

**СОЗДАНИЕ НАБОРА  
УНИФИЦИРОВАННЫХ  
ЛИНЕАРИЗОВАННЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ  
ПОВЫШЕНИЯ РАСТВОРИМОСТИ  
РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ**

---

**Радевич Диана Сергеевна**

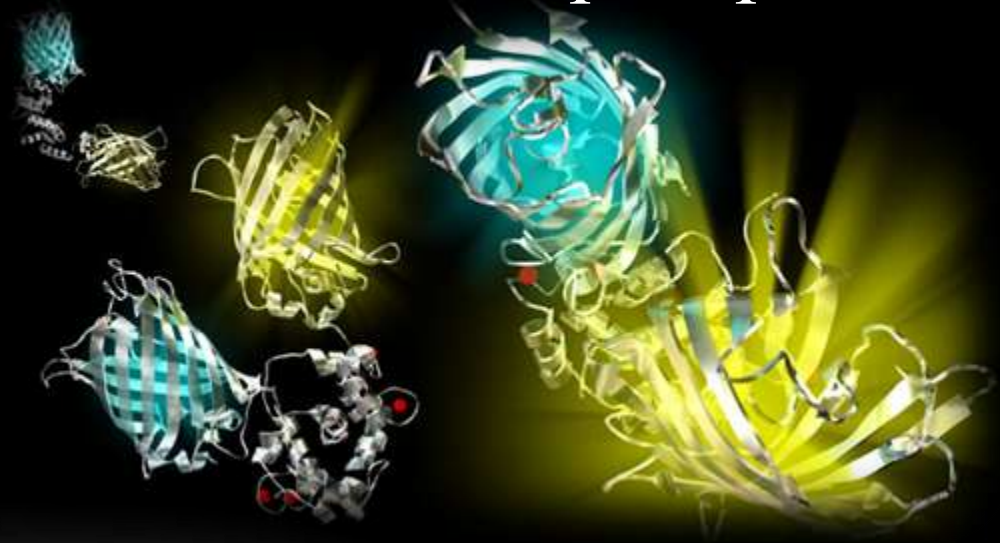
**Институт микробиологии НАН Беларуси**



*Escherichia coli* - один из наиболее  
востребованных биологических  
объектов для генно-инженерных  
модификаций

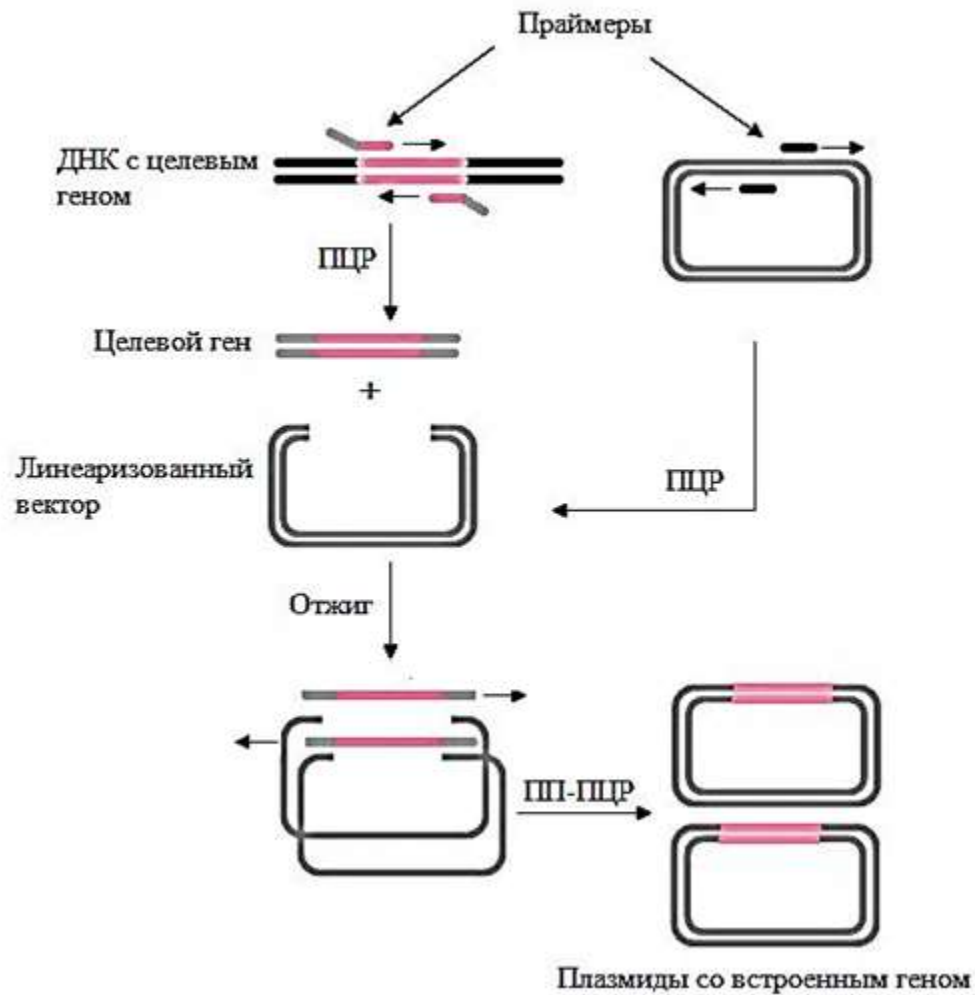


Наиболее общий подход к оптимизации уровня растворимости рекомбинантных белков заключается в клонировании исходного гена в плазмидные векторы, несущие гены различных белков-партнеров.



# СХЕМА СТАНДАРТНОГО МЕТОДА КЛОНИРОВАНИЯ

Ген  
рез



## ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

Создание набора унифицированных линейных векторов для повышения растворимости целевого белка путем его слияния с различными белками-партнерами и лидерными последовательностями бактериальных белков.



# СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ УНИФИЦИРОВАННЫХ ЛИНЕАРИЗОВАННЫХ ВЕКТОРОВ, КОДИРУЮЩИХ ГЕНЫ БЕЛКОВ-ПАРТНЕРОВ



## В КАЧЕСТВЕ БЕЛКОВ-ПАРТНЕРОВ БЫЛИ ВЫБРАНЫ:

Глутатион-S-  
трансфераза

*E. coli*

*E. coli*

Дисульфидизомераза

*E. coli*

N-утилизирующая  
субстанция А

*E. coli*

белка азурина

*P. aeruginosa*

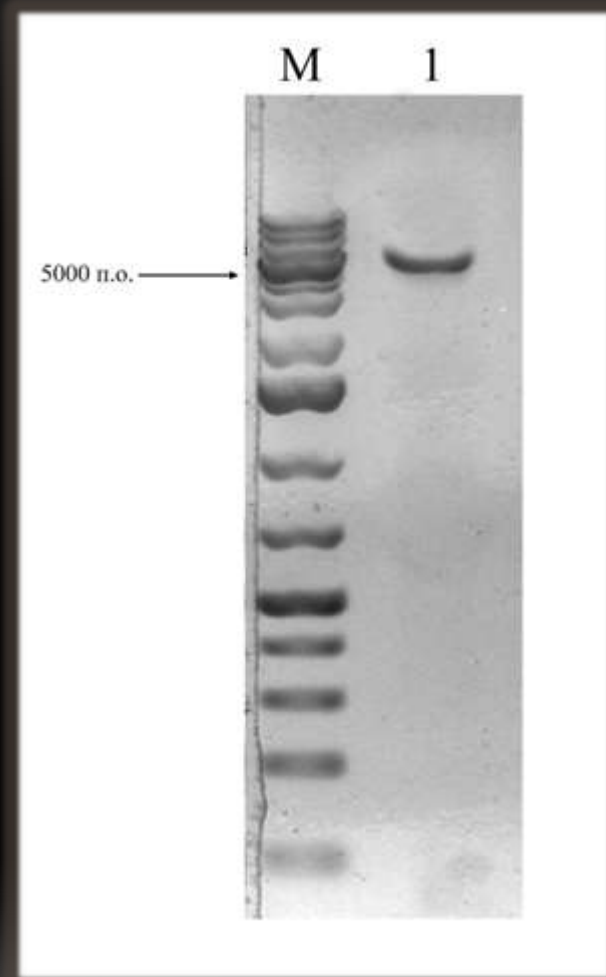
Небольшой  
убиквитин-  
подобный белок

*S. cerevisiae*

# 1. ЛИНЕАРИЗАЦИЯ ВЕКТОРА



**М** – маркер молекулярных масс  
фрагментов ДНК;  
**1** – линеаризованный вектор  
pET42a (~5000 п.о.)



**Электрофореграмма  
линеаризованного вектора  
pET42a(+)**



## 2. АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ-ПАРТНЕРЫ



**М** – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК;

**1 – 7** продукты амплификации:

**1** – нуклеотидной последовательности *azuLid* (~90 п.о.);

**2** – гена *dsbA* (~650 п.о.);

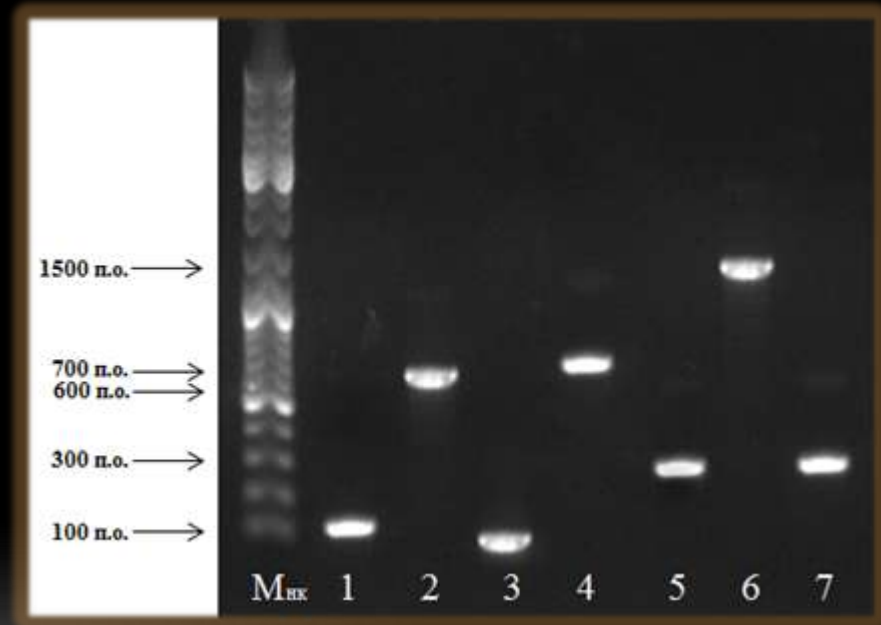
**3** – нуклеотидной последовательности *pelB*, (~66 п.о.);

**4** – гена *dsbC* (~ 742 п.о.);

**5** – гена *sumo* (~ 305 п.о.);

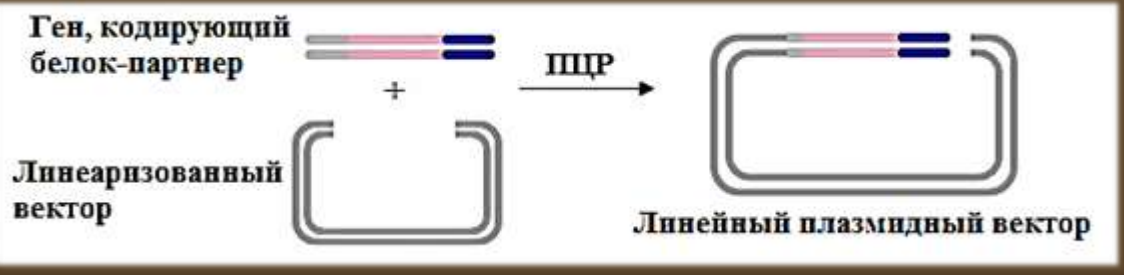
**6** – гена *nusA* (~ 1488 п.о.);

**7** – гена *trx* (~ 330 п.о.).



**Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации генов белков-партнеров**

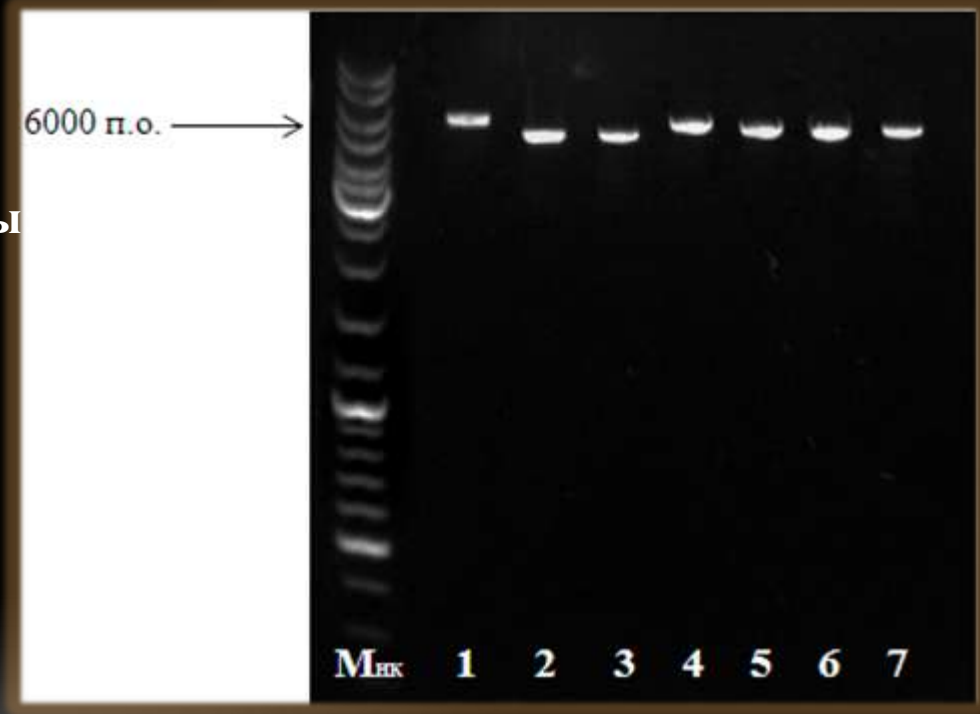
# 3. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНЕЙНЫХ ВЕКТОРОВ



Мнк – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК;

1-7 линеаризованные плазмидные векторы

- 1 – pET42lin-NusA (~6488 п.о.);
- 2 – pET42lin-Azu (~5090 п.о.);
- 3 – pET42lin-PelB (~5066 п.о.);
- 4 – pET42lin-DsbC (~5738 п.о.);
- 5 – pET42lin-Trx (~5330 п.о.);
- 6 – pET42lin-Sumo (~5305 п.о.);
- 7 – pET42lin-DsbA (~5650 п.о.).

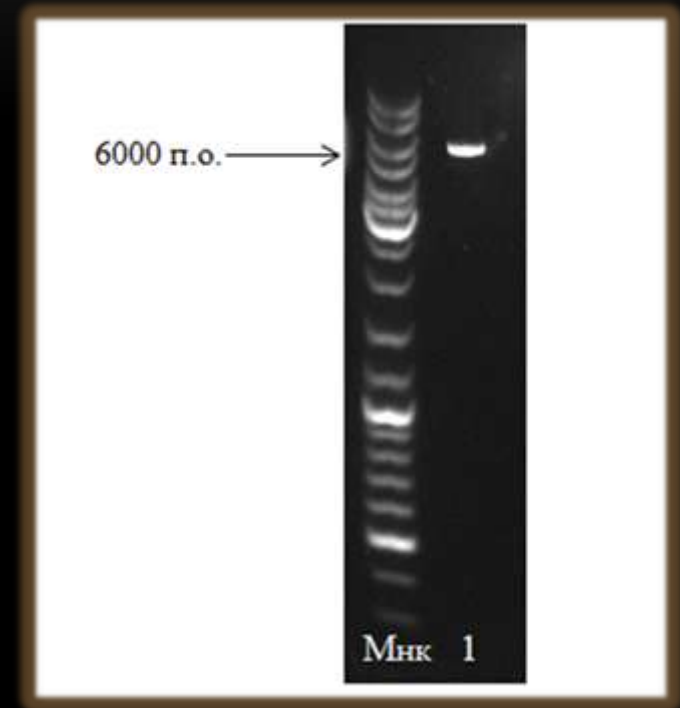


Электрофореграмма линеаризованных плазмидных векторов

## 4. ПОЛУЧЕНИЕ ВЕКТОРА, НЕСУЩЕГО ГЕН ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ

**Мнк** – маркер молекулярных масс  
фрагментов ДНК;

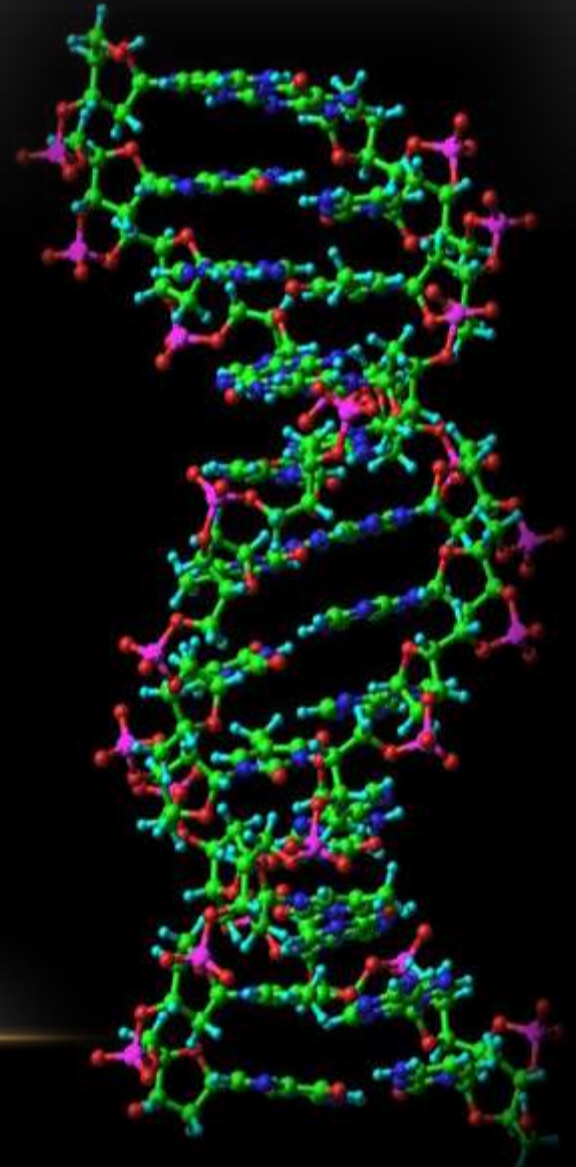
**1** – вектор pET42lin-Gst (~5680 п.о.)



**Электрофореграмма вектора  
pET42lin-Gst**

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

**В результате проведенных экспериментов сконструирован набор линейризованных плазмидных векторов, которые могут быть использованы для создания химерных белковых конструкций, содержащих целевой белок в сочетании с различными белками-партнерами, для дальнейшего изучения возможности повышения растворимости целевых белков. Наличие на концах полученных векторов идентичных нуклеотидных последовательностей позволит встраивать целевой ген во все векторы набора методом лигазо-независимого клонирования.**



**Спасибо за  
внимание!**

