цепь более гидрофобны, чем линкеры содержащие полиэтиленгликолевую цепь, и соответственно более склонны к неспецифическому связыванию белков [1].

1.4 Лиганды и вспомогательные белки

Важные моменты, которые нужно учитывать при выборе лиганда, включают в себя: аффинность к целевой молекуле, специфичность связывания, возможность иммобилизации, стабильность в условиях связывания, промывки и элюирования, сохранение связывающей способности после иммобилизации и возможность повторного использования [1]. Как правило лиганд ковалентно связан с носителем через линкер. Наиболее распространенным методом химической иммобилизации лиганда является образование пептидной связи. Выбор носителей и лигандов широко варьирует в зависимости от цели аффинной хроматографии.

1.4.1 Иммуноглобулины

Антитело представляет собой Y-образный белковый комплекс, состоящий из четырех полипептидных цепей: двух одинаковых тяжелых цепей и двух одинаковых легких цепей, связанных дисульфидными мостиками (рисунок 3). Концевой участок антитела, называемый Fc областью (fragment crystallizable region), состоит из C-концевых консервативных областей двух тяжелых цепей. Верхний участок, называемый Fab областью (fragment antigen binding), состоит из консервативных и переменных областей легкой и тяжелой цепей. Переменная область отвечает за связывание антигена. Антитела могут быть иммобилизованы через свободные аминогруппы на носителях, активированных, например N, N'-карбонилдиимидазолом, N-гидроксисукцинимидом, цианоген бромидом [2]. Также антитела могут быть иммобилизованы через свободные аминогруппы на носителях, имеющих на поверхности реакционноспособные эпоксидные, альдегидные группы. Связывание с носителем через аминогруппы наиболее простой метод иммобилизации антител, но имеет определенные недостатки. Так, например связывание может пройти через аминогруппу в области антигенсвязывающего сайта или рядом с ним, что приведет к снижению эффективности связывания антигена.

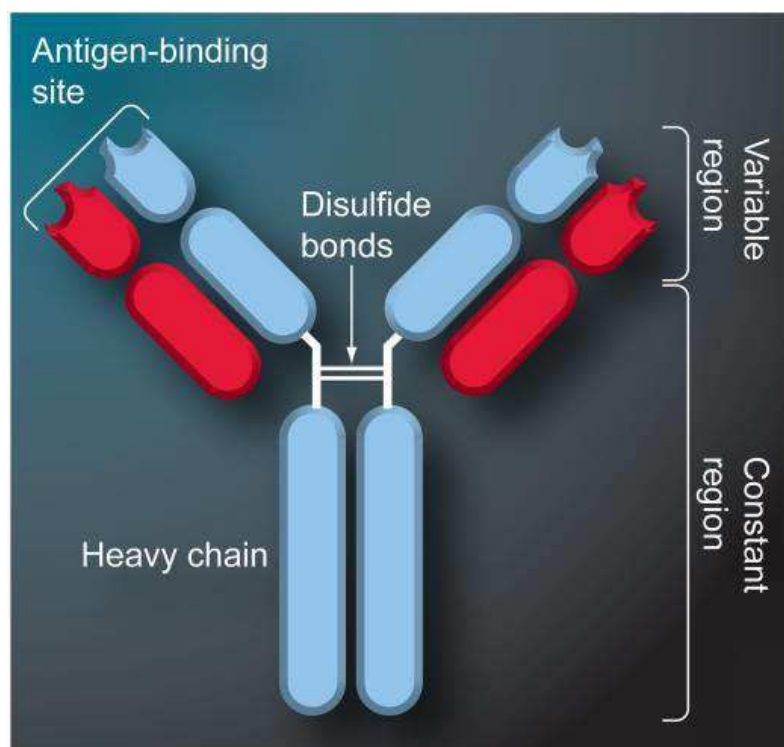


Рисунок 3. - Строение антитела [2]. Antigen-binding site – антиген связывающий сайт; Heavy chain – тяжелая цепь; Disulfide bonds – дисульфидные мостики, соединяющие две тяжелые цепи; Variable region – переменная область; Constant region – постоянная область.

Также использование аминогрупп приводит к случайной ориентации антител на носителе, что в свою очередь может приводить к стерическим затруднениям и снижению эффективности связывания [2]. Для более предсказуемого связывания антител с носителем могут быть использованы сульфгидрильные группы антитела. Также, так как антитела являются гликозилированными белками, для связывания могут быть использованы углеводные остатки, расположенные в Fc области. В этом случае сперва производится окисление углеводных остатков с образованием альдегидов и затем уже через альдегидные группы происходит связывание с носителем, например содержащим на своей поверхности гидразидные группы [2]. Также антитела могут быть иммобилизованы на носителе с использованием вторичного лиганда. Например, для иммобилизации можно использовать биотинилированные антитела и носитель со связанным стрептавидином или авидином. Наиболее популярным

вариантом биотинилирования является инкубация антител с N-гидроксисукцинимид-D-биотином [2]. Однако при этом методе также используются свободные аминокгруппы антитела, что может приводить к снижению эффективности связывания антигена. Для того чтобы этого избежать можно использовать гидразид-биотин, который реагирует с альдегидными группами, предварительно окисленных в мягких условиях, углеводных остатков антитела [2].

Часто для очистки белков при помощи иммобилизованных антител использовались взаимодействия иммуноглобулин-связывающего домена белка А с Fc-областью IgG млекопитающих [3]. Очищение проходит в одну стадию и элюция белка происходит при рН=1-2, что может повлиять на структуру и функцию целевого белка. Белок А состоит из 5 гомологичных доменов — E, D, A, B и C, при этом IgG преимущественно связывается с B-доменом [3]. Поэтому именно домен B имеет смысл использовать для конструирования аффинного сорбента. При этом этот полипептид был изменен для повышения устойчивости к удалению химическими методами и улучшения связывания, получив название Z-домен [3]. Бактериальный иммуноглобулин-связывающий домен белка G также используется для очистки белков. Белок G состоит из разных доменов - A, B, C, D, и в отличие от белка А способен связываться как с IgG, так и с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), что позволяет очищать слитые с белком G белки, используя в качестве лигандов как IgG, так и ЧСА [3].

Также в качестве вспомогательных фрагментов для очистки белков иммобилизованными иммуноглобулинами используются пептидные эпитопы (участок антигена, распознаваемый антителами) такие как FLAG, с-мус, T-7, антиген гемагглютинаина (hemagglutinin antigen, HA) и Softags [3]. С-мус является продуктом протоонкогена, обладающего высокой аффинностью к моноклональному (вырабатываемому иммунными клетками, принадлежащими

к одному клеточному клону) антителу 9E10. Пептид Т-7 – это поверхностный пептид фага Т7, состоящий из 11 аминокислот, обладающий высокой аффинностью к Т-7-моноклональному антителу [3]. НА – пептидный эпитоп вируса гриппа, узнаваемый моноклональным антителом 12 СА5. В сравнении с FLAG, Т-7, НА и С-тус редко применяются для очистки рекомбинантных белков [3].

FLAG представляет собой гидрофильный октапептид с аминокислотной последовательностью DYKDDDDK, обладающий высокой аффинностью к моноклональным антителам М1 и М2. Связывание с антителом М1 происходит в присутствии кальция, что позволяет элюировать белок слитый с FLAG в мягких условиях в присутствии соединений, хелатирующих кальций, например, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА). Элюция белка связанного с М2 обычно требует снижения рН, что может повредить целевому белку [3]. Особенностью FLAG является возможность его удаления без встраивания сайтов расщепления протеазой, поскольку присущая ему последовательность DDDDK распознаётся ферментом энтерокиназой [3]. Также возможно использование расположенных подряд повторов пептида FLAG для повышения эффективности очистки. Например, было показано, что эффективность очистки на носителях с иммобилизованными М2-антителами белков, слитых с пептидом 3xFLAG, выше, чем при очистке белков, слитых с пептидом FLAG, и при этом так же не наблюдается влияние пептида на структуру и функцию белка [4].

Softtags – пептиды, которые распознаются полиол-чувствительными моноклональными антителами (polyol-responsive monoclonal antibodies, PR-mAb) [3]. Белки слитые с Softtag могут быть элюированы в мягких условиях с использованием низкомолекулярных полиолов в качестве конкурирующих агентов, что позволяет сохранить структуру и функцию целевого белка. Есть три вида Softtag. Softtag 1 представляет собой последовательность из тринадцати

аминокислот рядом с С-концом β 'субъединицы РНК-полимеразы *E. coli*, которая может распознаваться PR-mAb NT73. Softag 2 представляет собой гептапептидный повтор, обнаруженный на С-конце эукариотической РНК-полимеразы II и распознаётся PR-mAb8WG16. Softag 3 представляет собой последовательность из восьми аминокислот, расположенную рядом с N-концом человеческого фактора транскрипции IIВ, и распознаётся с PR-mAb [3].

Для очистки интегральных мембранных белков может использоваться пептид 1D4, состоящий из 9 аминокислотных остатков С-концевого участка бычьего родопсина, и который также демонстрирует высокую аффинность к специфичным к нему моноклональным антителам [5]. Добавление данного пептида к целевым мембранным белкам не повлияло на их локализацию и функцию в клетке. Элюция белков, слитых с данным пептидом, проходит в мягких условиях с использованием свободного 1D4-пептида в качестве конкурентного агента.

1.4.2 Стрептавидин и авидин

Стрептавидин представляет собой гомотетрамерный белок массой 60 кДа, продуцируемый актинобактериями *Streptomyces avidinii*. Главной особенностью стрептавидина является его способность связывать до 4-х молекул биотина с высоким сродством (константа диссоциации составляет 10^{-15} М) [6]. Каждая субъединица стрептавидина состоит из восьми антипараллельных β -цепей, которые образуют два β -листа. Эти два β -листа, в свою очередь, образуют β -бочонок. Четыре одинаковых β -бочонка связываются посредством водородных связей и вандерваальсовых взаимодействий, образуя четвертичную структуру (рисунок 4). В каждом мономере располагается один биотин-связывающий сайт, который образуется за счёт аминокислотных остатков внутренней полости β -бочонка одного мономера и за счёт остатков триптофана соседнего мономера [6]. Биотин является водорастворимым витамином группы В и состоит из сконденсированных

тетрагидроимидазольного и тетрагидротиофенового кольца, при этом в тетрагидротиофеновом кольце один из атомов водорода замещён на остаток валериановой кислоты (рисунок 5).

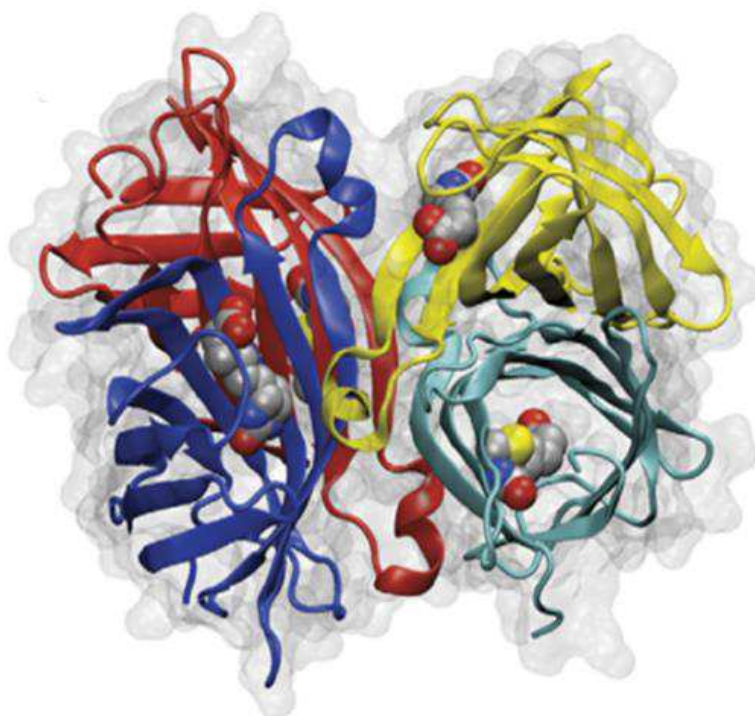


Рисунок 4. - Пространственная структура стрептавидина. Прозрачным серым цветом показана молекулярная поверхность белка; красным, синим, желтым и зеленым цветом показаны мономеры белка со связанными молекулами биотина [6]

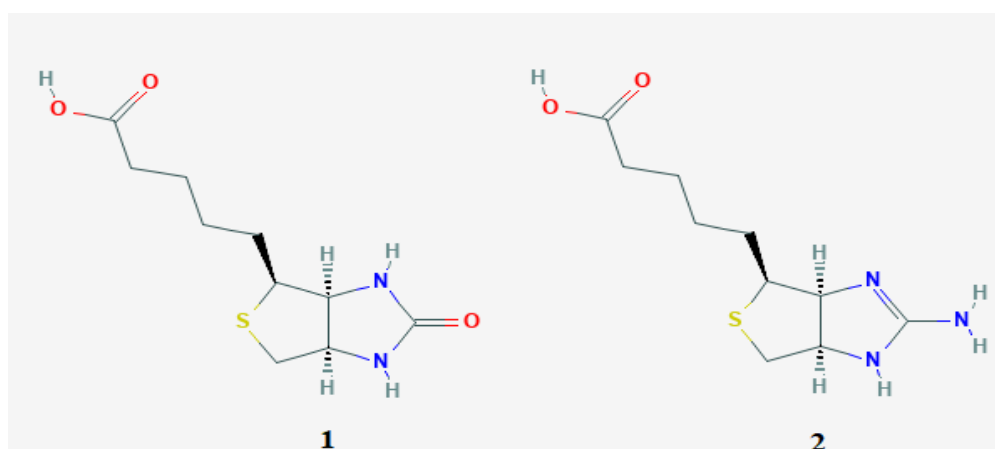


Рисунок 5. – Химическая структура биотина (1) и иминобиотина (2)

Первым известным вспомогательным фрагментом с аффинностью к стрептавидину был Strep-tag, который представляет собой пептид из 9 аминокислот и связывается с тем же карманом, что и биотин [3]. Основными преимуществами Strep-tag являются устойчивость к протеолизу *in vivo*, отсутствием влияния на экспрессию в *E. coli* и мягкими условиями элюирования, которые включают конкурентное элюирование с биотином или аналогичным соединением таким как иминобиотин [3]. Однако ограничением системы Strep-tag является то, что он может быть слит только с С-концом целевого белка. Затем был разработан пептид, получивший название Strep-tag II, который уже может быть слит как с N- так и С-концом целевого белка, и имеющий константу диссоциации $37 \cdot 10^{-6}$ М [3]. Также была разработана новая версия стрептавидина для улучшения связывающей способности по отношению к Strep-tag II, и полученная в результате случайного мутагенеза аминокислот в 44-47 положениях, расположенных в области гибкой петли рядом с сайтом связывания, и была названа Strep-Tactin [3]. Также существуют и другие вспомогательные фрагменты с аффинностью к стрептавидину, например, SBP-tag (streptavidin binding peptide - стрептавидин связывающий пептид) и Nano-tag. SBP-tag состоит из 38 аминокислот и имеет константу диссоциации $2,5 \cdot 10^{-9}$ М. Nano-tag сочетает в себе небольшой размер Strep-tag II (состоит из 15 аминокислот) и имеет константу диссоциации $4 \cdot 10^{-9}$ М [3].

Авидин – белок массой 68 кДа и так же, как стрептавидин, представляющий собой тетрамер с 4 сайтами связывания биотина с той же аффинностью. Содержится в яйцах амфибий, рептилий и птиц. Отличием от стрептавидина является то, что авидин имеет гликозилированные участки. Из-за большого содержания углеводов (углеводы составляют до 10% от массы белка) авидин может неспецифически связываться с различными материалами [7]. Потому была разработана NeutrAvidin, представляющий собой дегликозилированную версию авидина массой 60 кДа с не изменившейся аффинностью к биотину [7]. На поверхности с иммобилизованным авидином

или нейтравидином целевые белки могут быть очищены при помощи вспомогательного фрагмента Avid-tag, который состоит из 6 аминокислот и представляет собой циклический пептид с константой диссоциации $12 \cdot 10^{-6}$ М для связывания с авидином [3].

1.4.3 Кальмодулин

Кальмодулин представляет собой небольшой кальций-связывающий белок массой 17 кДа, модулирующий активность различных белков. Он состоит из двух глобулярных доменов, в каждом из которых находится по 2 кальций-связывающих сайта. Кальмодулин связывает ионы кальция с высоким сродством (константа диссоциации в микромолярном диапазоне), при этом при связывании происходят конформационные изменения в белке, позволяющие ему связываться с белками, например с киназами или фосфатазами, влияя на их активность [8]. Имобилизованный на носителе кальмодулин используется для очистки белков, слитых с кальмодулин-связывающим пептидом (calmodulin binding peptide, СВР). СВР представляет собой последовательность из 26 аминокислот, полученную из С-концевого участка киназы легкой цепи миозина скелетных мышц кролика и имеет константу диссоциации 10^{-9} М для связывания с кальмодулином [3]. Связывание кальмодулина и СВР зависимо от кальция, потому элюирование целевого белка можно проводить в мягких условиях с помощью соединений, хелатирующих кальций, таких как ЭДТА и ЭГТА [3].

1.4.4 S-белок

S-пептид и S-белок были получены в результате расщепления протеазой субтилизин рибонуклеазы А – фермента, катализирующего расщепление РНК. S-пептид образуется из остатков 1-20 рибонуклеазы А и S – белок из остатков 21 – 124 [9]. S-белок иммобилизуется на носителе, поверхность которого активирована, например, цианоген бромидом, или на носителе может быть иммобилизована целая рибонуклеаза А, которая затем обрабатывается

субтилизином и промывается от образовавшего S-пептида. S-пептид связывает S-белок с высокой аффинностью (константа диссоциации в наномолярном диапазоне) с формированием функциональной рибонуклеазы S, и по этой причине перед элюцией белок, слитый с S-пептидом, должен обрабатываться протеазой [9].

1.4.5 Глутатион

Глутатион S-трансфераза – мономерный белок массой 26 кДа, выделенный из *Schistosoma japonicum*. Данный белок катализирует реакцию образования конъюгатов между связанным с ним глутатионом и электрофильной частью ксенобиотика или эндобиотического токсического соединения через сульфгидрильную группу глутатиона [10]. Такие конъюгаты более растворимы в воде и потому легче выводятся из клетки. Иммуобилизация глутатиона, выступающего лигандом для очистки белков, слитых с GST, так же проходит через центральную сульфгидрильную группу [10]. Условия элюирования белка мягкие, в качестве конкурентного агента используется восстановленный глутатион. В ходе всего процесса должны быть обеспечены восстановительные условия так как иначе слитый белок может подвергаться агрегации вследствие окисления четырех остатков цистеина, находящихся на поверхности GST [3].

1.4.6 Полисахариды

Биологические лиганды на основе полисахаридов включают: сшитую амилозу, целлюлозу, хитин. Мальтоза-связывающий белок - периплазматический белок массой 42 кДа, участвующий в транспорте мальтозы и мальтодекстринов через бактериальную цитоплазматическую мембрану. Белки, слитые с МВР на N-конце, могут быть очищены в одну стадию с использованием амилозы с константой диссоциации 10^{-6} М [3]. Элюирование белка проходит в мягких условиях с использованием мальтозы в качестве конкурентного агента. Домены, связывающие целлюлозу, представляют собой

некаталитические домены различных карбогидраз, которые различаются размером (4-20 кДа) и аффинностью к субстрату. Эти домены могут сливаться с N- или C-концом белка и связываться с целлюлозой в широком диапазоне pH (pH = 3,5-9,5) [11]. Взаимодействие целлюлозо-связывающего домена и целлюлозы очень сильное, потому требуется использование таких реагентов, как например мочевины или гидрохлорид гуанидина, для элюирования белка, что может привести к его денатурации. Хитин-связывающий домен, выделенный из *Bacillus circus*, состоит из 51 аминокислотного остатка и может быть слит как с N- так и C-концом целевого белка. Данный вспомогательный фрагмент обычно сочетается с интеинами – участками белка способными к автосплайсингу [11].

1.4.7 Имобилизованные ионы металлов и His-tag

Металл-аффинная хроматография белков, слитых с полигистидином (зачастую 6 остатков гистидина), основана на взаимодействии остатков гистидина (имидазольные кольца выступают донорами электронов) с ионами переходных металлов (зачастую используются Ni^{2+} и Co^{2+}), хелатированными лигандами, например, такими как иминодиуксусная кислота (iminodiacetic acid, IDA) или нитрилотриуксусная кислота (nitrilotriacetic acid, NTA), которые, в свою очередь, закреплены на носителе (рисунок 7). IDA удерживает двухвалентные ионы тремя валентностями и две валентности иона металла доступны для взаимодействия с кольцами имидазола остатков гистидина. NTA же удерживает двухвалентные ионы четырьмя валентностями и две валентности иона металла также доступны. NTA более широко используется, чем IDA, так как сильнее связывает ион металла, что снижает вероятность выщелачивания ионов металлов в ходе хроматографии и загрязнения уже очищенного белка. Элюирование белка может проходить в градиенте pH, что нежелательно так как может привести к денатурации белка, или при использовании невысоких концентраций имидазола в качестве конкурентного агента. Недостатком данного метода очистки является то, что ионы металлов

могут связываться с естественными гистидиновыми участками сторонних белков или с другими аминокислотами такими, например, как глутаминовая и аспарагиновая кислоты, тирозин, цистеин, аргинин и метионин, что приводит к низкой селективности, а также имидазольные группы гистидина могут препятствовать правильной укладке целевого белка [12].

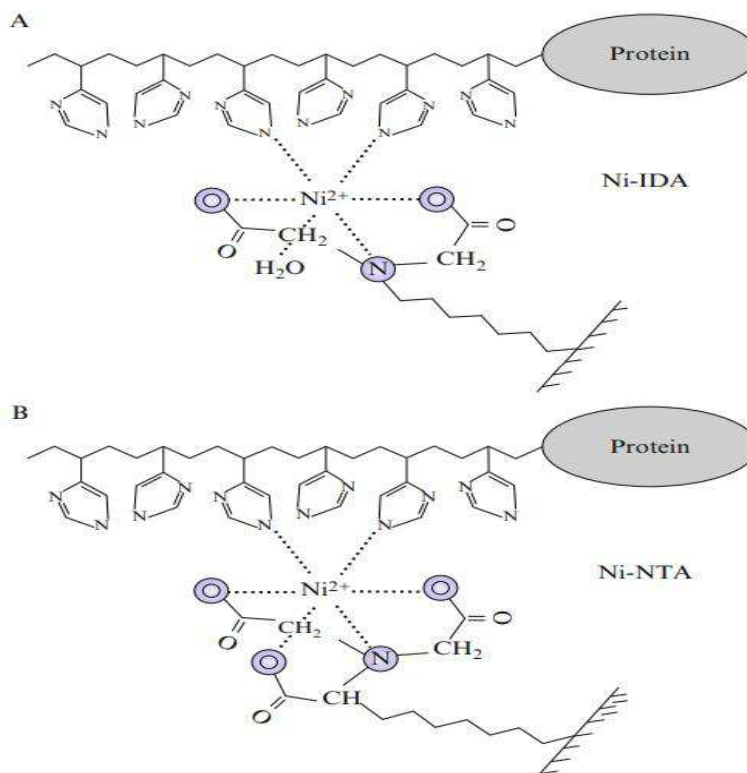


Рисунок 7. - Схема взаимодействия между остатками гистидина в пептиде His-tag и иммобилизованным координационными связями ионом Ni^{2+} . А – в качестве хелатирующего соединения выступает иминодиуксусная кислота (IDA); В – в качестве хелатирующего соединения выступает нитрилотриуксусная кислота (NTA) [12].

1.4.8 Halo-tag

В основном в аффинной хроматографии используется обратимое взаимодействие вспомогательного фрагмента, слитого с белком, и лиганда. Но была разработана пара вспомогательный фрагмент-синтетический лиганд с

ковалентной связью между ними. Это система состоит из Halo-tag и лиганда, представляющего собой синтетический хлоралкановый линкер, связанный с функциональной группой носителя. Halo-tag был разработан на основе бактериальной галогеналкандегалогеназы, выделенной из *Rhodococcus* spp., и представляет собой белок массой 33 кДа [13]. У данных бактерий галогеналкандегалогеназа катализирует реакции нуклеофильного замещения, удаляя галогениды. Аминокислотный остаток Asp106 отвечает за формирование фермент-субстратного комплекса, а остаток His272 отвечает за гидролиз промежуточного соединения, замена же His272Phe приводит к образованию ковалентной связи между ферментом и субстратом [13]. Между вспомогательным фрагментом и целевым белком обычно добавляют сайт расщепления TEV (tobacco etch virus, вирус травления табака) протеазы [13]. Недостатком данной системы для очистки белков является то, что образование ковалентных связей между вспомогательным фрагментом и лигандом затрудняет повторное использование сорбента.

1.5 Удаление вспомогательных фрагментов

Удаление вспомогательных фрагментов часто необходимо, когда их присутствие влияет на структуру и функцию целевого белка. Для этого между вспомогательным фрагментом и целевым белком включается сайт расщепления специфическими протеазами. В основном используются следующие протеазы: энтерокиназа, фактор Ха, протеаза SUMO (small ubiquitin like modifier), протеаза TEV, тромбин [13]. Энтерокиназа – это протеаза, которая распознаёт последовательность DDDDKX и расщепляет по С-концу лизина с разной эффективностью, которая зависит от аминокислоты, следующей за лизином (X). Например, эффективность расщепления для пролина в положении X составляет 61%, а для аланина уже 88% [13]. Энтерокиназа в основном используется для отделения пептида Flag (DYKDDDK). Фактор Ха представляет собой протеазу, которая распознаёт I(E/D) GRX, где X может быть любой аминокислотой, кроме аргинина или пролина [13]. Расщепление

идёт по С-концу аргинина. Протеаза SUMO распознаёт третичную структуру небольших белков SUMO, ковалентно связанных с целевым белком, и расщепление идёт по N-концу слитого белка независимо от последовательности (исключение - наличие пролина) [13]. Протеаза TEV распознаёт последовательность ENLYFQS и расщепление происходит между глутамином и серином. TEV-протеаза высоко специфична, а также эффективно расщепляет при низких температурах. Тромбин – протеаза, которая распознаёт последовательность LVPRGS и расщепление происходит между аргинином и глицином. Расщепление тромбином так же высоко специфично [13].

1.6 Биоспецифичные носители для биотехнологии

Магнитные частицы обладают высоким отношением поверхности к объёму и обилием гидроксильных групп на своей поверхности, что придает ей гидрофильный характер, также эти гидроксильные группы могут модифицироваться для ковалентного присоединения различных молекул или использоваться в немодифицированном виде, например для нековалентной адсорбции. Основным преимуществом магнитных частиц по сравнению с другими носителями является возможность простого разделения различных смесей приложением внешнего магнитного поля.

1.6.1 Частицы как носители для анализа

Тестирование на антитела представляет собой важный инструмент для диагностики многих инфекционных агентов, воздействию которых организм подвергается в данный момент или подвергался в прошлом. Тестирование на антитела против собственных белков организма, аутоантитела, важно для диагностики аутоиммунных заболеваний и прогнозирования их развития, ведь при некоторых аутоиммунных заболеваниях аутоантитела обнаруживаются ещё до начала проявления первых клинических симптомов. Для обнаружения антител и измерения их количества применяются различные методы, например иммуноферментный анализ (ИФА) вестерн-блоттинг, метод

радиоиммунопреципитации (radioimmunoprecipitation, RIP). Недостатками ИФА и вестерн-блоттинга для измерения количества антител против определенных мишеней является их ограниченная способность обнаруживать конформационные эпитопы, ограниченный динамический диапазон обнаружения и высокий фон. Метод радиоиммунопреципитации является наиболее высокочувствительным и высокоспецифичным методом анализа, однако использование радиоизотопов создаёт затруднения для широкого применения данного метода. Burbelo P.D. и коллегами был разработан метод анализа антител на основе люциферазной иммунопреципитационной системы (luciferase immunoprecipitation system, LIPS). Метод LIPS (рисунок 8) основан на использовании меченых люциферазой антигенов, продуцируемых в клетках млекопитающих. Сперва получают рекомбинантную ДНК, содержащую последовательность целевого белка – антигена, слитую с последовательностью люциферазы – светоизлучающего белка, выделенного из мягкого коралла *Renilla reniformis*. Затем клетки млекопитающих линии Cos1 трансфецируют полученной рекомбинантной ДНК, после чего те начинают продуцировать целевой меченый люциферазой антиген. Большим преимуществом является то, что для анализа можно использовать неочищенный лизат клеток. Для тестирования на антитела определенное количество меченого целевого белка инкубируют с образцом сыворотки. В ходе первого этапа инкубации антитела в сыворотке крови, если присутствуют, связываются с целевым антигеном, меченым люциферазой. Затем смесь переносят к магнитным частицам, поверхность которых покрыта белками A/G или вторичными антителами, комплекс антитело-антиген иммобилизуются на частицах, а несвязанные меченые антигены затем удаляются несколькими стадиями промывки частиц. После этого количество специфичных к целевому антигену антител определяется измерением билюминесцентного сигнала, производимого люциферазой при добавлении целентеразина.

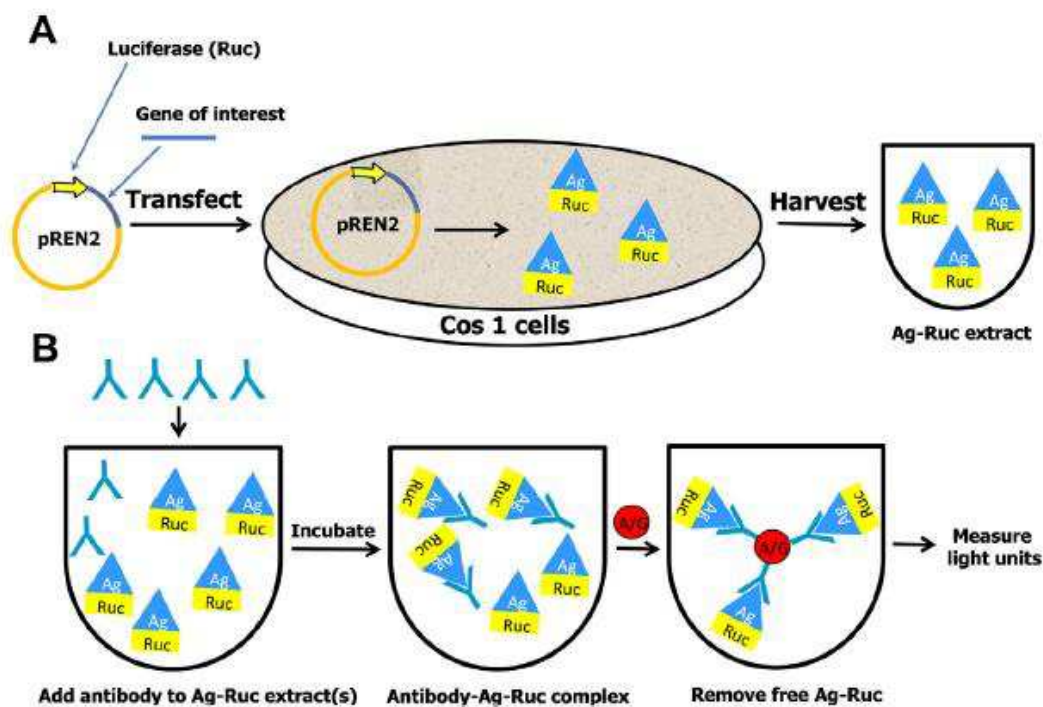


Рисунок 8. – Схема проведения анализа методом LIPS. А – последовательность ДНК интересующего антигена сливается с С-концом люциферазы *Renilla reniformis* (Ruc), затем рекомбинантные плазмиды используются для трансфекции клеток Cos1, затем через 48 часов получают клеточный лизат и используют его без последующей очистки; В – алиquotы смеси инкубируют с образцами сыворотки, затем комплексы антитело-антиген захватываются белками A/G, покрывающими частицы, а несвязанный меченый антиген смывается, затем определяется количество специфичных к антигену антител при добавлении субстрата люциферазы и измерению полученного сигнала [14].

При сахарном диабете 1 типа (СД1) - аутоиммунном заболевании, связанном с разрушением β -клеток поджелудочной железы, продуцирующих инсулин, обнаруживаются некоторые аутоантитела, например антитела к инсулину, глутаматдекарбоксилазе-65 (glutamic acid decarboxylase-65, GAD-65), инсулинома-ассоциированному белку-2 (insulinoma-associated protein-2, IA2), инсулинома-ассоциированному белку-2 β и транспортёру цинка 8 [14]. Сравнительные исследования показали, что LIPS и RIP обладают схожей чувствительностью и специфичностью против некоторых основных

аутоантител, обнаруживаемых при СД1. Например, чувствительность и специфичность анализа для обнаружения анти-IA2-аутоантител у пациентов с С1Д методом LIPS составили 85% и 100%, что хорошо коррелирует со значениями, полученными при помощи RIP [14].

Также было показано, что пациенты с С1Д могут иметь коморбидные аутоиммунные заболевания, которые могут обнаружены по наличию аутоантител, ассоциированных с этими заболеваниями. В одном из исследований аутоантитела к 9 мишеням были измерены в пациентах с С1Д. Пациенты с С1Д показали не только высокое содержание аутоантител ассоциированных с С1Д, но также примерно 50% пациентов с С1Д имели аутоантитела к мишеням других органов, например к пероксидазе щитовидной железы, ассоциированной с тиреодитом Хашимото, трансклутаминазе-2, ассоциированной с целиакией, аденозинтрифосфатазе желудка, ассоциированной с аутоиммунным гастритом [14]. Также у пациентов с С1Д обнаруживается высокое содержание аутоантител к GAD-65 [14]. Аутоантитела к GAD-65 также могут быть обнаружены при различных неврологических заболеваниях, включая атаксию и синдром мышечной скованности. В одном из исследований чувствительность и специфичность анализа на аутоантитела к GAD-65 при помощи LIPS составили 100% и 100% [14]. Также метод LIPS применяли для диагностики и других аутоиммунных заболеваний, например, синдрома Шегрена и системной красной волчанки [14].

Метод LIPS также использовался для измерения антител к белкам различных инфекционных агентов, например полного протеома вируса иммунодефицита человека, части протеомов Т-лимфотропного вируса, вируса гепатита С, вируса Эпштейна-Барра. Также данный метод полезен для скрининга и выявления новых антигенных белков инфекционных агентов. Например, при скрининге 16 антигенов из *Wuchereria bancrofti* выяснилось, что белок Wb123 может выступать в качестве высокоинформативного антигена для

диагностики филяриозов [14]. Аналогичным образом при скрининге 20 белков вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши, у 75% пациентов с данным заболеванием были обнаружены антитела к белку v-циклину [14]. Также метод LIPS показал более высокую чувствительность в сравнении с ИФА для диагностики инфекций, вызванных *Strongyloides stercoralis*, *Onchocerciasis*, *Loa loa* [14].

Аптамеры представляют собой одноцепочечные ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, состоящие из 20-80 пар оснований и имеющие уникальную пространственную структуру, которая формируется за счет образования локальных дуплексов, стекинг-взаимодействий, водородных связей и др. Традиционная процедура отбора из случайно отобранной библиотеки позволяет получить аптамеры с высоким сродством к выбранной мишени. Преимуществом аптамеров в сравнении с антителами является то, что они синтезируются химически, а также могут быть отобраны для любой мишени, в том числе и для мишеней с низким молекулярным весом, токсичных или неиммуногенных. Мишени для выбора аптамера могут быть и сложными биологическими системами, например культуральными клетками или тканями.

Башмаковой Е.Е. и коллегами был разработан твердофазный анализ «сэндвич» типа (рисунок 9) для обнаружения элементов рака легких в плазме крови с использованием ДНК-аптамеров LC-17 и LC-18, обладающих высоким сродством к послеоперационной легочной ткани ($K_d = 14$ нМ и 38 нМ, соответственно), в качестве биоспецифических элементов, и Ca^{2+} -регулируемого фотопротейна обелина, представляющего собой нековалентный комплекс одноцепочечного полипептида массой 22,2 кДа и 2-гидропероксицелентеразина, в качестве высокочувствительного биолюминесцентного репортера [15]. Используемые аптамеры устроены следующим образом: они включают константные участки на 3'- и 5'-концах (20 пар оснований каждый), а центральная часть отличается между аптамерами

и образует пространственные структуры ответственные за связывание с целью. Олигонуклеотид комплементарный 5'-концу каждого аптамера был синтезирован в двух вариантах: первый содержал биотин на 5' конце (олиг1), второй – аминогруппу, присоединенную через гексаметиленовый спейсер (олиг2) [15]. В качестве твердой подложки, на которой формируется аналитический комплекс авторы использовали магнитные частицы, поверхность которых активирована стрептавидином. Образцы плазмы крови инкубировали со смесью аптамера LC-17, олиг1 и магнитными микрочастицами, покрытыми стрептавидином. Олиг1 связывается с частицами за счет взаимодействия биотин-стрептавидин, далее аптамер LC-17 за счет комплементарности 5'-конца связывается с олиг1, а другим своим участком связывается с мишенью (клеточным элементом рака легких). Затем частицы промывали для удаления не связавшихся компонентов. После к частицам добавляли аптамер LC-18, смесь инкубировали, после чего частицы промывали. Аптамер LC-18 формирует структуру «сэндвич» типа с мишенью. Для обнаружения этого комплекса к частицам добавляли раствор конъюгата обелина с олигонуклеотидом 2 (олиг2), комплементарного 5'-концу аптамера LC-18. Олиг2 связывается с LC-18 за счёт комплементарности 3'-конца. Затем суспензию частиц переносили в лунки непрозрачного микропланшета и измеряли биолюминесцентный сигнал после впрыскивания CaCl_2 . Поскольку обелин непосредственно участвует в реакции зависимость силы сигнала от концентрации белка линейна.

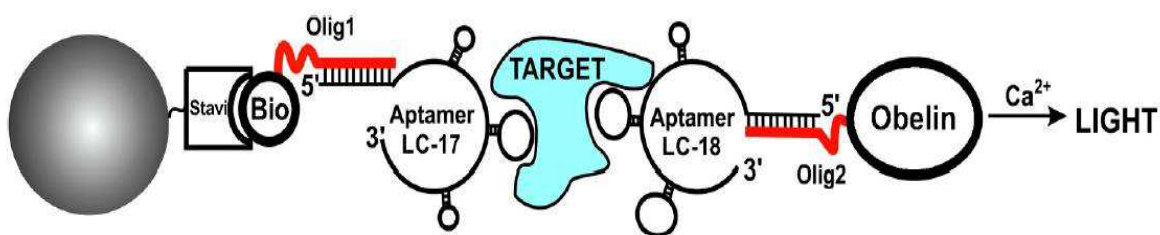


Рисунок 9. – Схема разработанного твердофазного билюминесцентного анализа. Stavi – стрептавидин, Bio – биотин, target – мишень (клеточный элемент рака легких) [15].

При помощи разработанного метода было проанализировано 98 образцов плазмы крови (47 пациентов с раком легких + 3 пациента с метастазами в легких от других видов рака, 48 – контрольная группа). Все три случая метастазов в легкие других видов рака дали положительный результат. В исследовании было 10 случаев рака на первой стадии, 12 – на второй, 18 – на третьей, 7 – на четвертой. Было выявлено 8 из 10 случаев рака на первой стадии, 11 из 12 случаев на второй стадии, 17 из 18 на третьей стадии и 7 из 7 на четвертой стадии [15]. Чувствительность и специфичность анализа составили 91,5% и 75% соответственно [15].

1.6.2 Частицы как носители для отбора специфичных ДНК аптамеров

Для *in vitro*-селекции аптамеров, аффинных к заданной мишени, широко применяется подход, включающий в себя иммобилизацию мишени на поверхности носителя и последовательные процедуры инкубирования системы с анализируемой смесью молекул, промывок и элюции связавшихся с мишенью аптамеров. Красицкая В.В. и коллеги предложили проводить отбор аптамеров к фотопротеину обелину следующим образом. Обелин слитый с полигиститидиновым фрагментом иммобилизовали на магнитных частицах, покрытых Ni-сефарозой. Все пиримидинованные нуклеотиды в составе РНК-библиотеки, которую использовали для отбора аптамеров, были заменены на их 2'-F – аналоги для повышения устойчивости к действию нуклеаз, так как в

дальнейшем планируется использовать полученные аптамеры в биологических образцах [16]. Чтобы избежать отбора аптамеров связывающихся не с обелином, а носителем, перед инкубацией с частицами с иммобилизованным обелином, в каждом цикле отбора РНК-библиотеку инкубировали с «пустыми» частицами. Последовательности РНК, связавшиеся с обелином, удаляли с поверхности частиц инкубацией с раствором имидазола и денатурировали РНК-белковые комплексы. Затем осуществляли амплификацию обогащенной РНК-библиотеки методом ОТ-ПЦР (обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция). Подобным образом проводили и следующие раунды. За ходом обогащения библиотеки следили с помощью твердофазного биолюминесцентного анализа исходной библиотеки и обогащенных библиотек, полученных после 7 и 10-го раундов отбора (рисунок 10). На активированной стрептавидином поверхности планшета иммобилизовали биотинилированный 24-звенный олигодезоксирибонуклеотид-адаптер комплементарный 5' константному участку РНК-библиотек, далее вносили раствор исходной или обогащенной библиотеки и после инкубирования и промывки – раствор обелина дикого типа [16]. Количество связавшегося обелина оценивали по его биолюминесцентному сигналу при впрыскивании раствора CaCl_2 . Увеличение биолюминесцентного сигнала обелина после 7-го и 10-го раундов селекции свидетельствует о накоплении в составе РНК-библиотеки молекул, обладающих сродством к обелину [16].

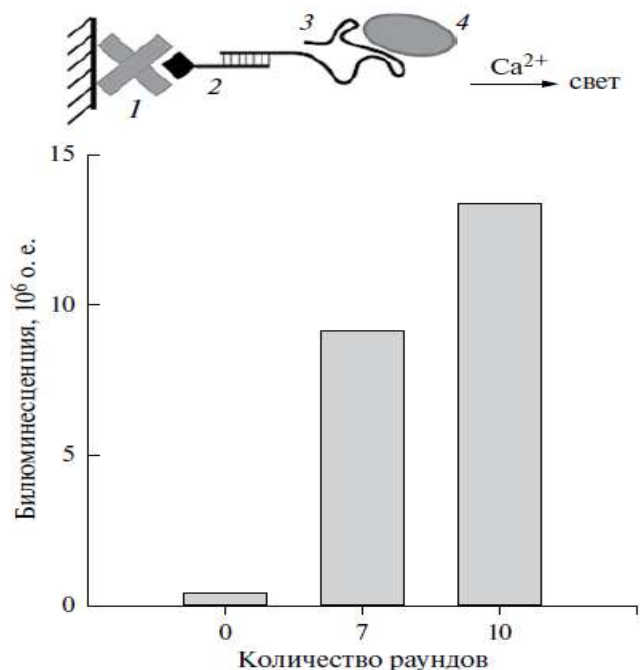


Рисунок 10. - Схема анализа исходной и обогащенных РНК-библиотек (вверху) и билюминесцентный сигнал связавшегося обелина (внизу). 1 – стрептавидин, иммобилизованный на поверхности лунки; 2 – биотинилированный олигонуклеотид-адаптер комплементарный константной части аптамера; 3 – аптамер; 4 – обелин; о.е. – относительные световые единицы [16].

Гликированный гемоглобин человека HbA1c и его нормальная негликированная форма являются привлекательными мишенями для отбора аптамеров для диагностических систем. HbA1c – продукт неферментативной гликозилирования N-концевых остатков валина β -цепей гемоглобина человека. Он используется в качестве показателя гликемии за последние 2-3 месяца для контроля лечения диабета.

Давыдовой А.С. и коллегами были разработаны 2'-F-модифицированные РНК-аптамеры специфичные к гликированному гемоглобину [17]. Для отбора аптамеров были использованы гликированные и негликированные формы гемоглобина, иммобилизованные через аминокислотные группы на тозил-активированных магнитных частицах [17]. Для отбора аптамеров к

общему гемоглобину (содержащему в основном негликированные формы) исходную 2'-F-РНК библиотеку инкубировали с частицами с иммобилизованным общим гемоглобином. Несвязавшиеся РНК удаляли, а связанные РНК элюировали с частиц и амплифицировали ОТ-ПЦР. Начиная со второго раунда, добавляли стадию отбора, в которой инкубировали РНК с магнитными частицами, поверхность которых блокировали Tween 20, для исключения связывания с поверхностью частиц последовательностей РНК-библиотеки [17]. Для того чтобы избавиться от неспецифически связавшихся аптамеров, использовали частицы с иммобилизованным человеческим сывороточным альбумином в раундах 7-10. Давление отбора постепенно увеличивали за счет уменьшения количества связанного с магнитными частицами белка, уменьшения времени инкубации и увеличения числа промывок. Для отбора аптамеров к гликированному гемоглобину проводили аналогичную процедуру только уже с использованием частиц со связанным HbA1c [17].

Для исследования аффинности связывания отдельных аптамеров был использован биолюминесцентный микроанализ «сэндвич» типа (рисунок 11). 3'-биотинилированные аптамеры иммобилизовали на активированной стрептавидином поверхности лунок планшета и титровали общим или гликированным гемоглобином [17]. Аптамер-белковые комплексы были выявлены с использованием конъюгата обелина с антителом к гемоглобину. Биолюминесценция запускалась впрыскиванием раствора CaCl_2 . Было показано, что аптамеры, отобранные против общего гемоглобина

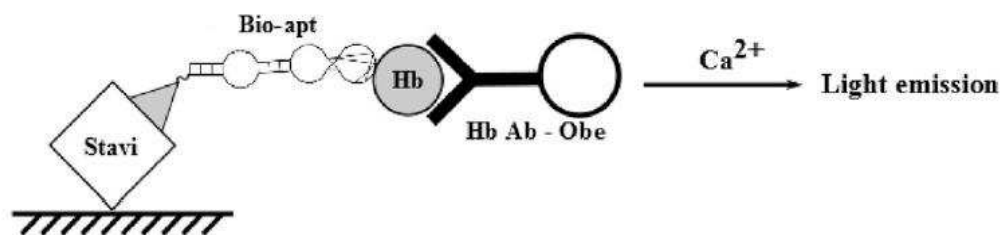


Рисунок 11. – Схема разработанного биOLUMИнесцентного твердофазного. Stavi – стрептавидин; Bio – биотин; Hb – гемоглобин; Hb Ab – антитело против гемоглобина; Obe – обелин [17].

демонстрировали одинаковую аффинность как к общему, так и к гликированному гемоглобину, в то время как аптамеры, отобранные против гликированного гемоглобина, распознавали только гликированный гемоглобин [17]. Также была показана возможность определения двух видов гемоглобина в одной пробе.

Проведенный анализ научной литературы показывает, что магнитные частицы, активированные соответствующими лигандами и специфичными белками широко и успешно применяются в современных биотехнологических исследованиях как эффективные сорбенты для аффинной хроматографии целевых рекомбинантных белков, а также в качестве удобных носителей для проведения твердофазного молекулярного анализа, а также селекса и исследования ДНК- и РНК-аптамеров.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Вещества и реактивы

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

| Название | Состав |
|--|---|
| Буфер TE | 20 mM Трис-НСl pH 7,0; 5 mM ЭДТА |
| SOC-среда | 20 г/л бакто-триптона; 5 г/л дрожжевого экстракта; 0,5 г/л NaCl; 2.5 mM KCl pH 7,0; 20 mM MgSO ₄ ; 20 mM глюкозы |
| LB-среда (для культивирования) | 10 г/л бакто-триптона; 5 г/л дрожжевого экстракта; 7,5 г/л NaCl pH 7.0 |
| LB-агар (для посева) | 1,5% агара в LB-среде |
| Буфер А (для ресуспендирования клеток) | 50 mM Трис-НСl pH 8,0; 1 mM ЭДТА |
| Буфер Б (для ионообменной хроматографии) | 20 mM Трис-НСl pH 8,0 |
| Буфер Г (для ионообменной хроматографии) | 20 mM Трис-НСl pH 8,0; 1 M NaCl |
| Раствор АА (для электрофореза) | 300 г/л акриламида; 8 г/л бис-акриламида; 100 мл |
| Буфер В (для электрофореза) | 1,5 M Трис-НСl pH 8,8; 9 г на 50 мл |
| Буфер С (для электрофореза) | 0,5 M Трис-НСl pH 6,8; 3 г на 50 мл |
| Буфер D (для электрофореза) | 3 г/л Трис; 14 г/л глицина; 1 г/л SDS; 1 л |
| Буфер 1 (для аффинной хроматографии) | 50 mM Na ₂ CO ₃ pH 11,0; 0,5 M NaCl |
| Буфер 2 (для аффинной хроматографии) | 0,1 M Na ₂ HP0 ₄ pH 7,0; 1 M NaCl |
| Буфер 3 (для аффинной хроматографии) | 50 mM CH ₃ COOH |

Окончание таблицы 2

| Название | Состав |
|--------------------------------------|---|
| Буфер 4 (для аффинной хроматографии) | 10 мМ Трис-НСl pH 7,5 |
| Буфер PBS | 0,1 М фосфатный буфер pH 7,0; 0,15 М NaCl |
| Промывочный буфер | PBS; 0,1% Tween; 5 мМ ЭДТА |

В работе были использованы следующие реактивы: бакто-триптон (Panreac, Испания), дрожжевой экстракт (Медиген, Россия), агар бактериологический (ДИА-М, Россия), хлорид натрия (Panreac, Испания), сульфат магния (Sigma-Aldrich, США), глюкоза (Sigma-Aldrich, США), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис, Sigma-Aldrich, США), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, Sigma-Aldrich, США), карбонат натрия (Sigma-Aldrich, США), изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ, ИА-М, Россия), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC, Sigma-Aldrich, США), N-гидроксисукцинимид (NHS, Sigma-Aldrich, США), диметилсульфоксид (ДМСО, Panreac, Испания), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогесан-1-карбоновой кислоты (SMCC, ThermoScientific, США), 2-иминотиолан (MP Biomedicals, США), диметил суберимидат (DMS, Sigma-Aldrich, США), бычий сывороточный альбумин (БСА, Sigma-Aldrich, США), 4-гидроксиазобензол-2-карбоновая кислота (НАВА, Pierce, США).

Для электрофореза белковых растворов использовали акриламид, бисакриламид (Медиген, Россия), тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД, фирма Helicon, Россия), персульфат аммония (ПСА), додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS, фирма Helicon, Россия), 2-меркаптоэтанол, стандартные смеси белков для электрофореза (Bio-Rad, США) и (Abscam, Великобритания).

Ca²⁺-регулируемый фотопротеин обелин D12C, а также конъюгат обелина с антителами к с-БСЖК, были получены сотрудниками лаборатории биоломинесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН.

В работе использовали магнитные частицы Dynabeads M-270 Carboxylic Acid (Invitrogen, США).

Аминированные магнитные частицы (дробленый препарат, средний размер микрочастиц 36 мкм) были любезно предоставлены д.х.н. Верещагиной Т.А. (лаборатория каталитических превращений малых молекул ИХХТ СО РАН).

Чистоту белковых препаратов оценивали с помощью электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% SDS по методу Лэммли.

Обессоливание белков проводили на колонке HiTrap Desalting Columns на хроматографической системе АКТА purifier (GE Healthcare, Великобритания).

2.2 Выделение и очистка рекомбинантного стрептавидина

Штамм-продуцент *E. coli*, экспрессирующий стрептавидин был получен старшим научным сотрудником лаборатории биоломинесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН Башмаковой Е.Е. [18]. Биомассу 1 г рекомбинантных клеток растворили в 5 мл буфера 1 (таблица 2), далее разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора 10 раз по 20 с на льду, затем центрифугировали (11000g, 30 мин, 4 °C). Супернатант наносили на колонку, содержащую 2-иминобиотинагарозу (Pierce, США), уравновешенную буфером 1, промывали пятикратным объемом того же буфера, а затем четырехкратным объемом буфера 2 (таблица 2). Элюцию стрептавидина проводили раствором 50 мМ CH₃COOH pH 4,0, элюат немедленно нейтрализовали добавлением 1 М Трис-HCl pH 7,5. Фракции, содержащие стрептавидин, объединяли.

2.3 Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК, несущей ген кБСЖК

Экспрессионный вектор pEThH-FABP был предоставлен к.х.н. Григоренко В. Г. (МГУ имени М. В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии). К 20 мкл суспензии компетентных клеток штамма *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIPL) добавляли 1 мкл раствора плазмидной ДНК (pEThH-FABP) в TE и инкубировали во льду в течение 30 мин. Затем проводили «тепловой шок»: клетки нагревали до 42 °С на водяной бане WB-4MS (Biosan, Латвия) в течение 25 с, затем снова переносили в лёд на 2 мин. Далее в пробирку добавляли 200 мкл SOC-среды (таблица 2) и инкубировали 1 час при 37°С; высевали на чашку с LB-агар (таблица 2), содержащий 200 мкг/мл ампициллина, 50 мкл культуры и инкубировали в термостате при 37°С сутки.

2.4 Культивирование рекомбинантных клеток *E. coli*

Культивирование рекомбинантных клеток штамма RIPL в LB-среде, содержащей 200 мкг/мл ампициллина проводили при 37°С до достижения оптической плотности $OD_{590nm} = 0,6$. Индукцию синтеза рекомбинантного белка проводили добавлением ИПТГ (0,4 мМ). Далее культивировали с активным перемешиванием ещё в течение 3-х часов при 30°С. Клетки осаждали центрифугированием (3600 g, 15 мин, 4°С) и хранили биомассу в замороженном виде.

2.5 Выделение и очистка рекомбинантного кБСЖК

Биомассу клеток 1 г ресуспендировали в 5 мл буфера А (таблица 2); далее разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т (АКАДЕМПРИБОР, Украина) 10 раз по 20 сек на льду; центрифугировали полученную смесь (11000g, 15 мин, 4°С). Осадок отбрасывали, к лизату добавляли стрептомицин (1,5%), затем центрифугировали (11000g, 15 мин, 4°С), осадок отбрасывали. Далее проводили диализ супернатанта против

буфера Б (таблица 2). Хроматографическую очистку кБСЖК проводили на колонке HiTrap Q HP 5 ml (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером Б (таблица 2) с помощью хроматографической системы АКТА purifier (GE Healthcare, Великобритания). Белки элюировали градиентом концентрации NaCl (0-0,1 М) при скорости 1 мл/мин. Собранную фракцию кБСЖК хранили при -20°C.

2.6 Определение концентрации белков

Концентрацию кБСЖК определяли по методу Лоури с применением набора DC Protein Assay (Bio-Rad, США), по протоколу производителя на спектрофотометре SmartSpec 3000 (Bio-Rad, США). В качестве калибровочного белка использовали бычий сывороточный альбумин.

Концентрацию стрептавидина определяли колориметрически по методу, описанному в работе Green [19]. К 1 мл раствора стрептавидина (в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,0) добавляли 25 мкл 50 мМ раствора 4-гидроксиазобензол-2-карбоновой кислоты (НАВА) (в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,0) и измеряли оптическую плотность OD₁₅₀₀. Затем к раствору стрептавидина с НАВА добавляли 25 мкл 2 мМ раствора биотина в этом же буфере и измеряли оптическую плотность OD₂₅₀₀. Концентрацию стрептавидина (мг/мл) рассчитывали по формуле: $0,49 * (OD_{1500} - OD_{2500})$.

Концентрацию Ca²⁺-регулируемого фотопротейна обелина D12C измеряли спектрофотометрически используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{460\text{нм}} = 1815 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ [20].

2.7 Ковалентное присоединение стрептавидина и кБСЖК к магнитным частицам

Ковалентное присоединение стрептавидина к магнитным частицам Dynabeads M-270 Carboxylic Acid проводили в соответствии с протоколом производителя, а также с некоторыми модификациями. Частицы промыли 5 раз 50 мМ Bisine pH 8,5. Затем добавили 50 мкл EDC концентрацией 50 мкг/мкл и

50 мкл NHS концентрацией 50 мкг/мкл. Частицы инкубировали 1 час при комнатной температуре с перемешиванием и промывали как описано выше. Затем к частицам добавляли раствор стрептавидина (0,5 мг в 50 mM Bisine pH 8,5) и инкубировали в течение ночи при 4°C. После промывки, частицы использовали для определения количества связанного стрептавидина, как описано в пункте 2.8. Для сравнения использовали частицы, инкубированные со стрептавидином без предварительной модификации частиц с помощью EDC и NHS.

Ковалентное присоединение стрептавидина к аминированным магнитным микрочастицам проводили тремя способами:

1. Частицы промыли 5 раз 50 mM Bisine pH 8,5. Затем добавили 3 мг SMCC в ДМСО к частицам в буфере и инкубировали 1 час при комнатной температуре с перемешиванием. После этого частицы промыли 5 раз 50 mM фосфатным буфером pH 7,0. К раствору стрептавидина (2 мг в 50 mM Bisine pH 8,5) добавляли 40-кратный молярный избыток 2-иминотиолана и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. Избыток реагентов отделяли гель-фильтрацией на колонке HiTrap Desalting, уравновешенной 50 mM фосфатным буфером pH 7,0. SMCC-активированные частицы инкубировали с тионилированным стрептавидином в течение ночи при 4°C, затем частицы промывали промывочным буфером (таблица 2) и использовали для определения количества связанного стрептавидина, как описано в пункте 2.8.

2. Частицы промыли 5 раз 50 mM Bisine pH 8,5. Затем добавили 4,7 мг DMS в ДМСО к частицам в буфере и стрептавидин (1 мг в 50 mM Bisine pH 8,5) и инкубировали 2 часа при комнатной температуре с перемешиванием. После этого промыли частицы 5 раз промывочным буфером (таблица 2) и использовали для определения количества связанного стрептавидина, как описано в пункте 2.8.

3. Частицы модифицировали как описано во втором способе, за исключением концентрации реагентов (10 мг DMS в ДМСО, 0,5 мг стрептавидина в 50 mM Bisine pH 8,5) и времени инкубации (1 час при комнатной температуре с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C).

Ковалентное присоединение кБСЖК (0,45 мг в 50 mM Bisine pH 8,5) к аминированным магнитным микрочастицам проводили как описано в способе 3.

2.8 Определение количества ковалентно присоединенного к магнитным частицам стрептавидина

К 1 мл частиц, содержащих на поверхности стрептавидин в 0,1 М К-На фосфатном буфере, pH 7,0 добавляли 25 мкл 10 mM раствора НАВА, инкубировали при активном встряхивании несколько минут, частицы отделяли и измеряли оптическую плотность буфера при $\lambda = 500$ нм (OD1). Затем, этот раствор снова вносили к частицам и добавляли 25 мкл 2 mM раствора биотина, инкубировали, раствор отделяли и определяли его оптическую плотность при той же длине волны (OD2). Подсчет концентрации стрептавидина проводили по формуле: $0,49 * (OD_{2500} - OD_{1500})$.

2.9 Иммуобилизация биотинилированного олигонуклеотида на стрептавидин-активированных магнитных частицах

5 нмоль биотинилированного олигонуклеотида (5'-Bio-CGTGGTTACAGTCAGAGGAG-3', синтезирован фирмой Биосан, Россия) в TE буфере (таблица 2) инкубировали со стрептавидин-активированными (полученные способом №3) и с «пустыми» магнитными микрочастицами в течение часа при комнатной температуре. Присоединение олигонуклеотида к частицам оценивали по изменению его количества до и после реакции со стрептавидин-активированными частицами. Концентрацию олигонуклеотида измеряли при $\lambda = 260$ нм на спектрофотометре NanoDrop Lite (ThermoScientific,

США). Для расчетов использовали значение коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{260\text{нм}} = 204147 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$.

2.10 Выявление кБСЖК, ковалентно связанного с поверхностью магнитных частиц, с помощью конъюгата фотопротеина обелина с антителом к кБСЖК

Магнитные частицы с кБСЖК, полученные по способу №3, а также исходные аминированные магнитные частицы, используемые в качестве контролей, инкубировали с 1% БСА в PBS буфере в течение часа при комнатной температуре. Частицы 5 раз промыли промывочным буфером (таблица 2). После этого к частицам добавили по 100 мкл конъюгата обелина с антителом к кБСЖК (активность 50 относительных световых единиц) в буфере 20 мМ Трис-НСl рН 7,0 с 5мМ ЭДТА, 0,1% БСА и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Затем частицы 5 раз промыли промывочным буфером, далее добавили по 100 мкл буфера 20 мМ Трис-НСl рН 7,0 с 5 мМ ЭДТА и переносили суспензию в лунки непрозрачного планшета (Costar, США). Билюминесцентную активность фотопротеина обелина инициировали впрыском 50 мкл 0,1 М CaCl_2 в 0,1 М Трис-НСl рН 8,8 и измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 (Berthold, Германия). Сигнал интегрировали в течение 5 с.

Для расчета количества конъюгата обелина с антителами к кБСЖК, иммобилизованных на магнитных частицах, в качестве калибровочного графика использовали зависимость билюминесцентного сигнала обелина D12С от его содержания. Для этого обелина D12С вносили в лунки непрозрачного планшета в количестве от 1000 фемтомоль до 0,1 аттомоль в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl рН 7,0 с 5 мМ ЭДТА, 0,1% БСА. Билюминесцентную активность измеряли как описано выше.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изъято 12 страниц

ВЫВОДЫ

В ходе проведенных исследований были получены следующие результаты:

1. Получены высокоочищенные препараты рекомбинантных стрептавидина и кБСЖК в необходимых для исследования количествах.
2. Разработан способ химической иммобилизации рекомбинантных белков на поверхности магнитных аминированных микрочастиц.
3. Получены образцы биоспецифичных магнитных микрочастиц, на поверхности которых иммобилизован стрептавидин (с плотностью $0,97 \pm 0,41$ мкг/мг микрочастиц) и кБСЖК (с плотностью $0,2 \pm 0,008$ мкг/мг микрочастиц).
4. На примере биотинилированного производного модельного олигонуклеотида показано применение стрептавидин-активированных микрочастиц для эффективной иммобилизации биотин-содержащих молекул.
5. Показано использование кБСЖК-активированных микрочастиц как специфичных носителей для проведения *in vitro* селекции ДНК-аптамеров, аффинных к кБСЖК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|--------|---|
| БСА | Бычий сывороточный альбумин |
| ДМСО | Диметилсульфоксид |
| ИПТГ | Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид |
| ИФА | Иммуноферментный анализ |
| ОТ-ПЦР | Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция |
| ПСА | Персульфат аммония |
| кБСЖК | Кардиальный белок, связывающий жирные кислоты |
| ТЕМЕД | Тетраметилэтилендиамин |
| Трис | Трис(гидроксиметил)аминометан |
| ЧСА | Человеческий сывороточный альбумин |
| ЭГТА | Этиленгликольтетрауксусная кислота |
| ЭДТА | Этилендиаминтетрауксусная кислота |
| CBP | Calmodulin-binding peptide, кальмодулин-связывающий пептид |
| DMS | Dimethyl suberimidate, диметил суберимидат |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид |
| GST | Glutathione S-transferase, глутатион S-трансфераза |
| GAD-65 | Glutamic acid decarboxylase-65, глутаматдекарбоксилаза-65 |
| НА | Hemagglutinin antigen, антиген гемагглютинина |
| НАВА | 4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid, 4'-гидроксиазобензол-2-карбоновая кислота |
| IA2 | Insulinoma-associated protein-2, инсулинома-ассоциированный |

белок-2

| | |
|--------|--|
| IDA | Iminodiacetic acid, иминодиуксусная кислота |
| LIPS | Luciferase immunoprecipitation system, люциферазная иммунопреципитационная система |
| MBP | Maltose-binding protein, мальтоза-связывающий белок |
| NTA | Nitrilotriacetic acid, нитрилотриуксусная кислота |
| NHS | N-hydroxysuccinimide, N-гидроксисукцинимид |
| PR-mAb | polyol-responsive monoclonal antibodies, полиол-чувствительные моноклональные антитела |
| RIP | Radioimmunoprecipitation, радиоиммунопреципитация |
| SBP | Streptavidin-binding peptide, стрептавидин-связывающий пептид |
| SUMO | Small ubiquitin like modifier |
| SMCC | Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогесан-1-карбоксилат |

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials / под ред. S. Kobayashi, K. Mullen. – Berlin: Springer, 2014. – 900 с.
2. Moser, C. A. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments / C. A. Moser, D. S. Hage // *Bioanalysis*. – 2011. – С. 769-790.
3. Pina, A. S. Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins / A. S. Pina, C. R. Lowe, A. C. A. Roque // *Biotechnology Advances*. – 2014. – С. 366-381.
4. Hernan, R. Multiple epitope tagging of expressed proteins for enhanced detection / R. Hernan, K. Heuermann, B. Blizzard // *BioTechniques*. – 2018. – С. 789-793.
5. Wong, J. P. A carboxy-terminal affinity tag for the purification and mass spectrometric characterization of integral membrane proteins / J. P. Wong, E. Reboul, R. S. Molday, J. Kast // *Journal of Proteome Research*. – 2009. – С. 2388-2396.
6. Weber, P. C. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin / P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme // *Science*. – 1989. – С. 85-88
7. Marttila, A. T. Recombinant NeutraLite Avidin: a non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low non-specific binding properties / A. T. Marttila, O. H. Laitinen, K. J. Airene, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, M. S. Kulomaa // *FEBS Letters*. – 2000. – С. 31-36.
8. Tidow, H. Structural diversity of calmodulin binding to its target sited / H. Tidow, P. Nissen // *The FEBS Journal*. – 2013. – С. 5551-5565.
9. Kim, J. S. Ribonuclease S-peptide as a carrier in fusion proteins / J. S. Kim, R. T. Raines // *Protein Science*. – 1993. – С. 348-356.

10. Kaplan, W. Conformational stability of pGEX-expressed *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase: A detoxification enzyme and fusion protein affinity tag / W. Kaplan, P. Husler, H. Klump, J. Erhardt, N. Sluis-Cremer, H. Dirr // *Protein Science*. – 1997. – С. 399-406.

11. Young, C. L. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications / C. L. Young, Z. T. Britton, A. S. Robinson // *Biotechnology Journal*. – 2012. – С. 620-634.

12. Block, H. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review / H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn, F. Schafer // *Methods in enzymology*. – 2009. – С. 439-473.

13. Kimple, M. E. Overview of affinity tags for protein purification / M. E. Kimple, A. L. Brill, R. L. Pasker // *Current protocols in protein science*. – 2013. – С. 73-99.

14. Burbelo, P. D. Luciferase immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious diseases / P. D. Burbelo, E. E. Lebovitz, A. L. Notkins // *Translational Research*. – 2014. – С. 325-335.

15. Bashmakova, E. E. Bioluminescent aptamer-based solid-phase microassay to detect lung tumor cells in plasma / E. E. Bashmakova, V. V. Krasitskaya, G. S. Zamay, T. N. Zamay, L. A. Frank // *Talanta*. – 2019. – С. 674-678.

16. Красицкая, В. В. Ca^{2+} -регулируемый фотопроtein обелин как мишень для отбора РНК-аптамеров / В. В. Красицкая, А. С. Давыдова, М. А. Воробьева, Л. А. Франк // *Биоорганическая химия*. – 2018. – С. 287-293.

17. Davydova, A. Development and characterization of novel 2'-F-RNA aptamers specific to human total and glycated hemoglobins / A. Davydova, M. Vorobyeva, E. Bashmakova, P. Vorobjev, O. Krasheninina, A. Tupikin, M. Kabilov, V. Krasitskaya, L. Frank, A. Venyaminova // *Analytical Biochemistry*. – 2019. – С. 43-50.

18. Башмакова, Е. Е. Разработка способа получения функционально активного рекомбинантного стрептавидина в клетках *Escherichia coli* / Е. Е. Башмакова, А. Н. Кудрявцев, Л. А. Франк // Журнал Сибирского Федерального университета. Биология. – 2020. – С. 218-229.

19. Green, N. M. Spectrophotometric determination of avidin and biotin / N. M. Green // *Methods in Enzymology*. – 1970. – С. 418-424.

20. Shimomura, O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*/ O. Shimomura. - Singapore: World Scientific Publishing, 2006. – 500 с.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

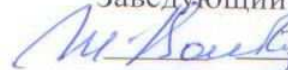
институт

Базовая кафедра биотехнологии

кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Р.Г. Волова

подпись инициалы, фамилия

« 28 » июль 20 21 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

код – наименование направления

Получение и изучение аффинных магнитных микрочастиц

как биоспецифичных носителей

Руководитель


подпись, дата

профессор, д.б.н.
должность, ученая степень

Л.А. Франк
инициалы, фамилия

Научный консультант


подпись, дата

к.б.н., с.н.с. ИБФ СО РАН
должность, ученая степень

В.В Крasiцкая
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

П.А. Ваулин
инициалы, фамилия

Красноярск 2021