

Межрегиональная олимпиада школьников

«Будущие исследователи — будущее науки»


**«Создание рекомбинантных организмов для
получения белка каппа-казеина»**

Секция: БИОЛОГИЯ

Научные руководители:

Валегжанина Анастасия Львовна

(учитель биологии высшей категории, МБОУ СШ №23 с УИОП, г. Дзержинск)


(подпись) Валегжанина А.Л.
(расшифровка подписи)

Крылова Любовь Владимировна

(м. н. с. кафедры биофизики, ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского г. Нижний Новгород)


(подпись) Крылова Л. В.
(расшифровка подписи)

Количество баллов,
полученных на защите

80

(заполняется председателем жюри)

Председатель жюри


(подпись) _____
(расшифровка подписи)

Работу выполнил
учащийся 11 «Б» класса

Муниципальное бюджетное образовательное учреждение №23
с углубленным изучением отдельных предметов

г. Дзержинск

Вишленков Максим Андреевич

Саров
2025 г

ОГЛАВЛЕНИЕ

№	Название раздела	Стр.
1.	Введение	3
2.	Теоретическая часть	
2.1.	Молекулярное клонирование и этапы получения рекомбинантного белка	5
2.2.	Что такое рекомбинантные белки	6
2.3.	Плазмиды и их роль в молекулярном клонировании	7
2.4.	Эндонуклеазы рестрикции и лигирование	8
2.5.	Праймеры и их функции	12
2.6.	Каппа-казеин, применение молочного белка	13
3.	Практическая часть	
3.1.	Поиск продуцента для синтеза белка	14
3.2.	Подбор эндонуклеаз рестрикции к плазмиде для вставки целевого гена	19
3.3.	Подбор праймеров для амплификации целевого гена	22
3.4.	Метод селекции для обнаружения целевого гена	24
3.4.1.	Использование ПЦР и электрофорезного анализа в лаборатории	25
3.5.	Внедрение плазмиды с целевым геном в дрожжи и получение готовой продукции	28
3.6.	Результаты практической части	31
4.	Заключение	32
5.	Приложение	33
6.	Источники информации	41

1. ВВЕДЕНИЕ

Достижения в области биотехнологии и генной инженерии все чаще применяются для продуцирования белков животного происхождения в чужеродных организмах. Такие белки принято называть рекомбинантными.

Этот подход может быть использован в производстве белков, которые сложно, нерационально и слишком дорого получать традиционными методами. Для белков, используемых в производстве продуктов питания, биотехнологическое производство может не только способствовать улучшению качества и удешевления продуктов питания, но и удовлетворять запрос клиентов с особыми требованиями.

Например, за счёт благоприятных модификаций аминокислотной последовательности можно сделать продукт менее аллергенным. Кроме того, использование биотехнологий привлекательно с точки зрения ресурсосбережения и рационального природопользования, например, за счет уменьшения углеродного следа от животноводства. Синтезированные белки затем можно очистить и использовать в качестве основного или вспомогательного функционального ингредиента для разработки продуктов питания.

Актуальность работы: Получение белка каппа-казеина является затруднительным процессом, в связи с его очень малым содержанием в молоке, следовательно, и дорогой ценой чистого продукта.

Цель работы: Разработать экономически привлекательные методы биотехнологического производства белка молока для решения проблемы в сфере современной пищевой биотехнологии. Микробиологически произведенный молочный белок может быть использован в медицинских и бытовых целях, а также для улучшения аминокислотного состава продуктов, в том числе вегетарианского рациона.

Задачи работы:

№ 1

Найти продуцента, который в наибольшей степени подойдёт для синтеза рекомбинантных молочных белков (в первую очередь казеинов).

№ 2

Подобрать эндонуклеазы рестрикции к плазмиде для вставки целевого гена.

№ 3

Подобрать праймеры для амплификации целевого гена.

№ 4

Найти метод селекции, для обнаружения плазмиды с целевым геном.

№ 5

Разработать методику получения белка с помощью продуцентов.

Практическая часть научно-исследовательской работы выполнялась на территории КубГАУ (Кубанского государственного аграрного университета им. И. Т. Трубилина), в лаборатории молекулярной биологии

*Отзыв научного руководителя о выполнении работ в лаборатории
(Приложение 9)*

2. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1. Что такое молекулярное клонирование

Молекулярное клонирование – это комплекс методов, направленных на создание рекомбинантных молекул ДНК, перенос их в организм-хозяина (трансформацию) и управление последующей репликацией. Молекулярное клонирование используется для изучения экспрессии интересующих генов, синтеза рекомбинантных белков, создания генно-модифицированных организмов и генной терапии.

Основные компоненты молекулярного клонирования:

- Вектор для внесения целевого фрагмента в клетку-хозяина. Чаще всего в этой роли выступают плазмиды - небольшие двуцепочечные кольцевые молекулы ДНК, способные к автономной репликации. Плазмиды также содержат регуляторные элементы для управления транскрипцией и трансляцией и при сравнительно небольшом размере позволяют копировать большие участки ДНК.
- Вставка - целевой фрагмент ДНК, например, ген, регуляторный элемент или оперон.

Общая схема молекулярного клонирования выглядит следующим образом:

1. Выделение с помощью эндонуклеаз рестрикции и очищение целевого гена.
2. Копирование при помощи полимеразной цепной реакции гена-вставки.
3. Подбор подходящей для дальнейших исследований плазмиды.
4. Линеаризация плазмиды при помощи эндонуклеаз рестрикции.
5. Модификация свободных концов плазмиды и гена-вставки, для дальнейшего их соединения под действием ДНК-лигазы.
6. Сшивание плазмиды и целевого гена.
7. Скрининг на положительный результат вставки целевого гена.
8. Трансформация плазмиды трансформация (внедрение) в организм-хозяина.

2.2. Что такое рекомбинантные белки

Рекомбинантный белок — это белок, претерпевший определённые модификации и кодирующийся рекомбинантной (модифицированной) ДНК.

Рекомбинация — процесс обмена генетическим материалом путём разрыва и соединения разных молекул нуклеиновых кислот, то есть перераспределение генетического материала, приводящее к созданию новых комбинаций генов. В естественных условиях рекомбинация у эукариот — обмен участками хромосом в процессе клеточного деления. У прокариот рекомбинация осуществляется при передаче ДНК путём конъюгации, трансформации или трансдукции, либо в процессе обмена участками вирусных геномов. Методы генной инженерии значительно расширили возможности рекомбинационных обменов и позволяют, в отличие от естественной рекомбинации, получать гибридные молекулы нуклеиновых кислот, содержащие практически любые чужеродные фрагменты.

Белки, полученные генно-инженерным способом, то есть транслируемые с рекомбинантных ДНК, также называются рекомбинантными. Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на развитие современной биологии, позволив решать многие теоретические задачи, например, определять функции белков, изучать механизмы регуляции экспрессии генов.

Разработка технологии рекомбинантных ДНК и методов переноса генов из одного организма в другой совершила настоящую революцию в биологии. Рекомбинантные технологии позволяют не только получить продукт с высоким выходом, но и конструировать биомолекулы с заранее заданными параметрами. В настоящее время способ является одним из выгодных для получения белка каппа-казеина, который является трудновыделяемой составляющей молочной продукции КРС.

2.3. Плазмиды и их роль в молекулярном клонировании

Плазмиды — небольшие молекулы ДНК, физически обособленные от хромосом и способные к автономной репликации, в той или иной мере проходящей под контролем хромосомной ДНК.

Главным образом плазмиды встречаются у бактерий, а также у некоторых архей и эукариот (грибов и высших растений). Чаще всего плазмиды представляют собой двуцепочечные кольцевые молекулы. Несмотря на способность к размножению, плазмиды, как и вирусы, не рассматриваются в качестве живых организмов.

Размер природных плазмид может варьировать от тысяч до миллиона оснований, широко используются в молекулярной биологии в качестве векторов для переноса генетической информации и генетических манипуляций ввиду следующих преимуществ:

1. Легкость проведения манипуляций с последовательностью. Размер применяемых в генетической инженерии плазмид (1 000–20 000 пар оснований) делает их удобными для выделения, очистки и модификации полинуклеотидной цепи.
2. Автономная репликация. Плазмиды способны к автономной репликации, следовательно, можно с легкостью получить необходимое количество копий плазмидной ДНК, используя недорогие среды и быстро делящиеся клетки *E. coli*.
3. Стабильность. Плазмиды стабильны в течение длительного времени в виде очищенной молекулы ДНК или внутри трансформированных бактериальных клеток, хранящихся при низкой температуре в виде глицериновых стоков.
4. Возможность использования в различных организмах и исследованиях. С применением плазмид можно проводить экспрессию гена не только в бактериальных клетках, но и в клетках эукариот, включая клетки грибов, растений и млекопитающих.

Плазмидный вектор, содержащий необходимые элементы для трансляции, клонируемой ДНК в полипептидную цепь, называется экспрессионным.

2.4. Эндонуклеазы рестрикции и лигирование

Рестриктазы — это ферменты, разрезающие ДНК. Каждый фермент распознает одну или несколько целевых последовательностей и разрезает ДНК в местах этих последовательностей или рядом с ними. Многие рестриктазы вносят разрывы в виде ступенек, образуя концы с одноцепочечными выступами ДНК. Однако бывает, что некоторые концы получаются тупыми и выступов не имеют.

ДНК-лигаза — это фермент, образующий связь в ДНК после разрыва. Если два фрагмента ДНК имеют совпадающие концы, лигаза связывает их, чтобы сформировать единую, непрерывную молекулу ДНК.

Рестриктазы и ДНК-лигаза используются при клонировании ДНК для вставки генов и других фрагментов ДНК в плазмиды.

Как вырезать и вставить ДНК?

При клонировании ДНК учёные создают множество копий какого-то фрагмента ДНК, например, гена. В большинстве случаев клонирование включает в себя вставку гена в кольцевую молекулу ДНК, называемую **плазмидой**, которая может копироваться в бактериях.

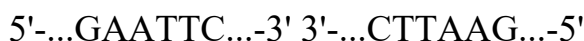
Как можно соединить фрагменты ДНК из разных источников (таких как человеческий ген и бактериальная плаزمиды) в единую молекулу ДНК?

Один из распространенных методов основан на использовании рестриктаз и ДНК-лигазы.

Рестриктазы

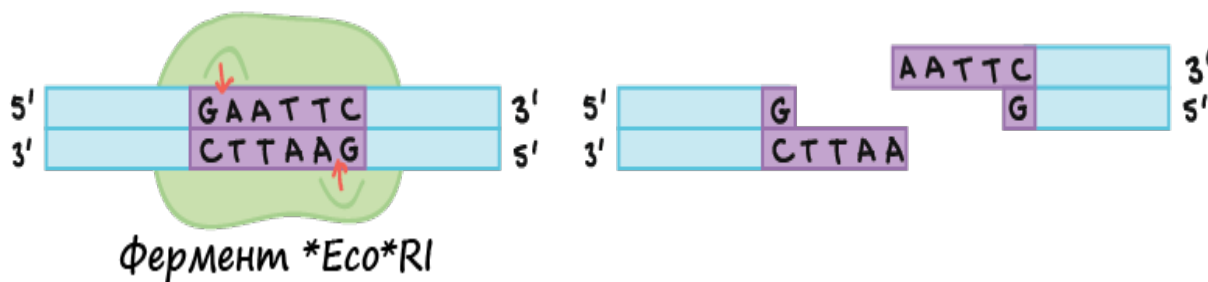
Рестриктазы обнаружены у бактерий и других прокариот. Они распознают и связываются с определенными последовательностями ДНК, называемыми **сайтами рестрикции**. Каждая рестриктаза распознает только один или несколько сайтов рестрикции. Когда она находит свою последовательность-мишень, то делает двухцепочечный разрыв в молекуле ДНК. Как правило, разрыв находится в сайте рестрикции или рядом с ним. Данный процесс достаточно предсказуем и точен.

В качестве примера того, как рестриктаза распознает и разрезает последовательность ДНК, рассмотрим широко известную рестриктазу *EcoRI*, используемую в лабораториях. *EcoRI* вносит разрыв в сайте:

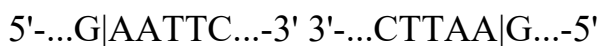


Сайт *EcoRI*

Когда *EcoRI* распознает этот сайт и вносит разрыв, она всегда делает это по очень специфичной схеме, которая приводит к образованию концов с одноцепочечными «выступами» ДНК:



Фермент *EcoRI* связывается с сайтом *EcoRI* в фрагменте ДНК и вносит разрыв в обе цепи ДНК. Схема внесения разрыва будет следующей:

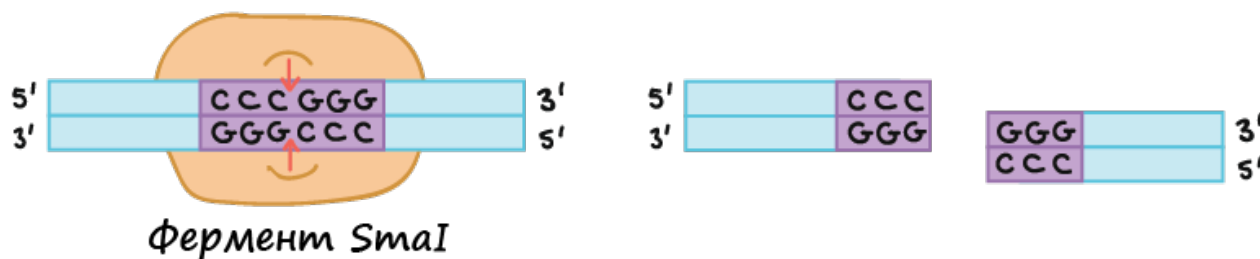


Таким образом, образуется липкий конец 5'-AATT-3' на каждом конце разрезанной ДНК.

Если другой фрагмент ДНК имеет такие же выступы (например, потому, что он также был разрезан *EcoRI*), выступы могут соединяться посредством комплементарного спаривания оснований. По этой причине считается, что ферменты, оставляющие одноцепочечные выступы, образуют **липкие концы**. Липкие концы полезны при клонировании, потому что они скрепляют два фрагмента ДНК и могут быть объединены с помощью ДНК-лигазы.

Не все рестриктазы образуют липкие концы. Некоторые из них образуют тупые концы, внося разрыв прямо посередине целевой последовательности и

не оставляя выступов. Рестриктаза* *Sma**I является тем примером, когда образуются тупые концы:



Фермент *Sma*I связывается с сайтом рестрикции *Sma*I, который выглядит следующим образом:

5'-...CCCGGG...-3' 3'-...GGGCCC...5'

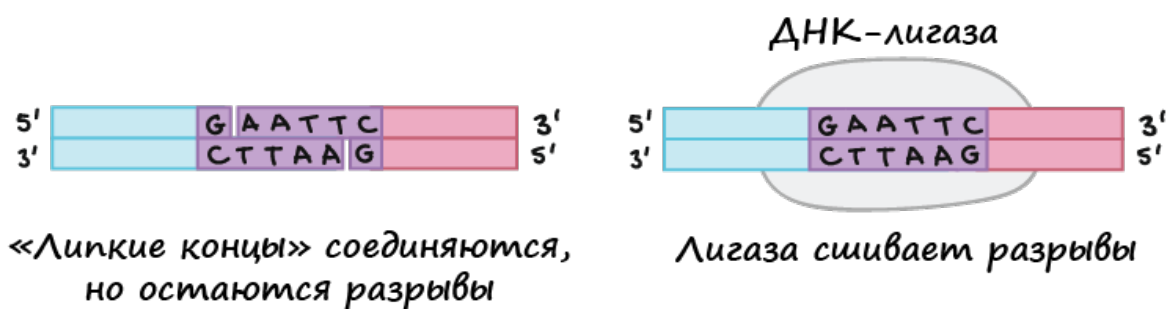
Он вносит разрыв прямо в середине этой последовательности на обеих нитях, образуя тупые концы. Вырезанные участки:

5'-...CCC|GGG...-3' 3'-...GGG|CCC...5'

Фрагменты с тупыми концами могут быть соединены друг с другом с помощью ДНК-лигазы. Однако фрагменты с тупыми концами сложнее связать вместе (процесс лигирования менее эффективен и с большей вероятностью потерпит неудачу), потому что нет одноцепочечных выступов, удерживающих молекулы ДНК в нужном положении.

ДНК-лигаза

В процессе репликации ДНК задача лигазы состоит в том, чтобы соединить вместе фрагменты вновь синтезированной ДНК и сформировать целостную цепь. Лигазы, используемые при клонировании ДНК, в основном делают то же самое. Если у двух частей ДНК совпадают концы, ДНК-лигаза может соединить их вместе, чтобы образовать непрерывную молекулу.



Фрагмент 1 ДНК:

5'-...G 3'-...CTTAA

Фрагмент 2 ДНК:

AATTC...-3' G...-5'

Одноцепочечные области двух молекул могут склеиваться за счет водородных связей, но в основной цепи все еще остаются разрывы:

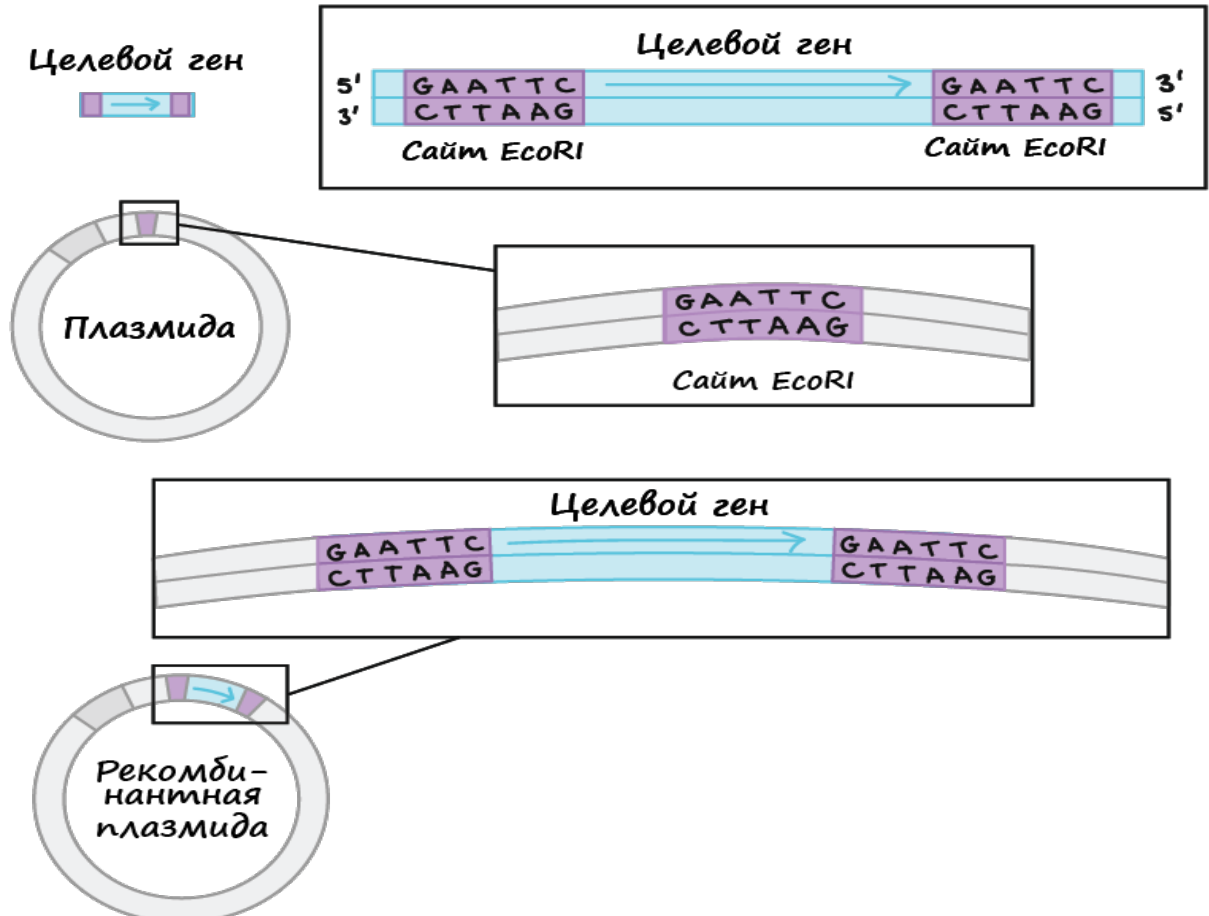
5'-...G|AATTC...-3' 3'-...CTTAA|G...-5'

ДНК-лигаза сшивает разрывы, образуя непрерывную молекулу ДНК:

5'-...GAATTC...-3' 3'-...CTTAAG...-5'

Используя АТФ в качестве источника энергии, лигаза катализирует реакцию, в которой фосфатная группа, выступающая на 5' конце одной цепи ДНК, связывается с гидроксильной группой, выступающей на 3' конце другой цепи. В результате этой реакции образуется целостный сахарно-фосфатный остов.

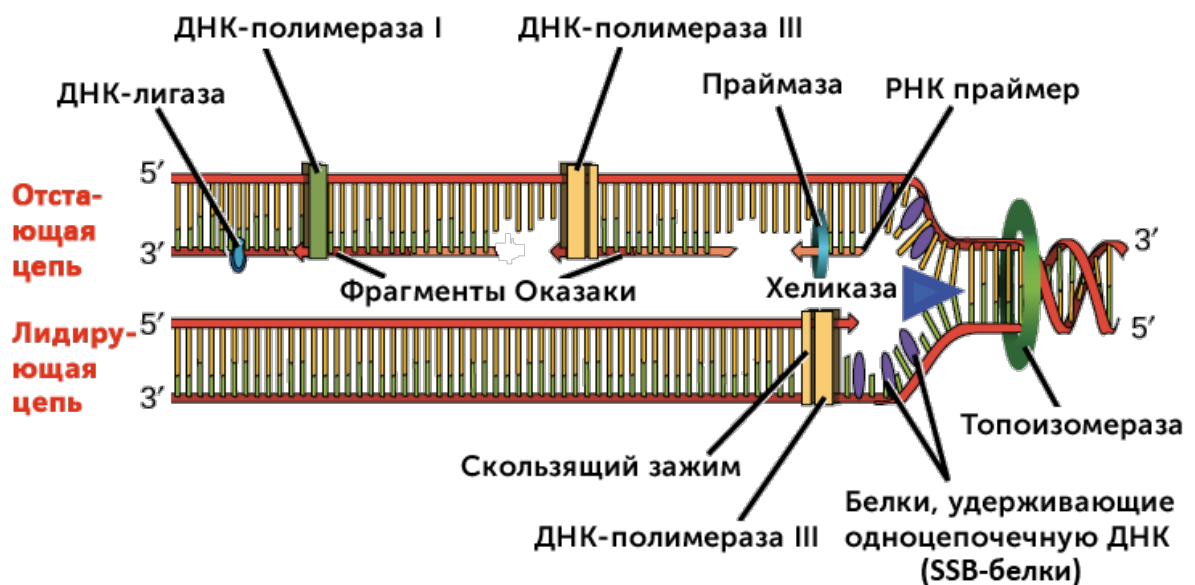
Пример: создание рекомбинантной плазмиды:



2.5. Праймеры и их функции

Праймер (англ. *primer*) — это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени, служит - полимеразы (при репликации ДНК). Затравка необходима ДНК-полимеразам для инициации синтеза новой цепи, с 3'-конца (гидроксильной группы) праймера. ДНК-полимераза последовательно добавляет к 3'-концу праймера нуклеотиды, комплементарные матричной цепи.

В большинстве случаев естественной репликации ДНК праймером для синтеза ДНК является короткий фрагмент РНК (создаваемый заново). Такой рибонуклеотидный праймер создается ферментом праймазой (праймаза у прокариот, ДНК-полимераза у эукариот), и впоследствии заменяется дезоксирибонуклеотидами полимеразой, выполняющий в норме функции репарации.



Многие лабораторные методы в биохимии и молекулярной биологии, которые предполагают использование ДНК-полимеразы, такие, как секвенирование или полимеразная цепная реакция, требуют наличие коротких олигонуклеотидов (праймеров). Такие праймеры обычно длиной от 6 до 50 оснований, химически синтезированные олигонуклеотиды.

2.6. Каппа-казеин, применение молочного белка

Каппа-казеин – является ключевым белком в процессе производства молочных продуктов. Исследованиями ученых установлено, что В аллель каппа-казеина характеризует высокое содержание белка, что важно при производстве продукции, белкового происхождения с помощью биотехнологических процессов.

В настоящее время каппа-казеин широко используется как добавка к кормам с/х животным, рыбе и др.

Каппа-казеин-содержащие препараты широко применяются в медицине, особенно при парентеральном питании. Из-за сбалансированности аминокислотного состава и лёгкой усваиваемости выделенный из молока казеин часто выступает основой питания атлетов, однако из-за довольно медленного расщепления в желудке его приём целесообразен в длительные периоды покоя между тренировками, например, на ночь.

Казеин входит в состав мазей, применяемых в дерматологии, и биологических клеев, используемых в хирургии. Казеин применяется для производства казеиновой краски, казеинового клея, пластмасс, а также искусственных пищевых продуктов для вегетарианского рациона.

3. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

3.1 . Поиск продуцента для синтеза белка

Для белка каппа-казеина существует несколько способов его получения:

1) Вытяжка белка из коровьего молока.

Первый этап: получение и подготовка сырья. За основу получения белка берется коровье молоко, полученное этичным способом на сертифицированных фермах. Удой проходит процедуру очистки. В сыром виде молоко содержит около 5% лактозы, 4% жира и 3,5 % чистого белка. Но необработанное сырье содержит еще и бактерии, которые могут быть опасными для человека. Для уничтожения болезнетворных микроорганизмов молоко пастеризуют. При этом питательные вещества сохраняются, а бактерии погибают. После пастеризации белок в молоке меняет структуру, распадается на сывороточный протеин (20%) и казеин (80%).

Второй этап: В пастеризованное молоко добавляют ферменты, которые изменяют структуру казеиновых клеток. Процесс известен как «свертывание». Творожистая часть используется для производства сырных продуктов, а оставшуюся жидкость продолжают обрабатывать. Из полученной белковой фракции удаляют избыточные соли, лактозу и другие «ненужные» элементы.

Третий этап: денатурация с последующей сушкой. Денатурация — это технологический процесс, при котором структура белка изменяется под воздействием кислотных компонентов. Это приводит к изменению свойств белка (улучшается растворимость, увеличивается способность связываться с другими молекулами). После денатурации сырье выглядит как гель и имеет небольшой срок хранения. Поэтому белковая фракция сушится, и на выходе получается порошок белковой (казеиновой) породы.

Рассматривая данный способ как ведущий в получении каппа-казеина, можно сказать, что он не может являться таковым, так как процесс подготовки сырья, а затем его обработка требует много средств. В итоге, в соотношении

большого объема взятого сырья (молока) на выходе мы получаем очень маленькое количество каппа-казеина. Также получение белка из коровьего молока является нецелесообразным с точки зрения ресурсосбережения. Хорошее молоко может быть получено при надлежащем качестве ухода за коровами и содержанием целых ферм, а на это уходит не малое количество средств. Коровье молоко же может применяться в прямых целях: изготовлении молочной продукции, а не для изготовления крошечного количества каппа-казеина в отношении больших объемов исходного сырья.

2) Химический синтез.

В настоящее время в лабораториях по всему миру пытаются искусственным (химическим путем) создавать белковые соединения. Процесс является непростым, так как к синтезированному белку очень сложно подобрать подходящие условия для его фолдинга, который играет определяющую роль в свойствах полученных молекул. В конечном итоге может быть синтезирован, но он не будет обладать промышленно значимыми (стандартными) свойствами.

3) Получение с помощью продуцентов.

В биотехнологическом производстве можно использовать организмы разных групп. Для выбора оптимального продуцента в синтезе каппа-казеина необходимо сравнить их положительные и отрицательные качества и выбрать претендентов, исходя из оценки.

Таблица анализа продуцентов:

Название организма	Преимущества	Недостатки
БАКТЕРИИ (E.coli.)	Клетка бактерии E. coli - наиболее простая, экономичная и изученная система экспрессии генетического	В организме E. coli невозможно получать некоторые крупные белковые комплексы, содержащие дисульфидные связи, в частности, белки,

	материала (со встроенным геном к-казеина)	для проявления биологической активности которых требуется посттрансляционные модификации, важные для к-казеинов.
ДРОЖЖИ (Schizosaccharomyces cerevisiae).	Дрожжи являются простыми эукариотами и тем самым обладают преимуществами в плане фолдинга и посттрансляционных модификаций белка, имеют возможность высокоплотного культивирования	Методически сложная система в генной инженерии для создания целевых генов.
Транспластомные РАСТЕНИЯ (Ряска, зелёный мох).	В растительных клетках нет риска загрязнения рекомбинантного белка патогенами живого происхождения-вирусами. Растительные клетки обеспечивают	Необходимость создания транспластомного растения, что усложняет процесс синтеза белка. Невозможность получения большого количества белка сразу, так как у

	правильную посттрансляционную модификацию рекомбинантного белка, характерную для эукариотических клеток, а также его сборку и фолдинг, которые производят высшие эукариоты.	растений длительный период онтогенеза. Малая приспосабливаемость синтезированного белка в пищу и другие отрасли потребления.
ЖИВОТНЫЕ (КРС, а также млечные железы млекопитающих).	Обеспечивает наиболее высокое качество самого белка и его посттрансляционных модификаций, включая гликозилирование	Наиболее сложная и дорогостоящая система экспрессии, устаревшая и невыгодная.
ВИРУСЫ	НЕТ	Отсутствует метаболизм, следовательно, нет возможности синтеза белка.

В итоге, на преимущественных позициях оказались бактерии (*E.coli*) и дрожжи (*Schizosaccharomyces cerevisiae*). У каждого из них выделяются свои недостатки, которые не позволяют выбрать одного продуцента. Бактерии не имеют подходящие посттрансляционные модификации без которых не сможет происходить сборка белка, но генетический материал (плазмиды) *E.coli* давно изучены в сфере молекулярной биологии и используются для проведения экспериментов и внедрения генов, как самая простая,

предсказуемая и понятная система. Дрожжи, наоборот, имеют посттрансляционные модификации важные для каппа-казеина: **гликозилирование, фосфорилирование, сумо, йодирование**, а также могут высокоплотно культивироваться, но процесс создания бинарных векторов в дрожжах затруднителен. Исходя из взаимно выгодного положения мною был применен **метод челночных плазмид**.

Челночные (бинарные) векторы – это гибридные плазмиды, которые способны реплицироваться в клетках *E. coli*. для дальнейшего их введения в продуцент и синтеза белка.

Для клонирования фрагментов ДНК в дрожжевых клетках, как правило, используют челночные бирепликонные векторы, которые способны реплицироваться и в дрожжевых, и в бактериальных клетках. Такие векторы должны содержать два типа сайтов инициации репликации и селективных маркеров, одни из которых функционируют в бактериальных клетках, другие - в дрожжевых.

3.2. Подбор эндонуклеаз рестрикции к плазмиде для вставки целевого гена

Чтобы подобрать эндонуклеазы рестрикции к целевому гену, нужно составить рестрикционный протокол и создать карту рестрикции.

Нуклеотидную последовательность гена каппа-казеина (**Приложение 1**) я нашел в генетической базе GenBank. На базе лаборатории, в которой в дальнейшем я выполнял практическую часть своей работы мне был предоставлен штамм бактерий **E.coli**. Плазида каждой бактерии содержала следующую нуклеотидную последовательность (**Приложение 2**). Из бактерий штамма *E. coli*, предоставленных в лаборатории, я выделил плазмиды (векторы) следующим способом:

1. Разрушение клеточной стенки с помощью лизоцима.
2. Лизис мембраны клетки-хозяина с помощью детергента SDS при pH среды 12,5.

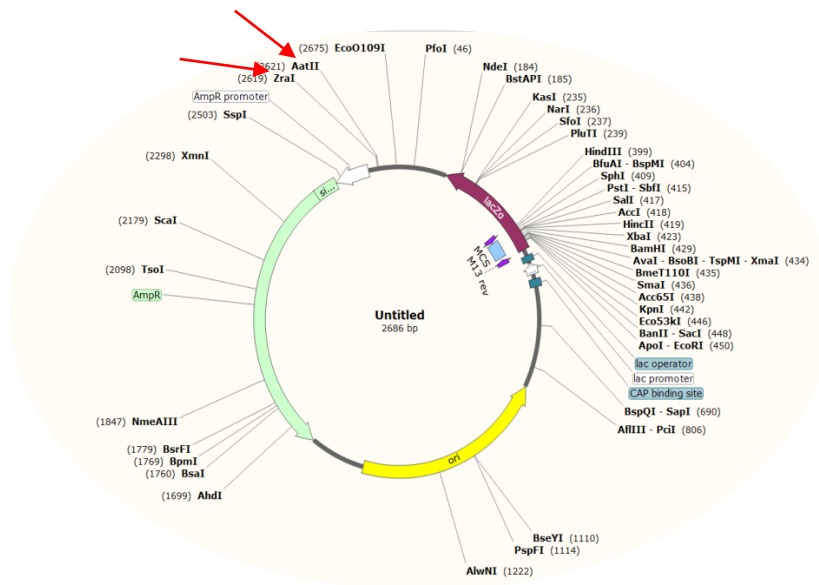
В этих условиях происходит фрагментация хромосомной ДНК, сопровождающаяся необратимой денатурацией и выделение плазмид.

*При оценке полученных результатов, на начальных этапах, в процессе вставки гена необходимо выбирать плазмиды с лактозным опероном, иначе плазида в дрожжах не будет продуцировать белок, так как данная структура является (**промотором, оператором, терминатором**) – необходимыми участками в процессе репликации ДНК.



Для моделирования результатов рестрикционного анализа и создания карты

рестрикции я использовал SnapGene – наукоемкую программу, созданную для облегчения и интенсификации исследований молекулярных биологов в области клонирования (**Приложение (3)**). Первым шагом я встроил в программу исходную плазмиду.



В результате чего получил множество рестриктаз, которые резали нуклеотидную последовательность в разных местах, образуя тупые и липкие концы. Для того чтобы определить две оптимальные эндонуклеазы рестрикции я провел работу для создания **рестрикционного протокола**:

ХОД РАБОТЫ:

1. На основании физической карты плазмиды выбрать пару рестриктаз (**важным критерием выбора рестриктаз является нахождение их не в промоторной области, а так же перед лактозным опероном, область вырезания не должна превышать 300 нуклеотидов (длина цепи ДНК плазмиды = 2868 нуклеотидов)**);
2. Выявить и сравнить условия их функционирования (температура, Буффер), подходящие для обеих рестриктаз;
3. Провести инкубацию 30 мин при оптимальной температуре расщепления для

конкретных ферментов и в подходящем для обоих рестриктаз;

4. Провести электрофорез гидролизованных образцов в геле агарозы вместе с маркерными ДНК для проверки функционирования выбранных рестриктаз.

Анализируя все предложенные к исходной плазмиде рестриктазы по параметрам подбора, самыми подходящими оказались **ZraI** и **AatII**.

Температура их функционирования = 37°C, Буффер функционирования обеих эндонуклеаз рестрикции - NEBuffer 4.

ZraI DNA Letter Codes

5'...GACGTC...3'
3'...CTGCAG...5'

Overhang Type: Blunt Palindromic Recognition Sequence: 6 bp

SibEnzyme

ZraI Buffer: Blue

Buffer:	B	G	O	W	Y
Activity:	100%	50-75%	25-50%	25-50%	75-100%

Incubation Temperature: 37°C Enzyme Website

Methylation Sensitivity
Dam: No Effect
Dcm: No Effect
EcoKI: No Effect

Same Recognition Sequence:
-- 1 Enzyme --

Compatible Sticky Ends:
-- None --

AatII DNA Letter Codes

5'...GACGTC...3'
3'...CTGCAG...5'

Overhang Type: 3' Palindromic Recognition Sequence: 6 bp

SibEnzyme

AatII Buffer: Yellow

Buffer:	B	G	O	W	Y
Activity:	10-25%	25-50%	10-25%	25-50%	100%

Incubation Temperature: 37°C Enzyme Website

Methylation Sensitivity
Dam: No Effect
Dcm: No Effect
EcoKI: No Effect

Same Recognition Sequence:
-- 1 Enzyme --

Compatible Sticky Ends:
-- 2 Enzymes --

Несмотря на то, что рестриктаза **ZraI** резала плазмиду, образуя тупой конец, рестриктаза **AatII** резала липким концом и была комплементарна концу целевого гена (вставки), поэтому смогла с легкостью присоединить его. Затем с одного конца гена CSN3 был присоединен, с помощью ДНК-лигазы, ген резистентности к тетрациклину tetR, для использования его в ходе селекции продуцентов. Тупой конец от **ZraI** так же смог присоединить ген tatR за счет лигирования белковыми ферментами лигазами.

3.3. Подбор праймеров для амплификации целевого гена

Для проведения всей практической части КубГАУ (Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина) предоставил мне возможность воспользоваться их высокотехнологичной лабораторией для проведения молекулярно-биологических манипуляций с целью разработки метода получения молочного белка каппа-казеина. В лаборатории в эппендорфах мне были предоставлены: ген коровьего белка каппа-казеина (CSN3), ген резистентности к тетрациклину (tetR), а также плазмиды бактерий *E. coli*.

Чтобы подобрать праймеры для амплификации целевого гена я использовал стандартный метод их обнаружения: создал сам по принципу комплиментарности и антипараллельности, опираясь на концы гена-вставки. Мой «ручной» метод оказался неэффективным, так как условия функционирования праймеров не совпадали: температура (**может отличаться на 4-5°C**), процентное содержание азотистых оснований GC не должно превышать **норму в 50-60%**. Несоответствие функционирования я выявил через программу.

Температура FORWARD 5'-GAATGTCACCTTTCCGGTTG -3' **57.94 °C**

Температура REVERSE 3'-ACGTAAACTAACCGAAATAA -5' **50.15 °C**

%GC REVERSE = **30%** (норма 50-60%)

Для дальнейшего нахождения праймеров и использования их в лаборатории, в частности для проведения ПЦР, мне понадобится программа UGENE – свободное биоинформационное программное обеспечение (**Приложение (4)**). Первым шагом я вставил в программу нуклеотидную последовательность целевого гена, UGENE выдал некоторое количество праймеров, которые могут отжигаться в разных участках ДНК. Параметры для выбора праймеров были следующие:

- 1) Размер праймера должен быть 16-25 нуклеотидов. Меньше 16-ти: слабая связь с целью.
- 2) Разница в температуре плавления праймеров - не более 4-5 °C.
- 3) Отсутствие внутренней вторичной структуры (праймеры не должны быть само- и взаимнокомплиментарными).
- 4) Праймеры не должны отжигаться на *E.coli*.
- 5) Процентное содержание азотистых оснований GC должно составлять 50-60%.

В программе по всем вышеперечисленным критериям я подобрал праймеры:

FORWARD 5'-CGGCATCAGAGCAGATTGTA-3'

REVERSE 3'-CTGGCGTAATAGCGAAGAGG-5'

Данные праймеры отождились в местах нахождения целевого гена каппа-казеина, и программа не обнаружила их отжига в местах ДНК ***E.coli*** (при вставлении в UGENE нуклеотидную последовательность исходной плазмиды), что позволяет в дальнейшем без трудностей производить ПЦР плазмиды с геном-вставки. **(Приложение (5))**. Найденные праймеры также были предоставлены в лаборатории, для последующей работы с целевым вектором.

3.4. Метод селекции для обнаружения целевого гена

Существует несколько методов для обнаружения вставки целевого гена в плазмиду:

1. С помощью гена устойчивости к антибиотику. Такой способ работает по следующему принципу: к целевому гену необходимо прикрепить ген резистентности к антибиотику, а затем ввести в питательную среду с бактериями *E.coli* антибиотик. Те бактерии, которые имеют плазмиды с геном устойчивым к антибиотику, а вместе с ним и геном каппа-казеина, будут выживать, все остальные, не имеющие в генетическом материале гена-вставки – будут погибать.
2. Другим методом скрининга плазмид, относительно новым, является способ качественного анализа при помощи зелёного флуоресцентного гена GFP, выделенный из медузы *Aequorea victoria*. Методом сборки генов Golden Gate можно одновременно вставить целевой ген и по краям от него маркеры GFP, которые при УФ излучении будут флуоресцировать (светиться).

3.4.1. Использование ПЦР и электрофорезного анализа в лаборатории

Самым проверенным и надежным способом скрининга плазмид на целевой ген является метод электрофорезного анализа гена в агарозном геле. Перед тем как использовать метод электрофореза, нужно провести ПЦР плазмид. Копии создавались по гену-вставке каппу-казеина, так как в дальнейшем анализе с помощью электрофореза на геледок-скане по маркеру искали последовательность каппа-казеина. Ген резистентности tetR не проходил стадии ПЦР и электрофореза.

Процесс ПЦР разделяют на следующие этапы, которые я выполнял на оборудовании в лаборатории:

1. Подготовка к ПЦР (**Приложение (6)**):
 - Нагревание колонии бактерий *E. coli* при температуре 100 °C .
 - Охлаждение в течение 3-х минут при температуре 7-10°C.
 - Перенос лизатной «колонии» пипеткой на колонки DNeasy Mini spin.
 - Центрифугирование на лабораторной центрифуге STEGLER CM-150 Micro (до 14 500 об/мин, 12×2 мл) при 14000 об./мин. В течение 2-х минут.
2. Проведение ПЦР (**Приложение (7)**). ПЦР проходит через следующие этапы:
 - Подготовить к работе Bio Rad thermal cycler c1000 touch открыть модуль для помещения в него пробирок с выделенным ДНК бактериальной плазмиды с предполагаемым целевым геном каппа-казеином. Закрыть модуль.

Принцип работы самого термоциклера ПЦР состоит из трех базовых этапов:

- Денатурация;
- Отжиг праймера;
- Элонгация.

Эти этапы повторяются N-ное количество раз (циклов), обычно от 20 до 50 циклов, в результате чего и происходит многократная наработка конечного продукта. Количество циклов определяется конкретными задачами и условиями ПЦР.

Денатурация

Денатурация (Denaturation) – это этап, на котором происходит разделение цепей матрицы и отделение ново синтезированной цепи от цепи матрицы.

Денатурация может быть термической («классический» ПЦР) и ферментативной (изотермический ПЦР).

Отжиг

Отжиг праймера (Annealing) – это ситуация, при которой праймер (нуклеотидный зонд) соединяется с комплементарным участком матрицы.

Условия отжига могут определяться температурными режимами или контролироваться ферментативно.

Элонгация

Элонгация (Extention) – этап, на котором фермент ДНК полимеразы выполняет свою непосредственную работу – достраивает комплементарную цепь, используя матрицу и отоженный на ней праймер.

В этапах ПЦР использовались найденные мной праймеры FORWARD и REVERSED, а также ДНК-полимераза, распознающая выбранные затравки.

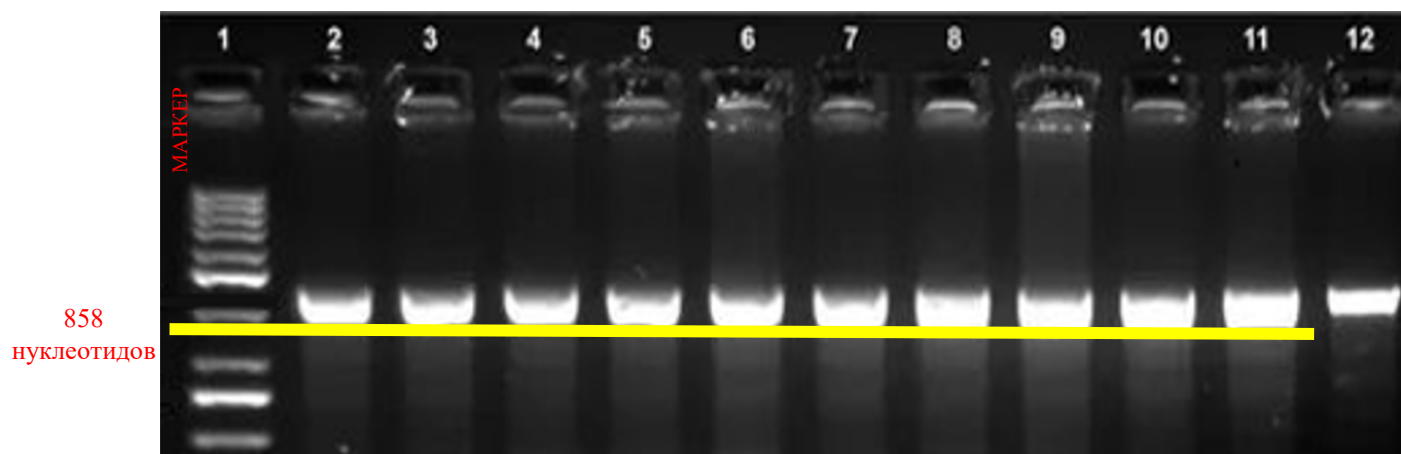
На ПЦР я наработал большое количество находящегося, предполагаемо, в скринингующихся плаزمидях гена каппа-казеина CSN3.

Следующая и последняя стадия — это электрофорез ПЦРных целевых генов (**Приложение (8)**). Электрофорез проводился на приборе системы гель-документирования BIORAD GelDoc Go.

Электрофорез позволяет разделить фрагменты ДНК по размеру. Образцы ДНК помещаются в лунки (углубления) на одном конце агарозного геля, затем через агарозный гель пропускается электрический ток. Фрагменты ДНК (ген CSN3) заряжены отрицательно, поэтому они движутся к положительному электроду. Легкие фрагменты ДНК продвигаются дальше, тяжелые фрагменты ДНК двигаются медленно, как правило, остаются рядом с лунками. Последним этапом по образовавшимся меткам за счет маркера сравнивают кол-во нуклеотидов, метка маркера и метка, образовавшаяся при

электрофорезе. *Размер гена каппа-казеина = 858 нуклеотидов.

Результат электрофореза на приборе системы гель-документирования
BIORAD GelDoc Go:



3.5. Внедрение плазмиды с целевым геном в дрожжи и получение готовой продукции.

Для внедрения плазмид с геном-вставкой CSN 3 в дрожжи применяется метод электропорации – создание среды с определенным электрическим полем с целью повышения проницаемости клеточной мембраны. Для вставки целевых векторов с помощью электропоратора необходимо выполнить следующий ряд действий:

1. Промывка клеток дрожжей в одном объёме 30 °C 0,1 M LiAc/10mM DTT.
2. Промывка клеток дрожжей во втором объёме холодного 1 M сорбита/1 mM CaCl₂.
3. Рессундирование клеток дрожжей в третьем объёме холодного 1M сорбита/1 mM CaCl₂ для формирования суспензии клеток дрожжей для электропорации.
4. Добавление части суспензии клеток дрожжей для электропорации к осадку ДНК для формирования суспензии клеток дрожжей — ДНК для электропорации.
5. Электропорация суспензии клеток дрожжей — ДНК в диапазоне от приблизительно 0,5 кВ до приблизительно 2,5 кВ и при ёмкости 25 мкФ.
6. Добавление смеси 1:1 1 M сорбита/YPD (конечная концентрация: 0,5 M сорбит, 0,5 × YPD) к подвергнутой электропорации суспензии клеток дрожжей — ДНК и инкубация при 30 °C в течение 1 часа.
7. Осаждение клеток дрожжей и ресуспендирование в 10 мл 1 M сорбита.

После вставки плазмиды с целевым геном в дрожжи необходимо выполнить скрининг. Для этого нужно посеять на среду дрожжи с геном-вставкой и обработать колонии тетрациклином. Те дрожжи, в которые вставка вектора с CSN 3 и геном резистентности к тетрациклину tetR прошла успешно, будут размножаться, остальные колонии погибнут.

После обработки колоний антибиотиком и получение выживших организмов с геном-вставкой необходимо промыть среду от тетрациклина для дальнейшей культивирования дрожжей и получения чистого белка.

Способ промывания среды с дрожжами от тетрациклина:

- Обработать солью кальция (например, хлористым кальцием) при pH около 3,1–3,4.
- Промыть водой при pH около 3,0.

Дрожжи с внедренной плазмидой, содержащей целевой ген, необходимо выращивать на среде, содержащей:

- Осветлённый раствор мелассы (источник сахаров).
- Соли, содержащие фосфор и азот, добавляют исходя из того, что готовая продукция должна содержать 6–7% азота и 3,6–4,4% P₂O₅ в пересчёте на сухие вещества дрожжей.
- Ростовые вещества и витамины: биотин, а также кукурузный экстракт, в качестве источника стимуляторов роста.

Следует поддерживать pH среду, дрожжи предпочитают слегка кислую среду, а оптимальные значения pH находятся в интервале 4,5 - 5,5.

Важно, создать температуру благоприятную для дрожжей, которая варьируется от 25 до 35°C, и инкубировать их в термостате на средах.

Дрожжи размножаются почкованием, поэтому поколение растёт в арифметической прогрессии. При делении одна клетка способна создавать от 20 до 25 новых клеток, что является отличным показателем при синтезе белка в больших количествах.

Способ получения сухой продукции (белка) из дрожжей:

1. Подготовить питательную среду: в воде растворить углеродсодержащий и азотсодержащий компоненты, минеральные соли.
2. Внести посевную культуру дрожжей.
3. Ввести хлорид натрия для расщепления нуклеиновых кислот и получения белкового препарата.

4. После расщепления нуклеаз раствор центрифугировать в течение 3 минут при 3000 оборотов в минуту. В результате центрифугирования отделяется культуральная жидкость и белковый продукт.
5. Отделить культуральную жидкость и ввести ферменты протосубтилин, папаин и бромелайн в соотношении от 2–4% к получившейся массе белкового препарата.
6. Оставить субстанцию в термостате при температуре 40 °С на 24 часа.
7. Вынуть рекомбинантный белок и направить на сушку в сушильный шкаф при температуре 60–65 °С.
8. После сушки измельчить микробный белок в порошкообразное состояние.

Опираясь на практические результаты, с помощью математических подсчетов были выведены следующие результаты получения готовой сухой массы каппа-казеина из молока и с помощью молекулярного клонирования из дрожжей. Из 1 литра 3,2% коровьего молока чистый выход белка = 7 г. В случае с лабораторно-промышленным способом из 1 кг колоний на питательной среде чистый выход белка = 50 г. Такие показатели подтверждают выгодность и количественное превосходство лабораторного способа получения каппа-казеина над традиционным.

3.6. Результаты практической части

Для достижения поставленной цели мною была разработана методика получения белка каппа-казеина (CSN3) с помощью продуцентов. Она состоит из следующих этапов:

1. Использование плазмиды бактерий *E. coli*, так как их генетический материал изучен и легок в манипуляциях в микробиологических процессах, для внедрения в него гена-вставки каппа-казеина (CSN3).
2. Выделение вектора из бактерии путем разрушения ее клеточной стенки.
3. Подбор эндонуклеазы рестрикции для линерализации плазмиды.
4. Соединение гена-вставки и гена устойчивости к антибиотику (один из вариантов дальнейшего скрининга на целевой ген).
5. Модифицирование свободных концов плазмиды, гена-вставки и скрининг-гена на липкие концы, под действием ДНК-лигаз.
6. Вставка гена в целевой вектор.
7. Проведение скрининга на успешную вставку целевого гена в бактериальный вектор с помощью ПЦР (создание копий целевых векторов) и электрофореза (нахождение гена-вставки).
8. При успешном внедрении гена в плазмиду, вставка (трансформация) целевого вектора в продуцент с помощью электропорации.
9. Посев колоний продуцента на среду с последующей обработкой антибиотиком и выявление организмов без целевого гена.
10. Помещение продуцента на питательную среду, для его размножения и синтеза белка.
11. Выделение белка с помощью сушки (тепловой обработки), очистки и получение сухой продукции.

4. Заключение

В ходе научно-практической работы я решил главную задачу моего проекта, а именно: проблему биотехнологического производства молочного белка каппа-казеина CSN3. На протяжении всей практической части мной были выполнены следующие задачи:

- 1) Предложен инновационный метод наработки каппа-казеина при помощи челночных плазмид.
- 2) Произведен подбор продуцентов, оптимальных для синтеза каппа-казеина
- 3) Предложен метод скрининга плазмид на целевой ген с помощью гена резистентности к тетрациклину tetR.
- 4) В лабораторных условиях проведен ПЦР и электрофорез для анализа генетического материала с геном каппа-казеина.
- 5) Разработана схема малозатратного и перспективного в биотехнологической промышленности способа выделения максимального количества белка из дрожжей и применения разработанного метода челночных плазмид.

По разработанной мною биотехнологической методике производства молочного белка каппа-казеина CSN 3, можно синтезировать белок в промышленных масштабах. Полученный продукт может не только способствовать улучшению качества и удешевления продуктов питания, но и удовлетворять запрос клиентов с особыми требованиями. Например, за счёт благоприятных модификаций аминокислотной последовательности можно сделать продукт менее аллергенным, а также восполнить дефицит медикаментов, основным компонентом которых является каппа-казеина, для медицинских учреждений. Кроме того, использование моей методики кажется привлекательным с точки зрения ресурсосбережения и рационального природопользования, например, за счет уменьшения углеродного следа от животноводства.

5. Приложения.

Приложение (1) Дополнительный файл 1 (нуклеотидная последовательность гена каппа-казеина)



Приложение (2) Дополнительный файл 2 (нуклеотидная последовательность штамма бактерий E. coli. без гена-вставки)



Приложение (3) SnapGene - наукоемкая программа, созданная для облегчения и интенсификации исследований молекулярных биологов в области клонирования.



Приложение (4) UGENE - это свободное ПО для работы молекулярного биолога.



Приложение (5). Протокол отжига праймера на целевом гене CSN3, встроенном в плазмиду, и протокол отсутствия отжига праймера на ДНК плазмиды E. coli.

ДНК плазмиды бактерии E.coli:

Отчёт выполнения задачи - In Silico PCR

Статус

Время выполнения

Products found: 0

Завершена

0h 00m 00.005s

Информация о праймерах:

Критерий	Допустимые значения	Прямой	Обратный
% GC	50-60	50	55
Tm (°C)	55-80	57.77	58.23
GC Clamp	>=1 G or C at 3' end	1	3
Runs	<=4 base runs	2	2

Ген CSN3 (каппа-казеин):

Отчёт выполнения задачи - In Silico PCR

Статус

Время выполнения

Products found: 1

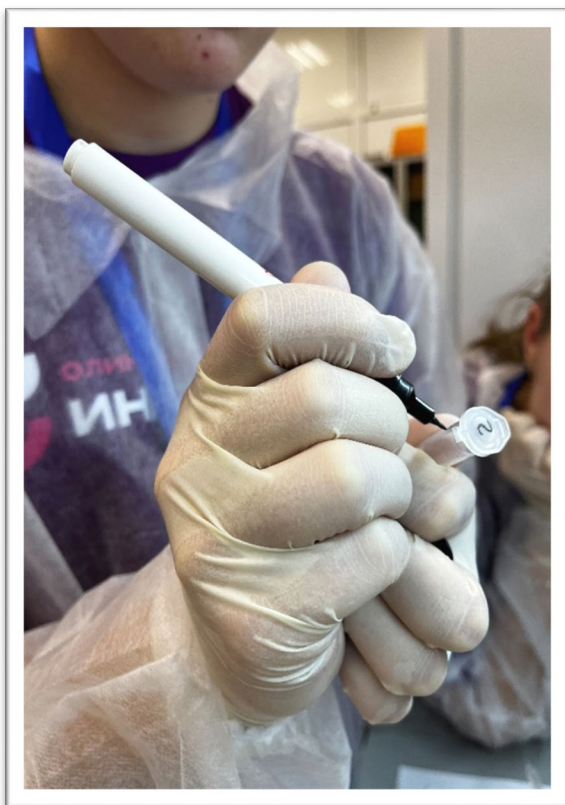
Завершена

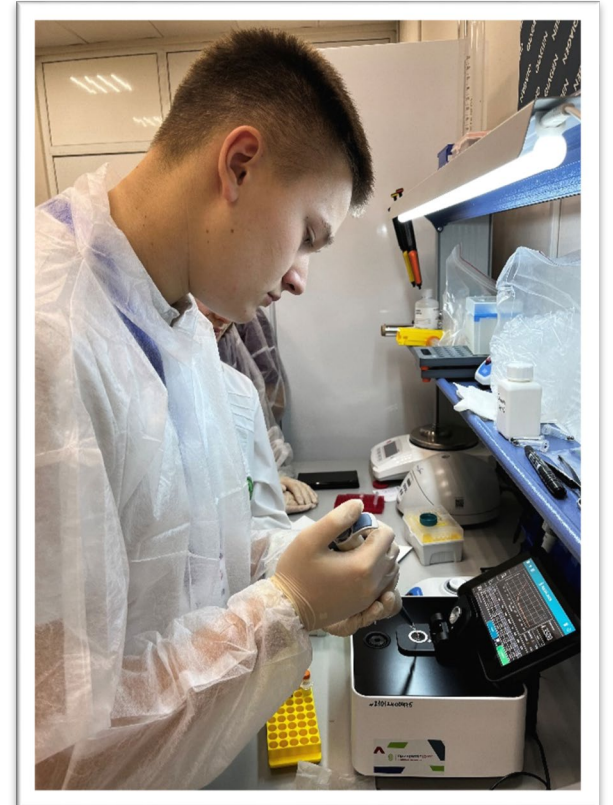
0h 00m 00.286s

Информация о праймерах:

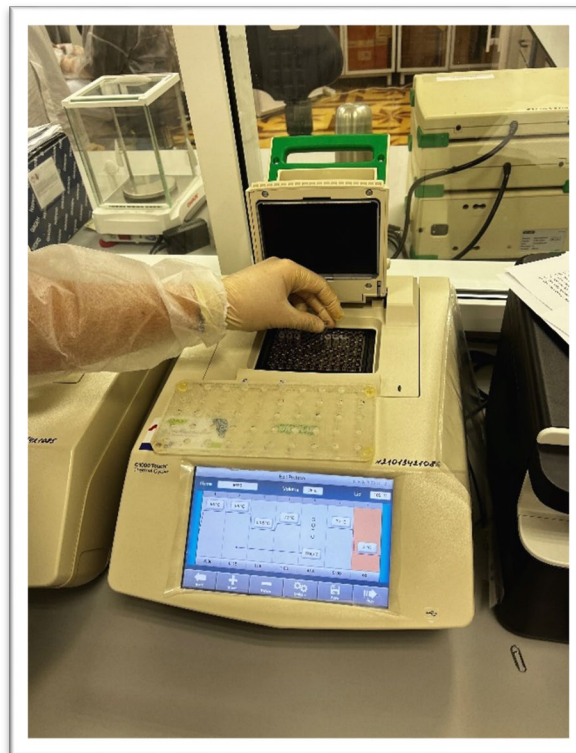
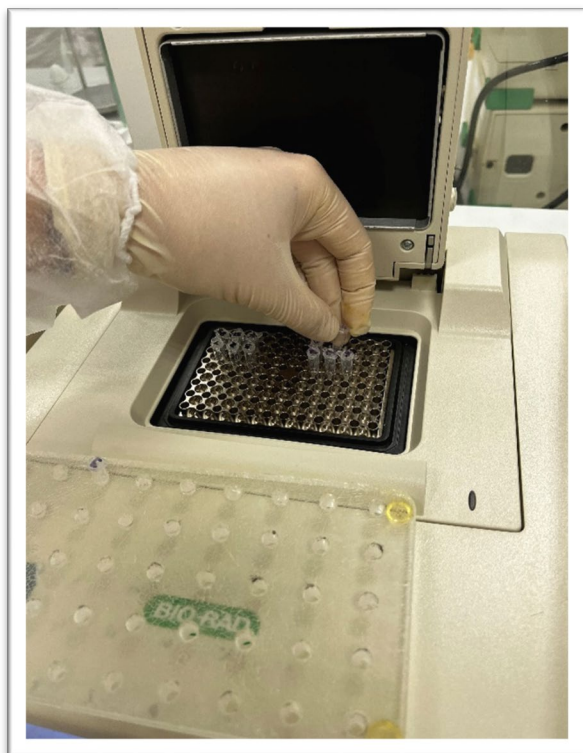
Критерий	Допустимые значения	Прямой	Обратный
% GC	50-60	50	55
Tm (°C)	55-80	57.77	58.23
GC Clamp	>=1 G or C at 3' end	1	3
Runs	<=4 base runs	2	2

Приложение (6) Подготовка к ПЦР.

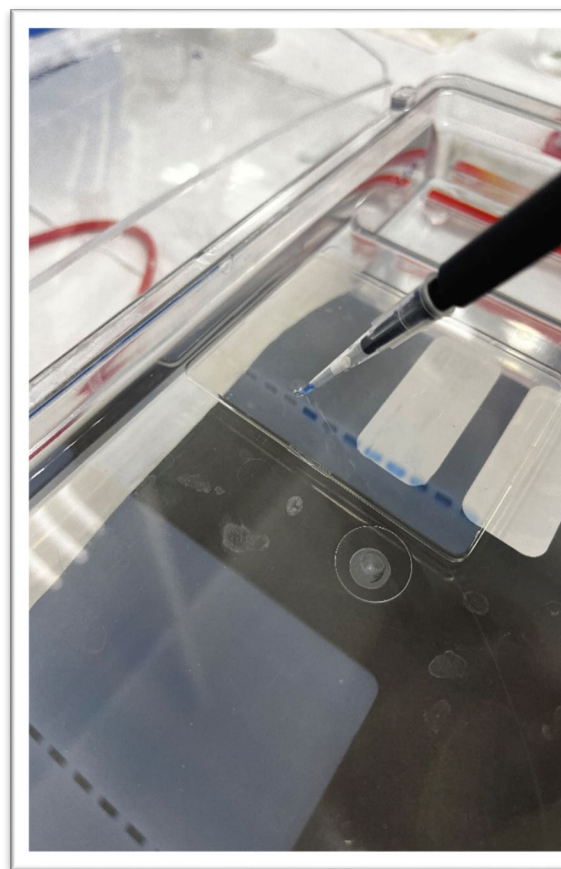
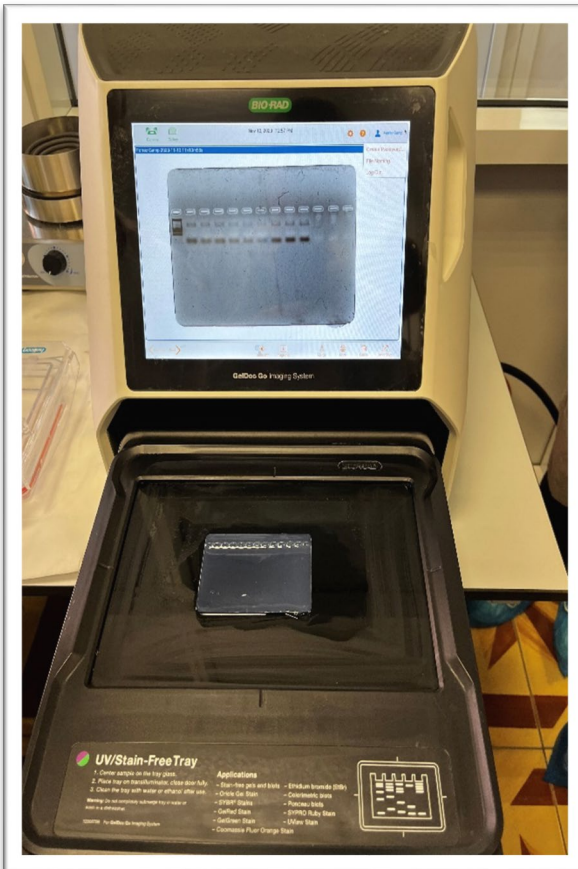
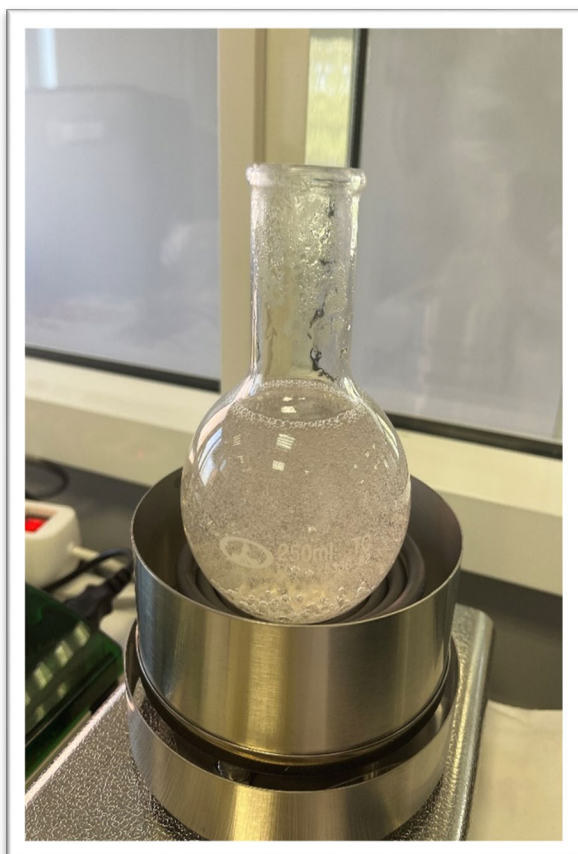


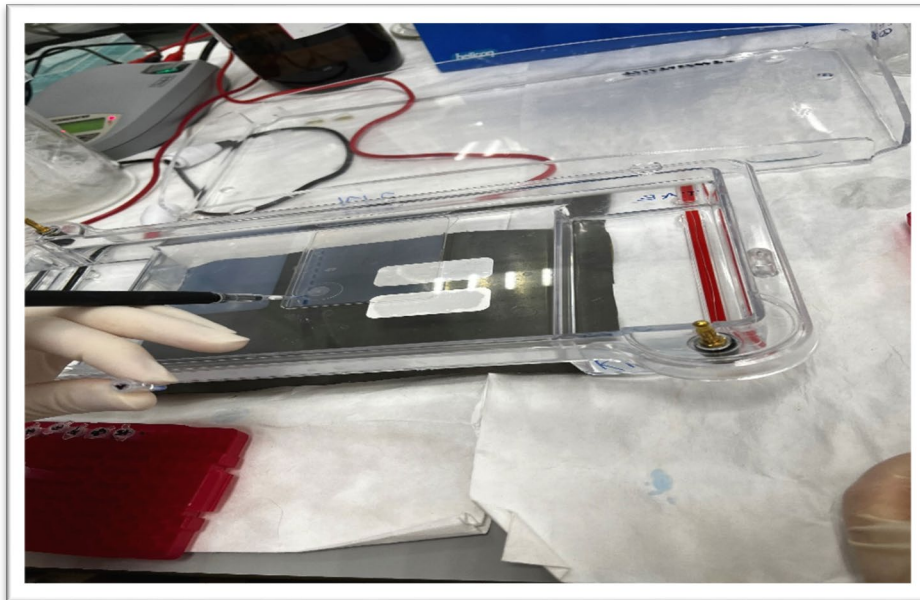
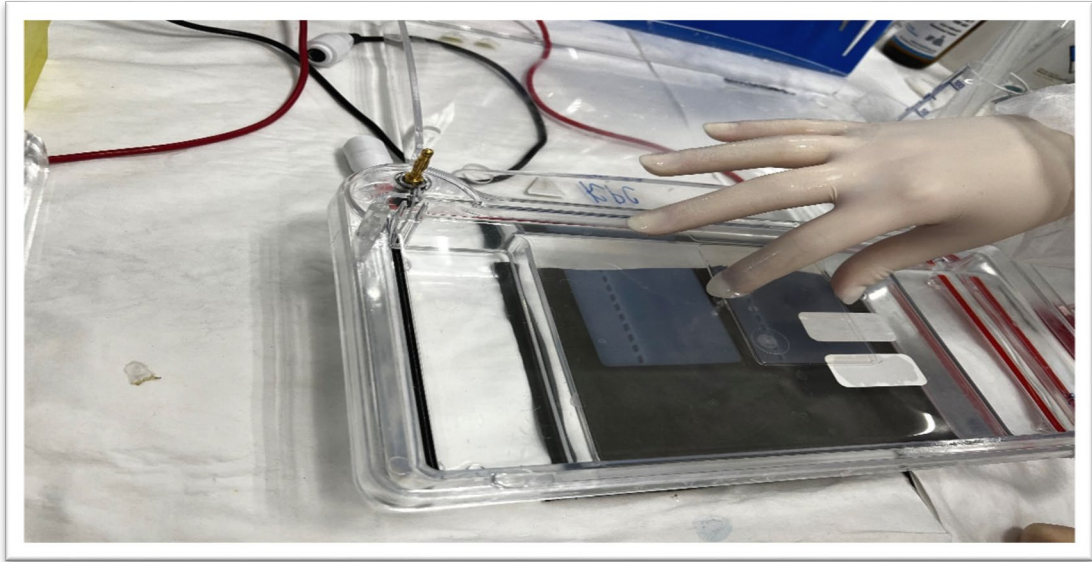


Приложение (7). Проведение ПЦР.



Приложение (8). Проведение электрофореза.






Приложение (9)

ОТЗЫВ НАСТАВНИКА на работу в лаборатории молекулярной биологии на базе Кубанского государственного аграрного университета им. И. Т. Трубилина ученика

Вишленкова Максима Андреевича
<i>Фамилия, имя, отчество студента</i>
Тема работы: «Создание рекомбинантных организмов для получения белка каппа-казеина»
При работе Вишленков М.А. показал высокий уровень ответственности и самостоятельности, готовность постоянно совершенствоваться и приобретать новые знания. Кроме этого, Максим Андреевич продемонстрировал умение координировать свою работу в условиях лабораторной работы. Максим Андреевич показал высокий уровень знаний в области молекулярной биологии, умение работать с научными источниками и представлять найденную информацию. В работе Максима Андреевича можно охарактеризовать как целеустремленного ученика.

Наставник:

М.н.с. кафедры биофизики, ИББМ
ННГУ им. Н.И. Лобачевского
Г. Нижний Новгород



Крылова Л.В.

« 19 » марта 2024 г.

6. Источники информации

1. James Watson, et al. "Molecular Biology of the Gene". - 2 изд. - Нью-Йорк: W. A. Benjamin, 1970. - 692 с.
2. Sambrook and Russell "Molecular cloning : a laboratory manual". - Нью - Йорк: Колд - Спринг - Харбор, Нью - Йорк : Лаборатория Колд - Спринг - Харбор, 1989. - 632 с.
3. Экспрессия рекомбинантных белков в E.coli: учеб. пособие / Р.Ф. Хайруллин, Р.Г. Киямова, А.А. Ризванов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2018. – 142 с.
4. S. B. Primrose and R. W. Twyman "Principles of gene manipulation and genomics". - Oxford: Malden, MA ; Oxford : Blackwell Pub., 2006. - 676 с.
5. <https://biomolecula.ru/articles/molekuliarnoe-klonirovanie-ili-kak-zasunut-v-kletku-chuzherodnyi-geneticheskii-material>
6. <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-genov-kappa-kazeina-i-laktoglobulina-na-molochnuyu-produktivnost-korov-i-belkovyy-sostav-moloka-obzor>
7. https://portal.tpu.ru/SHARED/a/ALLYSY/academic/Tab4/pr10_dr.pdf
8. https://wiki5.ru/wiki/Golden_Gate_Cloning
9. https://kpfu.ru/staff_files/F1460829242/Ekspressiya_rekombinantnykh_belkov_Khairullin_RF.pdf
10. <https://cyberleninka.ru/article/n/geneticheski-modifitsirovannye-rasteniya-produtsenty-rekombinantnyh-belkov-medsinskogo-naznacheniya>

Фамилия И.О. Виниленков М.А.
 Город Дзержинск
 Школа МБОУ СШ №23 с УИОП

Шифр

Шифр

ЛИСТ ОТВЕТОВ
 на задания теоретического тура олимпиады школьников
 г. Саров 2025 г.

Внимание! Образец заполнения матрицы:

Правильный ответ	×	Отмена ответа	⊗	Отмена исправления	■
------------------	---	---------------	---	--------------------	---

Задание А. Один правильный ответ (максимально 60 баллов)

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
а												×								
б				×				×	×											×
в	×	×	×		×	×					×		×		×	×	×	×	×	
г							×			×				×						

№	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
а						×				×	×								×	
б				×								×	×			×	×	×		
в					×		×		×					×	×					×
г	×	×	×					×												

№	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
а	×					×	×						×			×				
б		×										×					×			×
в			×	×	×			×	×	×	×			×	×			×		
г																			×	

53

Задание Б. Множественные ответы (максимально 30 баллов)

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
а	×				×				×	×		×		×		×	×	×		×
б			×	×	×	×	×		×	×	×	×		×					×	×
в		×		×				×			×					×	×	×	×	
г	×	×	×			×	×						×		×	×				×
д	×	×	×			×	×	×				×	×		×			×		
е				×	×			×	×	×	×		×	×	×		×		×	

25,5

Задание В. Суждения (максимально 10 баллов)

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ДА			×	×	×		×			×
НЕТ	×	×				×		×	×	

8

Максимальное количество баллов – 100

ИТОГО: 86,5