

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
Л.Н. ГУМИЛЕВ АТЫНДАҒЫ ЕУАЗИЯ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ



ЖАС ҒАЛЫМДАР КЕҢЕСІ



Студенттер мен жас ғалымдардың
«ҒЫЛЫМ ЖӘНЕ БІЛІМ - 2016» атты
XI Халықаралық ғылыми конференциясының
БАЯНДАМАЛАР ЖИНАҒЫ

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ
XI Международной научной конференции
студентов и молодых ученых
«НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ - 2016»

PROCEEDINGS
of the XI International Scientific Conference
for students and young scholars
«SCIENCE AND EDUCATION - 2016»

2016 жыл 14 сәуір
Астана

**ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
Л.Н. ГУМИЛЕВ АТЫНДАҒЫ ЕУРАЗИЯ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ**

**Студенттер мен жас ғалымдардың
«Ғылым және білім - 2016»
атты XI Халықаралық ғылыми конференциясының
БАЯНДАМАЛАР ЖИНАҒЫ**

**СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ
XI Международной научной конференции
студентов и молодых ученых
«Наука и образование - 2016»**

**PROCEEDINGS
of the XI International Scientific Conference
for students and young scholars
«Science and education - 2016»**

2016 жыл 14 сәуір

Астана

ӘӨЖ 001:37(063)

КБЖ 72:74

Ғ 96

Ғ96 «Ғылым және білім – 2016» атты студенттер мен жас ғалымдардың XI Халық. ғыл. конф. = XI Межд. науч. конф. студентов и молодых ученых «Наука и образование - 2016» = The XI International Scientific Conference for students and young scholars «Science and education - 2016» . – Астана: [http://www.enu.kz/ru/nauka/ nauka-i-obrazovanie/](http://www.enu.kz/ru/nauka/nauka-i-obrazovanie/), 2016. – б. (қазақша, орысша, ағылшынша).

ISBN 978-9965-31-764-4

Жинаққа студенттердің, магистранттардың, докторанттардың және жас ғалымдардың жаратылыстану-техникалық және гуманитарлық ғылымдардың өзекті мәселелері бойынша баяндамалары енгізілген.

The proceedings are the papers of students, undergraduates, doctoral students and young researchers on topical issues of natural and technical sciences and humanities.

В сборник вошли доклады студентов, магистрантов, докторантов и молодых ученых по актуальным вопросам естественно-технических и гуманитарных наук.

ӘӨЖ 001:37(063)

КБЖ 72:74

ISBN 978-9965-31-764-4

©Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия
ұлттық университеті, 2016

На основании проведенных исследований мы пришли к выводу, что наиболее оптимальной и экономически эффективной технологией получения микроклубней картофеля является технология с применением повышенной концентрации сахарозы в питательной среде для культивирования микрорастений.

Список использованных источников

1. Паршина С.А., Лукаткин А.С. «Разведение растений из тканевых культур» (Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, 2008).
2. Хинок Ионг. Корея Институт оф Сайенс энд Текнолоджи, 1990

УДК 579.61

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ E. COLI

Ханнанов Р.А., Шустов А.В., Тен О.А., Ургалиев Ж.Ш.

biomedpreparat@bk.ru

Евоазийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Астана

Введение

Биологические эффекты КСФ были изучены в 70-е годы XX века, однако более подробная характеристика белков КСФ на молекулярном уровне дана в 1990-е годы, когда стало возможным клонирование генов указанных ростовых факторов [1].

Эндогенный Г-КСФ человека был впервые выделен Химически гомогенный Г-КСФ впервые был выделен в 1985 г. из культур опухолевых клеточных линий карциномы мочевого пузыря (5637), продуцирующих этот фактор конститутивно [2]. Г-КСФ является кислым гликопротеином, состоящим из одной полипептидной цепи из 174 аминокислот, его молекулярная масса составляет 19,6 кДа. Молекула Г-КСФ содержит свободную сульфгидрильную группу цистеина (в положении Cys¹⁷) и две внутримолекулярные дисульфидные связи в положениях Cys³⁶–Cys⁴² и Cys⁶⁴–Cys⁷⁴ [3].

Синтез Г-КСФ кодируется геном, локализованным на 17-й хромосоме. Г-КСФ человека синтезируется в двух изоформах. Белок типа А состоит из 177 аминокислотных остатков, белок типа В представляет собой основную форму и состоит из 174 аминокислотных остатков. Изоформа типа А отличается от изоформы В тем, что она содержит три дополнительных остатка (Val-Ser-Gln), которые вставлены после Leu35. Белок типа В характеризуется большей биологической активностью и стабильностью и является основой для разработки лекарственных препаратов филграстима, в том числе, препарата Нейпоген®. Первичные структуры Г-КСФ человека и мыши гомологичны на 72,6% [4].

В клинической практике нашли применение лекарственные субстанции, содержащие Г-КСФ полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК в системе клеток *Escherichia coli* (филграстим), или в системе клеток яичников китайских хомячков (СНО) (ленограстим). Филграстим (рекомбинантный Г-КСФ человека) представляет собой белок, состоящий из 175 аминокислотных остатков, молекулярная масса, которого равна 18,8 кДа. Аминокислотная последовательность филграстима идентична эндогенному Г-КСФ человека, за исключением сайта О-гликозилирования, а также наличие дополнительного остатка метионина на N-конце, который отсутствует у нативного Г-КСФ [5-7].

Материалы и методы

Штаммы

В работе был использован штамм *E. coli* BL21 (DE3) и *E. coli* JM109

Генно-инженерные конструкции

Экспрессионный вектор pET11(A), вектор для клонирования амплификатов – pGEM easy

Питательные среды

LB среда – 10г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л хлорида натрия.

Стоковые растворы

Раствор ампициллина в N,N-диметилформамид -100 мкг/мл; 0,2 М раствор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид в дистиллированной воде.

Синтез гена de-nova

Была рассчитана нуклеотидная последовательность гена рекомбинантного человеческого Г-КСФ на основе аминокислотной последовательности представленной в европейской фармакопее с помощью программы Vector NTI. Посредством программы Oligo 7.41 (Molecular Biology Insights, США), были рассчитаны перекрывающиеся олигонуклеотиды гена рек Г-КСФ с учётом фланкирующих сайтов рестрикции для последующего клонирования в векторе.

Амплификацию проводили на термоциклере Corbett PalmCycler (Corbett, США). Использовали высокоточную термофильную полимеразу Phusion HotStart DNA polymerase (ThermoScientific, США) и реакционный буфер, содержащий 7,5 mM MgCl (поставляется вместе с ферментом). Для проведения ПЦР сначала готовили Phusion Master-Mixt по следующему протоколу: смешивали 712 мкл H₂O MQ, 200 мкл 5X буфер Phusion и 8 мкл раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов (смесь четырёх dNTP, каждого по 25 mM). В результате получали 920 мкл раствора Phusion Master-Mixt, который использовали для приготовления реакционных смесей для ПЦР с полимеразой Phusion.

В тонкостенной пробирке для ПЦР объемом 0,2 мл смешивали 23 мкл Phusion Master-Mixt, 2 мкл смеси праймеров (каждого 50 пМ/мкл), 0,2 мкл полимеразы Phusion HotStart DNA Polymerase (5 ед/мкл) и 10 нг матрицы (при синтезе de novo на первом раунде ПЦР никакая матрица не используется).

Состав реакционной смеси первого раунда амплификации для синтеза гена de novo: реакционная смесь содержит 23 мкл Phusion Master-Mixt, 2 мкл смеси “внутренних” праймеров (каждый праймер присутствует в равной концентрации, общая концентрация 50 пМ/мкл), 1 е.а. полимеразы Phusion HotStart DNA Polymerase. Программа термоциклирования для ПЦР первого раунда: 95°C -10 мин; далее 30 циклов: 95°C -1 мин, 55°C -1 мин, 72°C -1 мин; далее - 72°C -10 мин.

Состав реакционной смеси второго раунда амплификации для синтеза гена de novo: 46 мкл Phusion Master-Mixt, 2 мкл “фланкирующего” праймера в прямой ориентации, 2 мкл “фланкирующего” праймера в обратной ориентации, 1 е.а. полимеразы Phusion HotStart DNA Polymerase. В реакционную смесь второго раунда в качестве матрицы для амплификации добавляли 1 мкл продукта ПЦР первого раунда, разведённого водой в 10 раз. Для ПЦР второго раунда использовали ту же программу термоциклирования, что и для первого раунда. Полученный амплификат разделяли в агарозном 1% геле участок соответствующий по молекулярному весу целевому гену вырезали и проводили выделение набором PureLink Quick Gel Extraction Kit согласно протоколу изготовителя.

Получение экспрессионного вектора

Очищенный продукт амплификации подвергли сайтспецифическому гидролизу рестриктазами NdeI и BamHI. Состав реакционной смеси: 10 мкл очищенного ПЦР продукта, 8 мкл буфера 10X Tango, по 1 мкл (10U) эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI, 20 мкл ультра чистой воды. Реакционную смесь инкубировали при температуре 37 °C в течение 3 часов. Рестрикционную смесь очищали набором PureLink Quick Gel Extraction Kit согласно протоколу изготовителя. Аналогичным способом линеаризовали плазмидный вектор pET 11a. Состав реакционной смеси: 1 мкл плазмидного вектора (6,5 мкг/мкл), 4 мкл буфера 10X Tango, по 1 мкл (10 U) эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI. Реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 3 часов. Реакционную смесь очищали набором ... согласно протоколу изготовителя. Лигирование амплификата в линеаризованный вектор pET11a

проводили с помощью набора Thermo scientific T4 DNA Ligase. Состав реакционной смеси: 1 мкл линейаризованного вектора рЕТ11а (365 нг/мкл), 5 мкл амплификата (56 нг/мкл), 2 мкл 10X T4 DNA Ligase Buffer, 1 мкл T4 ДНК лигазы (1U), 11 мкл ультрачистой воды. Лигазную смесь инкубировали при 4 °С течение 18 часов. По истечении указанного времени лигазной смесью трансформировали компетентные клетки JM109. Трансформанты высаживали на твёрдую агаризованную среду LB содержащую ампициллин (100 мкг/мл). Выросшими колониями инокулировали жидкую питательную среду LB содержащую ампициллин (100 мкг/мл) и инкубировали при 37 оС до оптической плотности культуральной жидкости – 0,7 о.е. Биомассу седементировали центрифугированием и из бактериальной массы выделяли плазмидную ДНК набором PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep Kits согласно протоколу производителя. Выделенные плазмиды секвенировали с помощью ABI3100 секвинатора.

Результаты и обсуждение

Синтез гена de-nova.

Согласно последнему изданию Европейской фармакопеи первичная последовательность рекомбинантного гранулоцит колониестимулирующего фактора (непатентованное название Филграстим) следующая MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA¹TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAP LSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLD²TLQLDVADFATTIWQQME ELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS³YRVLRH⁴LAQP.

Руководствуясь аминокислотной последовательность с помощью программы Gene Designer 2.0 была рассчитана нуклеотидная последовательность гена с учётом последующей трансляции мРНК в клетках E. coli штамма B. Нуклеотидная последовательность гена зрелой полипептидной цепи Г-КСФ представлена на рисунке 1.

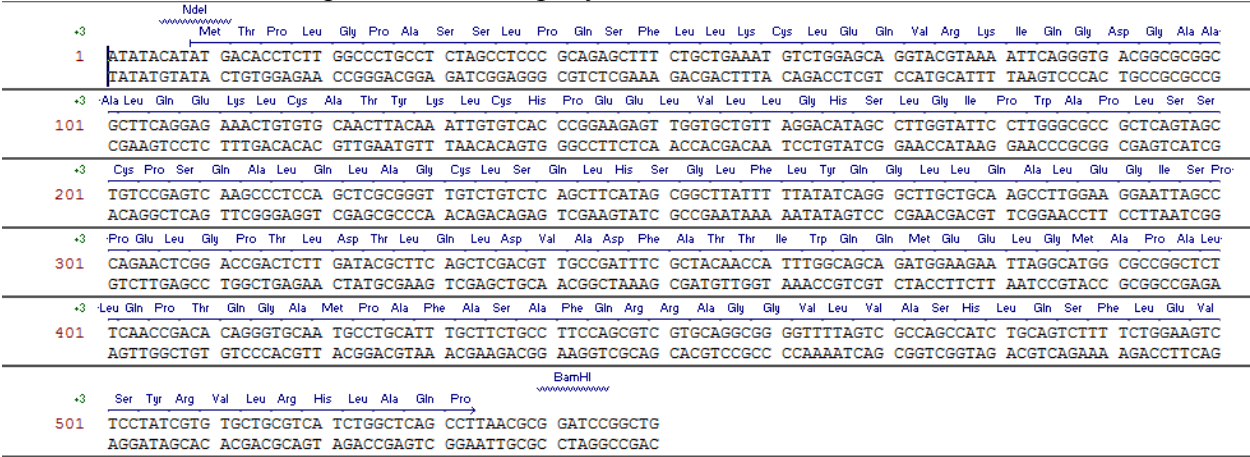


Рисунок 1. Нуклеотидная последовательность гена зрелой полипептидной цепи Г-КСФ

С помощью программы DNAWorks 3,1 были рассчитаны олигонуклеотидные фрагменты для ПЦР. Перекрывающиеся олигонуклеотидные фрагменты представлены в таблице 2.

Таблица 2- Олигонуклеотиды для синтеза гена Г-КСФ человека de-nova.

Название	Последовательность (5'-3')	Длина
GCSF1	GGCGGCGGCCATATGACACCTCTTGGCCCTGCCTCTAG	38
GCSF2	CGTACCTGCTCCAGACATTTTCAGCAGAAAGCTCTGCGGGAGGCTAG AGGCAGGGCCAAGA	60
GCSF3	AAATGTCTGGAGCAGGTACGTAAAATTCAGGGTGACGGCGCGGCGC TTCAGGAGAAACTG	60
GCSF4	AGCACCAACTCTTCCGGGTGACACAATTTGTAAGTTGCACACAGTTT CTCCTGAAGCGCC	60
GCSF5	CCCGGAAGAGTTGGTGCTGTTAGGACATAGCCTTGGTATTCCTTGGG	60

	CGCCGCTCAGTAG	
GCSF6	GCTGAGACAGACAACCCGCGAGCTGGAGGGCTTGACTCGGACAGCT ACTGAGCGGGCGCCC	60
GCSF7	CGGGTTGTCTGTCTCAGCTTCATAGCGGCTTATTTTATATCAGGGCT TGCTGCAAGCCT	60
GCSF8	AAGCGTATCAAGAGTCGGTCCGAGTTCTGGGCTAATTCCTTCCAAGG CTTGCAGCAAGCC	60
GCSF9	GACCGACTCTTGATACGCTTCAGCTCGACGTTGCCGATTTCGCTACA ACCATTTGGCAGC	60
GCSF10	TGTCGGTTGAAGAGCCGGCGCCATGCCTAATTCTTCCATCTGCTGCC AAATGGTTGTAGC	60
GCSF11	CCGGCTCTTCAACCGACACAGGGTGCAATGCCTGCATTTGCTTCTGC CTTCCAGCGTCGT	60
GCSF12	CCAGAAAAGACTGCAGATGGCTGGCGACTAAAACCCCGCCTGCACG ACGCTGGAAGGCAG	60
GCSF13	CCATCTGCAGTCTTTTCTGGAAGTCTCCTATCGTGTGCTGCGTCATCT GGCTCAGCCTTA	60
FCSFNd e	ATATACATATGACACCTCTTGGCCCTGCCTCTAG	34
GCSFBa nHI	GTCATCTGGCTCAGCCTTAACGCGGATCCGGCTG	34

В результате была получена последовательность фланкированная сайтами рестрикции Nde I и BamHI.

Получение вектора для экспрессии Г-КСФ в клетках E. coli

Ген кодирующий зрелую полипептидную цепь Г-КСФ человека фланкированный сайтами рестрикции Nde I и BamHI был клонирован в плазмидный вектор pET11a по соответствующим сайтам. В результате была получена плазида рОХ представленная на рисунке 2.

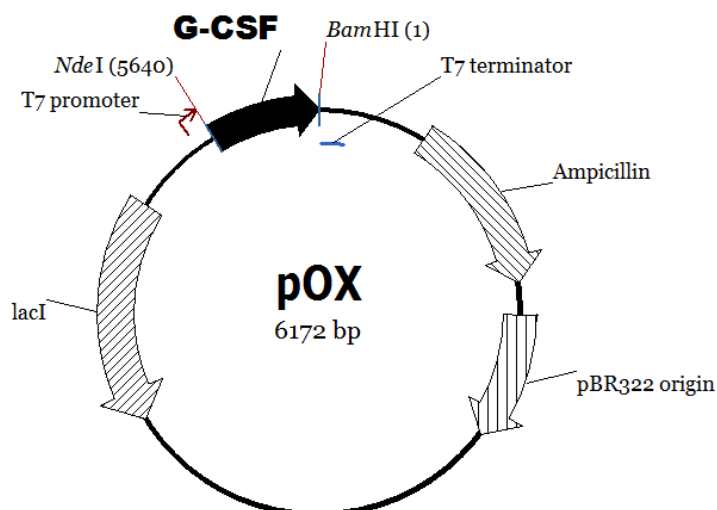


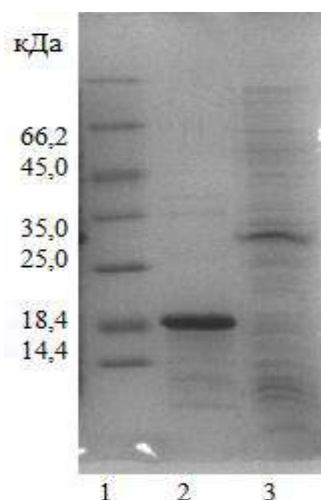
Рисунок 2- Схема экспрессионного вектора рОХ

Создание штамма-продуцента рекомбинатного Г-КСФ и оценка способности экспрессии целевого белка

Компетентные клетки E. coli BL21(DE3) были трансформированы плазмидой рОХ. В результате был получен штамм-продуцент E. coli BL21(DE3)/рОХ.

Результаты изучения характера биосинтеза Г-КСФ клетками E. Coli показали, что белок экспрессируется преимущественно в тельца включения, что наглядно демонстрирует

электрофореграмма (Рисунок 3), вероятность токсического эффекта на рост культуры невысока. Данный факт нашел подтверждение при культивировании штамма-продуцента при разных температурных режимах при 18, 25, 30 и 37 оС. Существенных отличий в выходе целевого белка не наблюдалось. Выход Г-КСФ составил 40% от тотального клеточного белка.



Номера дорожек проставлены под рисунком. Дорожки: 1, маркёр масс белков; 2, солюбилизиат телец включения; 3, растворимая фракция лизата биомассы штамма-продуцента.

Рисунок 3 – Фотография геля SDS-PAGE для исследования характера продукции филграстима

Заключение.

В результате выполнения работы был синтезирован de-nova ген Г-КСФ человека. Собрана генно-инженерная конструкция рОХ для бактериальной экспрессии целевого белка в клетках *E. coli*. Получен штамм-продуцент рекомбинантного гранулоцит колониестимулирующего фактора человека.

Список использованных источников

1. Freyer G., Ligneau B., Trillet-Lenoir V. Colony-stimulating factors in the prevention of solid tumors induced by chemotherapy in patients with febrile neutropenia // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 1998. V. 10. P. 3–9.
2. Welte, K., Platzer, E., Lu, L., Gabrilove, J., Levi, E., Mertelsmann, R., and Moore, M., 1985, Purification and biological characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1526–1530.
3. Molineux G. Granulocyte colony-stimulating factor // In: *Hematopoietic Growth Factors in Oncology: Basic Science and Clinical Therapeutics* / Ed. G. Morstyn, M. Foote, G. J. Lieschke. NJ, Totowa: Humana Press Inc., 2004. P. 83–97.
4. Asano S. Human granulocyte colony-stimulating factor: Its basic aspects and clinical applications // *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 1991. V. 13. P. 400–413.
5. Molineux G. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuGCSF, Neulasta) // *Curr. Pharm. Des.* 2004. V. 10. P. 1235–1244.
6. Wadhwa M., Thorpe R. Haematopoietic growth factors and their therapeutic use // *Thromb. Haemost.* 2008. V. 99. P. 863–873.
7. Heuser M., Ganser A. Colony-stimulating factors in the management of neutropenia and its complications // *Ann. Hematol.* 2005. V. 84. P. 697–708.