

**Министерство образования и науки Российской Федерации**  
 федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
 высшего образования  
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
 ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Школа Инженерная школа новых производственных технологий  
 Направление подготовки 19.04.01 Биотехнология  
 Отделение школы (НОЦ) НОЦ Н.М. Кижнера

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

| Тема работы  |
|--|
| <b>Выбор экспрессионного вектора для получения рекомбинантного пептида рНЛIP в клетках <i>E.coli</i></b> |

УДК 577.216:579.252.5

Студент

| Группа | ФИО                   | Подпись | Дата       |
|--------|-----------------------|---------|------------|
| 4ДМ61  | Кабдеш Ильяс Мурагулы |         | 04.06.2018 |

Руководитель ВКР

| Должность     | ФИО          | Ученая степень, звание | Подпись | Дата       |
|---------------|--------------|------------------------|---------|------------|
| Доцент ИШХБМТ | Першина А.Г. | к.б.н., доцент         |         | 04.06.2018 |

**КОНСУЛЬТАНТЫ:**

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

| Должность   | ФИО            | Ученая степень, звание | Подпись | Дата       |
|---|----------------|------------------------|---------|------------|
| Доцент Отделения социально-гуманитарных наук ШБИП | Креницына З.В. | к.т.н., доцент         |         | 14.05.2018 |

По разделу «Социальная ответственность»

| Должность  | ФИО             | Ученая степень, звание | Подпись | Дата     |
|--|-----------------|------------------------|---------|----------|
| Профессор Отделения контроля и диагностики ИШНКБ | Ахмеджанов Р.Р. | д.б.н., профессор      |         | 05.05.18 |

**ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:**

| Руководитель ООП           | ФИО          | Ученая степень, звание | Подпись | Дата    |
|----------------------------|--------------|------------------------|---------|---------|
| Профессор НОЦ Н.М. Кижнера | Потапов А.С. | д.х.н., профессор      |         | 4.06.18 |

Томск – 2018 г.

Планируемые результаты обучения  
по ООП 19.04.01 «Биотехнология» (магистр)  
профиль «Биотехнология»

| Код<br>результата                          | Результат обучения<br>(выпускник должен быть готов)   |
|--|---|
| <b><i>Профессиональные компетенции</i></b> |   |
| P1   | Профессионально эксплуатировать современные биотехнологические производства, обеспечивая их высокую эффективность и безопасность                                |
| P2   | Разрабатывать и внедрять новые биотехнологические процессы и оборудование в рамках проектирования новых и усовершенствования действующих производств            |
| P3   | Проводить теоретические и экспериментальные исследования в различных областях прикладной биотехнологии  |
| <b><i>Универсальные компетенции</i></b>    |   |
| P4   | Ставить и решать задачи инженерного анализа для создания инновационных биотехнологических процессов и продуктов   |
| P5   | Эффективно организовывать и участвовать в работе коллективов, в том числе международных, демонстрировать ответственность за результаты инженерной деятельности  |
| P6   | Демонстрировать глубокие знания социальных, этических и правовых аспектов инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах устойчивого развития |
| P7   | Постоянно повышать интеллектуальный и общекультурный уровень и профессиональную квалификацию, способствовать обучению персонала                                 |

Министерство образования и науки Российской Федерации  
федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Школа Инженерная школа новых производственных технологий  
Направление подготовки (специальность) Биотехнология  
Отделение школы (НОЦ) НОЦ Н.М. Кижнера

УТВЕРЖДАЮ:  
Руководитель ООП  
*Мерембаев*  
(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

**ЗАДАНИЕ**

**на выполнение выпускной квалификационной работы**

В форме:

Магистерской диссертации

(бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)

Студенту:

| Группа | ФИО                    |
|--------|------------------------|
| 4ДМ61  | Кабдеш Ильясу Муратулы |

Тема работы:

Выбор экспрессионного вектора для получения рекомбинантного пептида рНЛР в клетках *E. coli*

Утверждена приказом директора (дата, номер)

Приказ № 1531/с от 06.03.2018

Срок сдачи студентом выполненной работы:

**ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:**

**Исходные данные к работе**

(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).

**Объект исследования:**

Рекомбинантная технология получения рН-зависимого пептида в бактериальной системе экспрессии

**Литературные данные:**

Статьи и книги по рекомбинантным технологиям получения белков и пептидов, их очистке и анализу

|  |  |
|--|--|
| <p><b>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</b></p> <p><i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i></p> | <p>Анализ литературных источников;</p> <p>Осуществление комплекса биохимических и молекулярно-биологических методик для выполнения исследования;</p> <p>Анализ результатов проведённой работы;</p> <p>Анализ экономической эффективности и ресурсоэффективности разрабатываемой технологии;</p> <p>Анализ вредных и опасных факторов при проведении исследований, составление перечня для их регулирования;</p> <p>Формулировка выводов и заключений по работе</p> |
| <p><b>Перечень графического материала</b></p> <p><i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i></p>   | <p>22 рисунка, 30 таблиц</p>   |
| <p><b>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</b></p> <p><i>(с указанием разделов)</i></p>  |  |
| <p><b>Раздел</b></p>   | <p><b>Консультант</b></p>  |
| <p>Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение</p>   | <p>Криницына Зоя Васильевна</p>  |
| <p>Социальная ответственность</p>  | <p>Ахмеджанов Рафик Равильевич</p>   |
| <p>Часть ВКР на английском языке</p>   | <p>Кобзева Надежда Александровна</p>   |
| <p><b>Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:</b></p>   |  |
| <p>Обзор литературы</p>  |  |

|  |                   |
|--|-------------------|
| <p><b>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</b></p> | <p>12.03.2018</p> |
|--|-------------------|

|   |                     |                               |   |                 |
|---|---------------------|-------------------------------|---|-----------------|
| <p><b>Задание выдал руководитель:</b></p> |                     |                               |   |                 |
| <p>Должность</p>                          | <p>ФИО</p>          | <p>Ученая степень, звание</p> | <p>Подпись</p>  | <p>Дата</p>     |
| <p>Доцент ИШХБМТ</p>                      | <p>Першина А.Г.</p> | <p>к.б.н., доцент</p>         |  | <p>12.03.18</p> |

|  |                              |   |                 |
|--|------------------------------|---|-----------------|
| <p><b>Задание принял к исполнению студент:</b></p> |                              |   |                 |
| <p>Группа</p>                                      | <p>ФИО</p>                   | <p>Подпись</p>  | <p>Дата</p>     |
| <p>4ДМ61</p>                                       | <p>Кабдеш Ильяс Муратулы</p> |  | <p>12.03.18</p> |

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА  
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И  
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

|        |                        |
|--------|------------------------|
| Группа | ФИО                    |
| 4ДМ61  | Кабдеш Ильясу Муратулы |

|                     |  |                           |  |
|---------------------|--|---------------------------|--|
| Школа               | Инженерная школа новых производственных технологий | Отделение школы (НОЦ)     | Научно-образовательный центр Н.М.Кижнера |
| Уровень образования | магистр  | Направление/специальность | 19.04.01 Биотехнология                   |

**Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:**

|  |   |
|--|---|
| 1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих | Оценить стоимости материально-технических ресурсов для получения рекомбинантного рН-зависимого встраивающегося пептида рНLIP для диагностики опухолей |
| 2. Нормы и нормативы расходования ресурсов   | В соответствии с ГОСТ 14.322-83 «Нормирование расхода материалов» и ГОСТ Р 51541-99 «Энергосбережение. Энергетическая эффективность»                  |

**Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:**

|   |  |
|---|--|
| 1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ   | Оценить коммерческий и инновационный потенциал технологии получения рекомбинантного рН-зависимого пептида рНLIP для его последующего применения в диагностике опухолей и адресной доставке |
| 2. Разработка устава научно-технического проекта  | 2.1. Устав проекта<br>2.2. Организационная структура проекта<br>2.3 Ограничения и допущения проекта  |
| 3. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок | 3.1 Формирование бюджета научного исследования<br>3.2 Организационная структура проекта<br>3.3 Матрица ответственности<br>3.4 Оценка рисков проекта  |
| 4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности   | 4.1 Оценка сравнительной эффективности исследования  |

**Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):**

1. Сегментирование рынка
2. Диаграмма Ганта
3. Диаграмма Исикавы
4. Организационная структура проекта

|  |            |
|--|------------|
| Дата выдачи задания для раздела по линейному графику | 18.03.2018 |
|--|------------|

**Задание выдал консультант:**

|  |                          |                        |         |            |
|--|--------------------------|------------------------|---------|------------|
| Должность  | ФИО                      | Ученая степень, звание | Подпись | Дата       |
| Доцент Отделения социально- гуманитарных наук ШБИП | Криницына Зоя Васильевна | к.т.н., доцент         |         | 18.03.2018 |

**Задание принял к исполнению студент:**

|        |                        |         |            |
|--------|------------------------|---------|------------|
| Группа | ФИО                    | Подпись | Дата       |
| 4ДМ61  | Кабдеш Ильясу Муратулы |         | 18.03.2018 |

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА  
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

|               |                        |
|---------------|------------------------|
| <b>Группа</b> | <b>ФИО</b>             |
| 4ДМ61         | Кабдеш Ильясу Муратулы |

|                     |              |                      |                         |
|---------------------|--------------|----------------------|-------------------------|
| <b>Школа</b>        | <b>ИШНПТ</b> | <b>Подразделение</b> | <b>НОЦ Н.М. Кижнера</b> |
| Уровень образования | магистратура | Направление          | 19.04.01 Биотехнология  |

**Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:**

|   |   |
|---|---|
| <p>1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения</p> | <p><i>Объектом исследования является методика получения рекомбинантного рН-зависимого пептида для последующего использования для диагностики злокачественных опухолей. Рабочая зона, в которой осуществляется исследование, представлена восемью отдельными вентилируемыми кабинетами с возможностью их обеззараживания при помощи ультрафиолета.</i></p> |
|---|---|

**Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:**

|   |  |
|---|--|
| <p><b>1. Производственная безопасность</b></p> <p>1.1. Анализ выявленных вредных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения в следующей последовательности:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– физико-химическая природа вредности, её связь с разрабатываемой темой;</li> <li>– действие фактора на организм человека;</li> <li>– приведение допустимых норм с необходимой размерностью (со ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ);</li> <li>– предлагаемые средства защиты;</li> <li>– (сначала коллективной защиты, затем – индивидуальные защитные средства).</li> </ul> <p>1.2. Анализ выявленных опасных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения в следующей последовательности:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– механические опасности (источники, средства защиты);</li> <li>– термические опасности (источники, средства защиты);</li> <li>– электробезопасность (в т.ч. статическое электричество, молниезащита – источники, средства защиты)</li> </ul> | <p><i>Характеристика вредных факторов:</i></p> <p><b>1. Биологические:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- физико-химическая природа вредности, её связь с разрабатываемой темой: работа с условно-патогенными микроорганизмами: <i>E.coli</i> в соответствии с ГОСТ 12.1.008-76 «ССБТ. Биологическая безопасность. Общие требования»;</li> <li>- действие фактора на организм человека: инфицирование человека;</li> <li>- рекомендуемые средства защиты - система фильтрации, работа в ламинарном боксе при горячей спиртовке с использованием средств индивидуальной защиты;</li> </ul> <p><b>2. Вредные вещества:</b> кислоты (соляная кислота HCl, муравьиная кислота HCOOH, ледяная уксусная кислота CH<sub>3</sub>COOH)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- работа с токсичными, летучими и легковоспламеняющимися веществами 3 и 4 класса опасности;</li> <li>- действие фактора на организм человека: раздражение дыхательных путей и слизистой, угнетение ЦНС, раздражение кожных покровов;</li> <li>- приведение допустимых норм для рабочей зоны с необходимой размерностью: этанол - 1000 мг/м<sup>3</sup>, изопропиловый спирт - 10 мг/м<sup>3</sup>, (ГОСТ 12.1.007–76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности);</li> <li>- рекомендуемые средства защиты (система вентиляции, работа в вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты);</li> </ul> <p><b>3. Недостаточная освещенность:</b></p> |
|---|--|

- действие фактора на организм человека: снижение зрительной функции, повышение уровня утомляемости;

- приведение допустимых норм рабочей зоны с необходимой размерностью: КЕО при естественном освещении - 1,2 %, КЕО при совмещенном освещении - 2,1 %, освещенность при искусственном комбинированном освещении - 500 лк, при общем освещении - 400 лк (СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий);

- рекомендуемые средства защиты (наличие остекленных оконных проемов, люминесцентных ламп дневного освещения; проведение очистки стекол оконных рам и светильников два раза в год и своевременная замена перегоревших ламп);

4. Микроклимат помещений:

- лаборатория оборудована системами отопления, кондиционирования воздуха или эффективной приточно-вытяжной вентиляцией;

- действие фактора на организм человека: системы вентиляции и отопления в лабораторном помещении обеспечивают параметры микроклимата в соответствии с требованиями;

- приведение допустимых норм рабочей зоны с необходимой размерностью: температура воздуха в холодный период года - 19-24 °С, температура воздуха в теплый период года - 20-28 °С, относительная влажность воздуха - 15-75 % (СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений);

- рекомендуемые средства защиты - установка, диагностика и ремонт системы вентиляции и отопления.

Анализ **опасных** факторов при выполнении исследования:

- термические опасности:

- в лаборатории источниками термических ожогов являются: горелки, спички, электрическая плитка, паровой автоклав, неосторожное обращение с кипящей жидкостью (питательная среда, вода).

Меры защиты

- при нагревании жидкостей необходимо использовать дополнительные средства защиты: перчатки с термозащитой;

- перед зажиганием спиртовки нужно удостовериться, что корпус ее исправен, фитиль выпущен на нужную высоту и

|  |   |
|--|---|
|  | <p><i>распущен, а горловина и держатель фитиля сухие. (Инструкция по охране труда при работе в химической лаборатории ИОТ-003-10).</i></p> <p>- электроопасность, в т.ч. статическое электричество:</p> <p>– поражение человека электрическим током возможно лишь при замыкании электрической цепи.</p> <p>- пожаровзрывоопасность:</p> <p>- разлив легко воспламеняющейся жидкости изобутанол, ацетон</p> <p><i>Меры защиты при использовании легко воспламеняющихся жидкостей:</i></p> <p>- использовать отдаленно от нагревательных приборов и открытого огня.</p>   |
| <p><b>2. Экологическая безопасность:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– защита селитебной зоны</li> <li>– анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы);</li> <li>– анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы);</li> <li>– анализ воздействия объекта на литосферу (отходы);</li> <li>– разработать решения по обеспечению экологической безопасности со ссылками на НТД по охране окружающей среды.</li> </ul> | <p><i>Экологическая безопасность:</i></p> <p>- анализ воздействия объекта на окружающую среду: <i>E.coli</i> являются естественными обитателями кишечника;</p> <p>- с целью охраны атмосферы все работы должны проводиться в вытяжном шкафу при включенной вентиляции и обеспечении герметичности тары для хранения и транспортировки вредных и опасных веществ;</p> <p>- для предотвращения загрязнения гидросферы химическими веществами проводится организации раздельного сбора и хранения неорганических и органических отходов, обезвреживание кислых и щелочных стоков согласно утвержденным инструкциям, регенерация растворителей;</p> <p>- твердые отходы в виде отработанного биоматериала подлежат обезвреживанию методом стерилизации, после чего они приравниваются пищевым отходам, и выбрасываются в мусорный контейнер.</p> <p><i>(Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08. Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней).</i></p> |

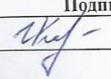
|  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий.</li> </ul>  | <p>2) Взрыв;</p> <p><i>Превентивные меры по предупреждению ЧС:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- инструктаж по технике безопасности;</li> <li>- своевременная поверка и калибровка оборудования;</li> <li>- текущее обслуживание оборудования;</li> <li>- контроль работы оборудования.</li> </ul> <p><i>Разработка действий в результате возникшей ЧС и ликвидация ее последствий:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ликвидация ЧС с использованием первичных средств пожаротушения: огнетушитель ОП-5 для тушения электрооборудования и горючих жидкостей.</li> </ul>  |
| <p><b>4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства;</li> <li>- организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- специальные правовые нормы трудового законодательства: "Трудовой кодекс Российской Федерации" от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 30.12.2015), "Р 2.2.2006-05. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда", Российская энциклопедия по охране труда: В 3 т. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во НЦ ЭНАС, 2007;</li> <li>- организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны:</li> </ul> <p><i>Лаборатория должна быть расположена в помещениях с естественным освещением, отоплением, водопроводом и канализацией, Работать в лаборатории необходимо в халате, защитная одежда и кожу от попадания и разъедания реактивами и обсемененности микроорганизмами.</i></p> <p><i>Все работы с чрезвычайно и высокоопасными веществами следует проводить только в вытяжных шкафах.</i></p> <p><i>Каждый должен работать на закрепленном за ним рабочем месте. Все рабочие места оборудуют предметами, необходимыми для повседневной работы. Рабочее место следует поддерживать в чистоте, не загромождать его посудой и побочными вещами.</i></p> |

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику 15.03.18

**Задание выдал консультант:**

| Должность  | ФИО                         | Ученая степень, звание | Подпись   | Дата     |
|--|-----------------------------|------------------------|---|----------|
| Профессор Отделения контроля и диагностики ИШНКБ | Ахмеджанов Рафик Равильевич | д.б.н                  |  | 15.03.18 |

**Задание принял к исполнению студент:**

| Группа | ФИО                   | Подпись   | Дата     |
|--------|-----------------------|---|----------|
| 4ДМ61  | Кабдеш Ильяс Муратулы |  | 15.03.18 |

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 105 страниц, 22 рисунка, 30 таблиц, 52 источника, 2 приложения

Ключевые слова: pH-зависимый пептид, pHILIP, рекомбинантные белки, рекомбинантные пептиды, рекомбинантные технологии, экспрессионная система, вектор

Объектом исследования является: рекомбинантная технология получения pH-зависимого пептида pHILIP

Цель работы – провести сравнение эффективности получения pH-зависимого пептида pHILIP с использованием двух различных экспрессионных систем

В процессе исследования проводились работы по клонированию кодирующей пептид pHILIP последовательности в бактериальный экспрессионный вектор, последующей экспрессии пептида в составе белка слияния в клетках E. coli, выделению целевого пептида и анализу экспрессии пептида с использованием двух различных экспрессионных систем

В результате исследования предложена оптимальная экспрессионная система для получения рекомбинантного pH-зависимого встраивающегося пептида pHILIP в составе белка слияния в клетках E. coli

Область применения: диагностика и терапия злокачественных солидных опухолей

Экономическая эффективность/значимость работы: описываемый в работе метод получения pH-зависимого пептида (рекомбинантные технологии) представляется экономически более выгодным в сравнении с применяемым в настоящее время твердофазным синтезом

В будущем планируется оптимизировать условия хроматографической очистки пептида для последующего получения индивидуального препарата пептида с целью адресной доставки терапевтических веществ в опухоль

## Определения, обозначения, сокращения, нормативные ссылки

В данной работе применены следующие термины с соответствующими определениями:

**Компетентная клетка:** физиологическое состояние клетки, определяющее её способность принимать извне экзогенную ДНК.

**Рекомбинантная технология:** технология получения белков с использованием ДНК и генно-инженерных процедур.

**Лизис:** растворение клеток и их систем, в том числе микроорганизмов, под влиянием различных агентов, например ферментов, бактериолизин, бактериофагов, антибиотиков.

**Рестрикция:** процесс ферментативного разделения цепочек дезоксирибонуклеиновой кислоты на отдельные фрагменты, осуществляемый специальными ферментами (эндонуклеазы рестрикции).

**Трансформация:** направленный перенос и встраивание в генетический аппарат клетки небольшого фрагмента чужеродной ДНК

**Экспрессия генов:** процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок.

Сокращения и обозначения, использованные в работе:

ПЦР — полимеразная цепная реакция;

His-tag — участок, представленный шестью остатками гистидина;

EtBr — бромистый этидий;

BrCN – цианистый бром;

Trx — тиоредоксин;

SDS — додецилсульфат натрия;

PMSF — фенилметилсульфонилфторид;

ПААГ — полиакриламидный гель;

ЭДТА — этилендиаминтетраацетат.

## Оглавление

|   |    |
|---|----|
| РЕФЕРАТ.....  | 10 |
| Определения, обозначения, сокращения, нормативные ссылки.....   | 11 |
| Введение.....   | 14 |
| 1 Обзор литературы.....   | 17 |
| 1.1 рН-зависимый пептид рНЛIP для селективной доставки в опухоль.....                                   | 17 |
| 1.2 Твердофазный синтез рНЛIP пептида.....  | 19 |
| 1.3 Системы экспрессии белков.....  | 20 |
| 1.4 Белки слияния в рекомбинантных технологиях.....   | 22 |
| 1.5 рЕТ32a(+). .....  | 26 |
| 2. Объект, методы и материалы исследования.....   | 29 |
| 2.1 Объект исследования.....  | 29 |
| 2.2 Материалы.....  | 29 |
| 2.3 Методы.....   | 31 |
| 2.3.1 Стерилизация посуды.....  | 31 |
| 2.3.2 Приготовление сред.....   | 31 |
| 2.3.3 Приготовление растворов.....  | 32 |
| 2.3.4 Приготовление компетентных клеток.....  | 32 |
| 2.3.5 Получение рНЛIP в бактериальной системе экспрессии.....   | 33 |
| 2.3.5.1 Выделение плазмидной ДНК из ночной культуры.....  | 33 |
| 2.3.5.2 Синтез фрагмента ДНК, кодирующего рН-зависимый пептид, методом полимеразной цепной реакции..... | 33 |
| 2.3.5.3 Рестрикция ДНК.....   | 34 |
| 2.3.5.4 Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле.....   | 34 |
| 2.3.5.5 Выделение ДНК из агарозного геля.....   | 34 |
| 2.3.5.6 Дефосфорилирование выделенной плазмиды.....   | 35 |
| 2.3.5.7 Лигирование полученного ПЦР-продукта в рЕТ32a(+) вектор.....                                    | 35 |
| 2.3.5.8 Трансформация компетентных клеток.....  | 35 |
| 2.3.5.9 Оптимизация условий экспрессии пептида рНЛIP в составе белка слияния с тиоредоксином.....       | 36 |
| 2.3.5.10 Индукция экспрессии белка слияния.....   | 36 |
| 2.3.5.11 Приготовление осветлённого лизата.....   | 37 |
| 2.3.5.12 Очистка белка на Ni-NTA агарозе (металл-хелатная аффинная хроматография).....                  | 37 |
| 2.3.5.13 Анализ методом SDS-ПААГ электрофореза.....   | 38 |
| 2.3.5.14 Диализ.....  | 39 |
| 2.3.5.15 Оценка чистоты и выхода белка.....   | 39 |
| 2.3.5.16 Лиофилизация слитого белка Trx-рНЛIP.....  | 39 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.3.5.17 | Разделение белка слияния при помощи бромциана.....                             | 40        |
| 2.3.5.18 | Анализ методом трицин-ПААГ электрофореза .....                                 | 40        |
| <b>4</b> | <b>Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение.....</b>    | <b>42</b> |
| 4.1      | Предпроектный анализ.....  | 42        |
| 4.1.1    | Потенциальные потребители результатов исследования.....                        | 42        |
| 4.1.2    | Диаграмма Исикавы .....  | 43        |
| 4.1.3    | Оценка готовности проекта к коммерциализации .....                             | 44        |
| 4.1.4    | Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования.....      | 45        |
| 4.1.5    | Организационная структура проекта .....  | 46        |
| 4.2      | Планирование управления научно-техническим проектом.....                       | 47        |
| 4.3      | Бюджет научного исследования.....  | 49        |
| 4.3.1    | Сырьё, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты (за вычетом отходов) ...    | 49        |
| 4.3.2    | Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ .....           | 49        |
| 4.3.3    | Основная заработная плата .....  | 51        |
| 4.3.4    | Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала .....       | 53        |
| 4.3.5    | Отчисления на социальные нужды .....   | 54        |
| 4.3.6    | Накладные расходы.....   | 54        |
| 4.4      | Организационная структура проекта .....  | 55        |
| 4.5      | Матрица ответственности .....  | 55        |
| 4.6      | План управления коммуникациями .....   | 57        |
| 4.7      | Реестр рисков проекта .....  | 58        |
| 4.8      | Оценка сравнительной эффективности исследования.....                           | 59        |
|          | Список публикаций студента .....   | 63        |
|          | Приложения .....   | 64        |
|          | Приложение А. Раздел ВКР на иностранном языке.....                             | 64        |
| <b>1</b> | <b>Literature review.....</b>  | <b>65</b> |
| 1.1      | pH-low insertion peptide pHLIP for selective delivery to the tumor .....       | 65        |
| 1.2      | Solid-phase synthesis of pHLIP peptide.....                                    | 66        |
| 1.3      | Protein expression systems .....   | 68        |
| 1.4      | Fusion proteins in recombinant technologies .....                              | 70        |
| 1.5      | pET32a(+) .....  | 73        |
|          | Приложение В. Основные характеристики различных систем экспрессии белков ..... | 75        |

## Введение

Среди разнообразных методов лечения, применяемых в онкологии, следует выделить такое многообещающее направление лечения рака, как адресная терапия, где применяются различные векторные молекулы. Одной из таких перспективных молекул является рН-зависимый встраивающийся пептид рНLIP.

рНLIP (pH low insertion peptide) – векторный пептид, чувствительный к рН среды и способный встраиваться в мембрану клетки при снижении значения рН ниже 7.0. При локальном закислении межклеточной среды — хорошо известном свойстве многих солидных опухолей — рНLIP меняет свою конформацию и образует специфическую структуру, альфа-спираль, которая встраивается в мембрану клетки и вводит прикрепленное к С-концу пептида рНLIP соединение в цитоплазму, тогда как N-конец пептида остается снаружи. Таким образом, использование рНLIP позволяет доставить, например, связанные с пептидом лекарственные вещества, контрастные метки или наночастицы непосредственно к раковым клеткам, и может быть успешно применено как для повышения эффективности терапии, так и для диагностики опухолей.

В настоящее время пептид рНLIP получают методом твердофазного синтеза. Рекомбинантная технология получения пептида является более экономически выгодной. Наиболее успешной стратегией получения пептидов в целом с использованием рекомбинантных технологий является получение их в составе белка-слияния (химеры) с другими белками. После экспрессии в микробной клетке, пептид может быть выделен в составе белка слияния и далее отделен от белка-партнера ферментативным или химическим расщеплением по соответствующему сайту.

Разработка технологии получения пептида с использованием рекомбинантных технологий сопряжена с решением таких задач, как тщательный подбор экспрессионного вектора, белка-партнера,

экспрессионной системы, а также условий экспрессии пептида и способа его очистки. Ранее в Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ было выполнено клонирование кодирующей пептид рНЛIP последовательности в плазмиду рЕТ31b(+) для экспрессии в составе белка слияния с кетостероидизомеразой. Трансформация компетентных клеток *Escherichia coli* данной плазмидой позволяет реализовать подход, известный как «нерастворимая экспрессия», когда пептид в составе химерного белка образует тельца включения.

Целью данной работы было провести клонирование кодирующей пептид рНЛIP последовательности в бактериальный экспрессионный вектор рЕТ32a(+), обеспечивающий экспрессию пептида в составе белка-слияния с тиоредоксином, и провести сравнение эффективности получения рН-зависимого пептида рНЛIP в клетках *E. coli*, трансформированных с использованием двух различных экспрессионных векторов, полученных на основе плазмид рЕТ31b(+) и рЕТ32a(+).

В соответствии с целью работы были сформулированы следующие задачи:

1. Выполнить дизайн генетической конструкции и получить рекомбинантную плазмидную ДНК рЕТ32a(+)-рНЛIP, кодирующую аминокислотную последовательность векторного рН-зависимого встраиваемого пептида (рНЛIP);
2. Получить рекомбинантный штамм *Escherichia coli* Rosetta (DE3) рLysS/ рЕТ32a(+)-рНЛIP и оптимизировать условия экспрессии рНЛIP пептида в составе белка-слияния с тиоредоксином;
3. Выполнить сравнение эффективности систем экспрессии пептида рНЛIP, полученных в результате трансформации штамма *E. coli* Rosetta (DE3) рLysS рекомбинантными плазмидами рЕТ31b(+)-рНЛIP и рЕТ32a(+)-рНЛIP;
4. Провести анализ экономической эффективности разработки;

5. Оценить экологическую безопасность проведения исследования, условия труда и риски, связанные с проведением исследования.

Реализация и апробация работы:

«Recombinant pH low insertion peptide synthesis», публикация тезисов в сборнике материалов Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ЦНИЛ СибГМУ «Molecules and systems for diagnostics and targeted therapy», Томск, 1-3 ноября 2017 года.

«Высокоэффективная экспрессия рекомбинантного пептида pHILP в составе белка-слияния с тиоредоксином», диплом II степени, публикация тезисов в сборнике материалов XIX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке», Томск, 21-24 мая 2018 года

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю, кандидату биологических наук, доценту Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий ТПУ, старшему научному сотруднику ЦНИЛ СибГМУ Першиной Александре Геннадьевне за консультации, научное сопровождение, ценные советы и методическую помощь на всем протяжении выполнения работы.

Автор также благодарит аналитика, без профессионального труда которого не состоялась бы эта работа - к.б.н., н.с. лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ Н.П. Бабушкину.

# 1 Обзор литературы

## 1.1 pH-зависимый пептид pHLIP для селективной доставки в опухоль

Ряд исследований показал, что внеклеточное значение pH раковой опухоли, как правило, ниже, чем в нормальной ткани, причем низкое значение pH способствует инвазивному росту опухоли при первичном и метастатическом раке. Повышение кислотности осуществляется, в основном, за счёт перехода раковых клеток к гликолизу, в том числе за счёт гипоксии и вследствие уменьшения притока крови, который является характерным фенотипическим свойством многих раковых клеток (эффект Варбурга) [1]. Данная физиологическая особенность опухолей может быть использована для селективной доставки в опухоль.

pHLIP (pH-low insertion peptide) – это группа пептидов, полученная в 1971 году из спирали бактериородопсина [2], выделенного из клеточной мембраны галобактерии *Halobacterium halobium*. Пептид в различных вариациях состоит из 35-40 аминокислот и его основным свойством является встраивание в мембрану клетки при низком значении водородного показателя (ниже 7.0) (Рисунок 1.1).

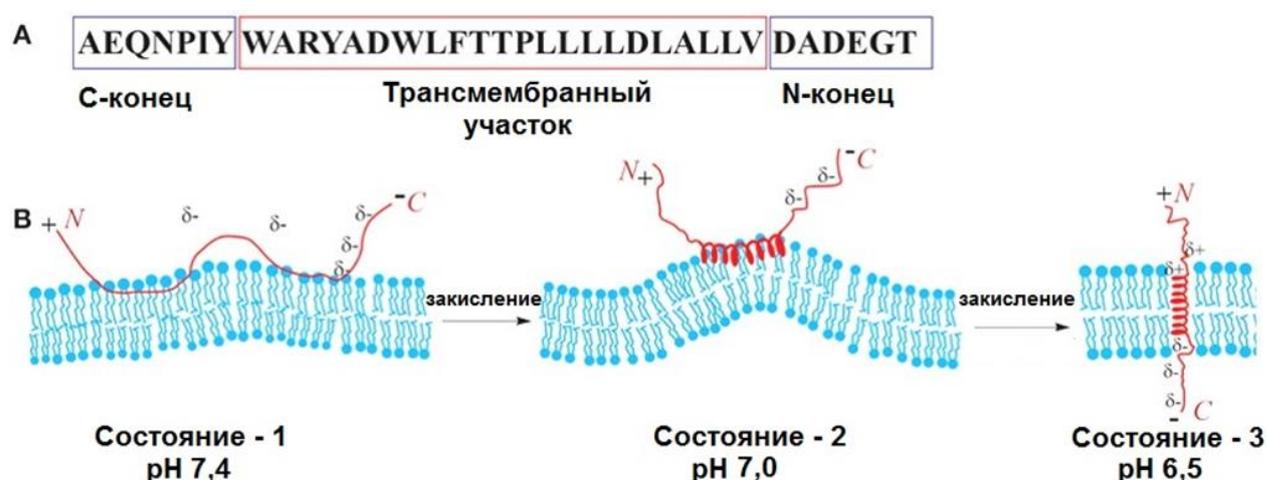


Рисунок 1.1 — Процесс встраивания пептида pHLIP в плазматическую мембрану [3]

При локальном закислении внеклеточной среды (значение рН ниже 7) — характерным для многих опухолей [2,4] — рНLIP изменяет свою конформацию, благодаря наличию в своей структуре большого количества аминокислотных остатков глутамина и аспарагина, и встраивается в мембрану клетки [5].

рН-зависимое проникновение пептида рНLIP в клетку, в соответствии с данными кинетического анализа, происходит в несколько этапов. Первым, и самым быстрым (0,1 с) этапом является образование  $\alpha$ -спирали, вторым этапом, значительно более медленным (100 с), является образование кольца для проникновения внутрь мембраны. Процесс разворачивания и переход пептида из двухслойной мембраны, которые могут быть вызваны быстрым повышением рН от кислой к основной, протекает примерно в 400 раз быстрее, чем процессы перехода в  $\alpha$ -спираль, кольцо или различные промежуточные состояния [6]. При выходе из мембраны инициируется переход спираль-кольцо, при этом полипептид продолжает находиться внутри мембраны. Пептид начинает выходить, когда около 30% спирали разворачивается, и продолжает выходить намного быстрее, когда спираль начинает разворачиваться внутри мембраны [7].

Учитывая накопленные ранее знания о рН-индуцированном прохождении рН-зависимого пептида с образованием спирали через липидные бислои, крайне перспективно рассмотреть пептид рНLIP как векторную молекулу. Прикрепление маркера к пептиду рНLIP может быть осуществлено как к С-концу, так и к N-концу [8].

Перенос внутрь клетки через липидный бислой происходит при низком значении рН, таким образом, наноконъюгат, контрастная метка либо непосредственно препарат с пептидом рНLIP может проникать только в клетки, находящиеся в условиях локального ацидоза. В настоящее время ведутся разработки по созданию конъюгатов с пептидом рНLIP для избирательной доставки терапевтических молекул и диагностической визуализации опухолей [4].

## 1.2 Твердофазный синтез pHLIP пептида

В настоящее время pHLIP получают методом твердофазного синтеза (Рисунок 1.2).

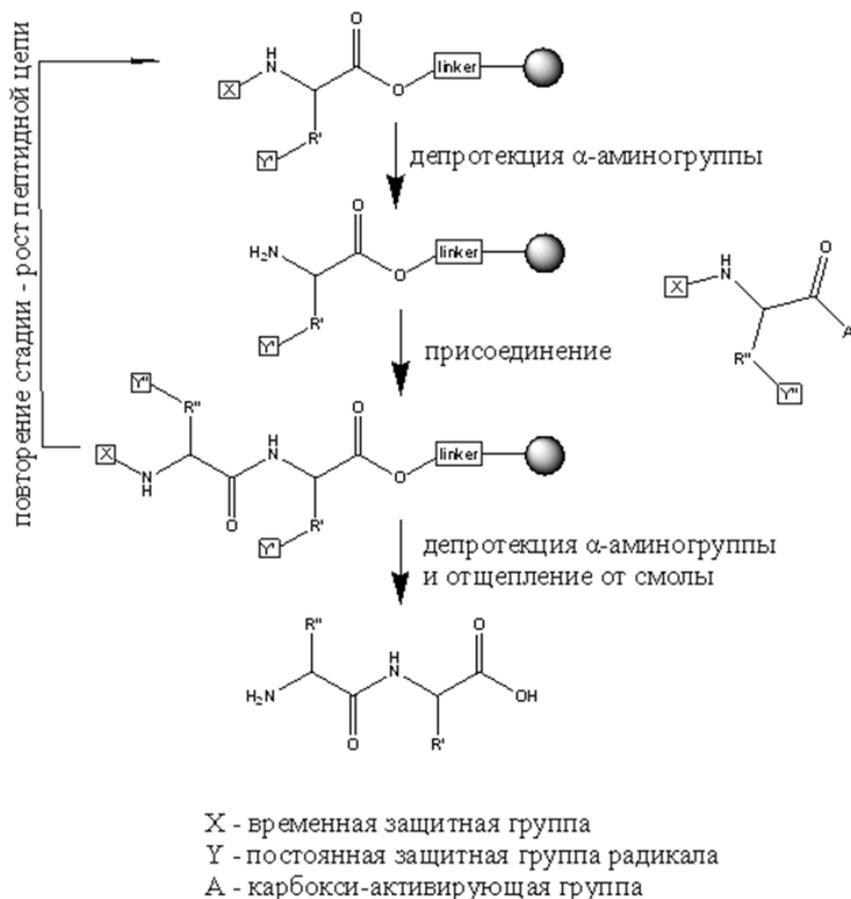


Рисунок 1.2 — Принцип твердофазного синтеза пептидов [9]

Карбоксильную группу N-защищённого С-концевого аминокислотного остатка прикрепляют к твёрдому носителю. После загрузки первой аминокислоты желаемая пептидная последовательность синтезируется линейно от С-конца до N-конца (стратегия C-N) посредством повторяющихся циклов деактивации  $\alpha$ -аминогруппы и реакций сочетания аминокислот [9].

Функциональные группы боковых цепей должны быть деактивированы с помощью постоянных защитных групп, стабильных в условиях реакции связывания аминокислотных остатков при удлинении пептида.  $\alpha$ -аминогруппу защищают временной защитной группой (обычно производное уретана),

которая может быть легко удалена в мягких условиях, сохраняющих целостность пептида и уменьшающих скорость эпитомеризации.

После связывания избыток реагентов отфильтровывают и промывают реакционную смесь. Временную N-концевую защитную группу удаляют, что позволяет добавить следующий аминокислотный остаток, защищённый N-уретаном, путём активации его  $\alpha$ -карбоновой кислоты. Этот процесс (снятие защиты/связывание) повторяют до получения желаемой последовательности. На конечной стадии пептид высвобождается от смолы с одновременным удалением защитных групп боковой цепи [9].

Ограничениями метода твердофазного синтеза для получения пептидов является его высокая стоимость и токсичность используемых реагентов, а также загрязнение целевого продукта продуктами побочных реакций, причем сложность очистки целевого пептида связана с тем, что побочные продукты имеют схожую природу [10].

Более выгодным с экономической точки зрения и экологичным представляется генно-инженерный способ получения пептидов. Однако стоит отметить, что для успешной реализации рекомбинантной технологии получения рекомбинантных белков и пептидов необходимым является провести подбор вектора, штамма-продуцента, оптимизировать условия экспрессии и последующей очистки.

### **1.3 Системы экспрессии белков**

Рынок фармацевтически ценных белков растет быстрее, чем фармацевтический рынок в целом, и по прогнозам специалистов будет достигать к 2020-му году 278,2 млрд долл. США [11, 12]. Крупнейшие биотехнологические и фармацевтические компании проявляют большую заинтересованность и инвестируют значительные средства в развитие научных исследований по разработке новых платформ для производства рекомбинантных белков и внедрения их в производство [12].

В настоящее время большое число белков медицинского назначения получают не из природных источников, а в результате синтеза их рекомбинантных аналогов. Для этих целей используются различные системы экспрессии: бактериальные (*E. coli*), дрожжевые (*Saccharomyces cerevesiae*, *Pichia pastoris* и *Hansenula polymorpha*), клетки животных (клетки яичников китайского хомячка и т.д.) и др. Это позволяет нарабатывать в промышленных масштабах белки, которые было бы невозможно в достаточном количестве получить традиционными методами экстракции (например, инсулин или гормон роста человека) [12].

Получение рекомбинантных белков основано на технологии рекомбинантных ДНК, включающей клонирование целевого гена, кодирующего фармацевтически ценный (целевой) белок, и его перенос в клетки-продуценты, в которых данный целевой белок будет синтезирован. Для бактериальных систем экспрессии характерны относительная простота генно-инженерных манипуляций, высокая скорость деления клеток и, соответственно, значительный выход биомассы, высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков и возможность масштабного производства белка в биореакторах.

Наряду с этим, прокариотическая клетка не в состоянии осуществлять многие посттрансляционные модификации синтезируемого рекомбинантного белка, включая прежде всего его гликозилирование и корректное образование дисульфидных связей. Следует отметить, что некорректные посттрансляционные модификации или их отсутствие могут в той или иной степени повлиять на свойства рекомбинантного белка, в том числе на его биологическую активность и фармакокинетику. Таким образом, прокариотические системы экспрессии используются преимущественно для синтеза относительно простых терапевтических белков, таких как инсулин, интерферон или гормон роста человека [12].

Немаловажным является и этап выделения рекомбинантного белка, синтезируемого в прокариотической системе экспрессии, поскольку именно

этот этап связан с очисткой целевого продукта от пирогенных эндотоксинов и других продуктов метаболизма бактериальных клеток в культуре. В среднем выход рекомбинантного белка в бактериальной системе экспрессии составляет от 20 до 400 мг/л культуральной среды.

Наиболее приближенно к человеческому типу посттрансляционные модификации рекомбинантного белка осуществляются в системах экспрессии, основанных на культурах клеток млекопитающих [11,12], но и эти системы не лишены недостатков. К ним относятся высокая стоимость культивирования, трудности с масштабированием процесса и опасность заражения клеточной культуры патогенами человека и животных.

Использование дрожжей для наработки рекомбинантных белков часто сопровождается некорректными посттрансляционными модификациями, связанными с образованием гипергликозилированных рекомбинантных белков [12].

Преимущества, недостатки и потенциальные области применения некоторых наиболее широко используемых рекомбинантных экспрессионных систем приведены в таблице (Приложение В).

#### **1.4 Белки слияния в рекомбинантных технологиях**

Основным преимуществом, полученным в результате внедрения технологии рекомбинантных ДНК, стало крупномасштабное производство белков медицинского или промышленного значения [13]. Получение гетерологичных белков в бактериальной системе экспрессии на данный момент является наиболее доступным и упрощенным способом получения белка в больших количествах. Однако при экспрессии некоторых белков и пептидов исследователи сталкиваются с проблемами, связанными с протеолизом пептида/белка и его возможным токсическим действием по отношению к продуценту (клетке-хозяину) [14].

Для решения этих проблем экспрессия пептидов производится в их составе с белками-партнерами (так называемыми фьюзами, фьюжн-

партнерами, белками слияния), которые представляют из себя комплекс двух или более генов, кодирующих отдельный белок каждый. Впоследствии трансляция этого «слитого» гена приводит к синтезу белка, сочетающего определенные функциональные свойства отдельных исходных белков [15]. Так, за последнюю декаду с использованием рекомбинантных технологий были получены, например, пептиды-антагонисты  $\alpha\beta 6$  интегрина:

- A20fmdv2 (NAVPNLRGDLQVLAQKVART)
- A20lap2 (GFTTGRRGDLATINGLNRPF)
- DBD1 (EKCPNLRGDLQVLAQKVCRT)
- TGF $\beta$ 3 (NEDDHQRGDLGRLKKQKDHN),

предназначенные для диагностики и целевой доставки к опухолям поджелудочной железы и толстой кишки [16]. Нацеливание к опухоли в данном случае реализуется за счет высокоаффинного взаимодействия и реализуется только в отношении опухолевых клеток, на поверхности которых сверхэкспрессирован интегрин.

В то время как производство гетерологичных белков в бактериальных системах экспрессии успешно реализовано в биотехнологической промышленности, существует множество случаев, когда они давали менее удовлетворительные результаты. Например, при достижении высоких уровней экспрессии, рекомбинантные белки часто экспрессируются в клетках *Escherichia coli* как нерастворимые белковые агрегаты, называемые «тельцами включения», которые были предметом многих исследований по сворачиванию белка [17, 18]. Хотя первоначальная очистка телец включения путем лизиса и центрифугирования клеток относительно проста, слитый белок должен быть растворен в присутствии сильных денатурирующих агентов (таких как мочевины, гидрохлорид гуанидина – GuHCl и т.п.) с последующим рефолдингом белка для приобретения правильной трехмерной конформации. Условия для рефолдинга денатурированного белка должны быть оптимизированы для каждого белка индивидуально, а выходы могут быть низкими даже в оптимизированных условиях [18,19]. Таким образом,

желательно по возможности повысить экспрессию белка в полностью растворимой форме до максимального уровня и тем самым избежать процедуры проб и ошибок, необходимых для разработки эффективного процесса рефолдинга [18].

В таблице 1.1 приведены основные коммерческие и наиболее эффективные белки-партнеры с оценкой их растворимости.

Таблица 1.1 – Прогнозируемая растворимость основных доступных белков-партнеров [18]

| <b>Белок-партнер</b> | <b>Молекулярная масса (kDa)</b> | <b>Количество аминокислотных остатков</b> | <b>Растворимость, %</b> |
|----------------------|---------------------------------|---|-------------------------|
| NusA                 | 55.0                            | 495                                       | 95                      |
| BFR                  | 18.5                            | 158                                       | 95                      |
| GrpE                 | 21.7                            | 197                                       | 92                      |
| Trx                  | 11,7                            | 109                                       | 73                      |
| DsbA                 | 21.1                            | 189                                       | 59                      |
| MBP                  | 38.5                            | 370                                       | 55                      |
| GST                  | 26.0                            | 218                                       | 56                      |
| hIL-3                | 15.1                            | 133                                       | 73                      |
| bGH                  | 21.6                            | 189                                       | 85                      |
| hIFN- $\gamma$       | 17.1                            | 146                                       | 96                      |

В настоящее время наиболее широко внедренными в практику белками-партнерами для экспрессии слитого белка в клетках *E. coli* являются глутатион S-трансфераза *Schistosoma japonicum* (GST) [20], мальтоза-связывающий белок *E. coli* (MBP – maltose binding protein) [21], и тиоредоксин *E. coli* (Trx) [22]. GST и MBP были выбраны в качестве белков-партнеров ввиду того, что позволяют достичь высокоуровневой экспрессии и провести аффинную очистку. Преимуществом использования тиоредоксина является его способность обеспечить растворимую экспрессию наряду с высокими

выходами слитого белка. Хотя эти белки-партнеры позволили провести успешную экспрессию многих гетерологичных белков в *E. coli*, каждый из них был обнаружен эмпирически [18].

В некоторых случаях белки-партнеры несут в себе двойную функцию, не только обеспечивая растворимую экспрессию, но и обеспечивая эффективную очистку белка (фьюжн-таги). В других случаях белки, повышающие растворимость продукта, были объединены с гексагистидиновым (His6) блоком, упрощая процедуру очистки целевого белка (Таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Наиболее широко используемые полипептиды для очистки рекомбинантных белков [23].

| <b>Метка</b> | <b>Полипептид</b>               | <b>Аффинная матрица</b> |
|--------------|---------------------------------|-------------------------|
| His6         | Гексагистидиновый блок          | Металл-хелаты           |
| GST          | Глутатион S-трансфераза         | Глутатион               |
| MBP          | Мальтоза-связывающий белок      | Амилоза                 |
| FLAG эпитоп  | FLAG октапептид                 | Анти-FLAG антитела      |
| ВАР          | Биотин-акцепторный пептид       | Авидин                  |
| Strep- II    | Стрептавидин-связывающий пептид | Стрептавидин            |
| СВР          | Кальмодулин-связывающий пептид  | Кальмодулин             |

Тем не менее, помимо вышеописанных белков-партнеров, повышающих растворимость целевого полипептида, на данный момент в практике имеет место получение пептидов в составе белка слияния с кетостероидизомеразой (KSI), обеспечивающей образование нерастворимых агрегатов, называемых тельцами включения (inclusion bodies - IBs).

Аминокислотная последовательность данного фермента (KSI) была получена из бактерии *Pseudomonas testosteroni* и впоследствии была модифицирована следующим образом: пять аминокислотных остатков аспарагиновой кислоты были заменены остатками глутаминовой кислоты, что позволило обеспечить устойчивость полученного белка слияния к кислотному расщеплению, оставив при этом его способность образовывать тельца включения [24]. Данный подход применим для синтеза пептидов, так как в данном случае нет необходимости рефолдинга [18].

Таким образом, несмотря на большой опыт получения различных пептидов с применением различных систем экспрессии, задача оптимизации получения конкретного пептида как правило решается эмпирическим путем.

В связи с этим, в рамках настоящей работы нами было предложено сравнить эффективность экспрессии и уровень выхода рН-зависимого пептида в составе белков слияния с кетостероидизомеразой и тиоредоксином, направляющих нерастворимую и растворимую экспрессию, соответственно

### **1.5 pET32a(+)**

Для получения генетической конструкции, направляющей синтез рН-зависимого встраивающегося пептида рНLP в бактериальной системе, нами была выбрана коммерчески доступная плазмидная ДНК pET32a(+) (Novagen, Германия) (Рисунок 1.3).

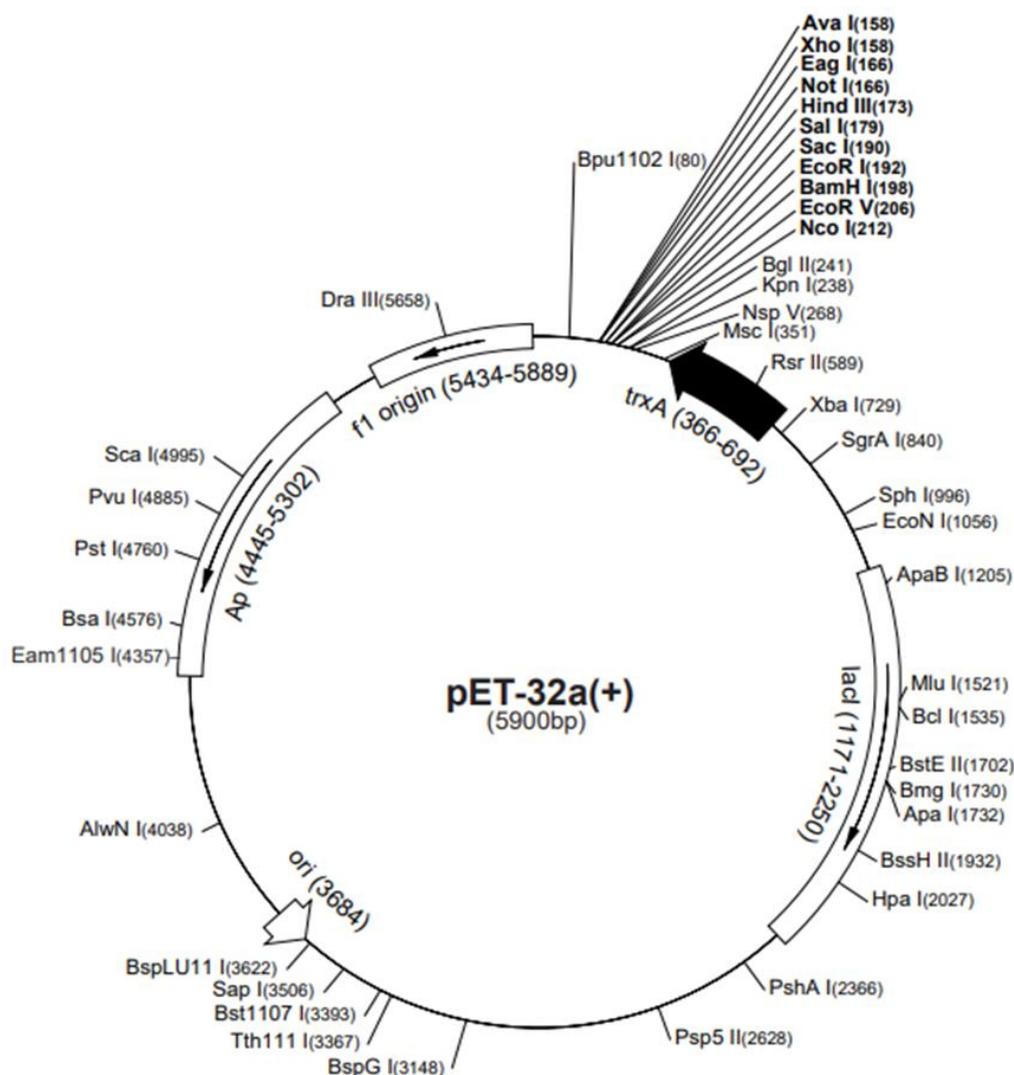


Рисунок 1.3 - Плазмида pET32a(+) и ее структурные элементы

Плазмидная ДНК pET32a(+) предназначена для высокоэффективной экспрессии пептидов в составе белка слияния с тиоредоксином на N-конце, целевым пептидом на C-конце и последовательностью из шести гистидиновых блоков (6x His-tag) для очистки слитого белка при помощи металл-хелатной аффинной хроматографии. Преимуществом данной генетической конструкции является то, что белок-партнер тиоредоксин (Trx) обеспечивает высокую экспрессию, растворимость и правильное сворачивание целевого белка. Наличие шести гистидиновых остатков в составе конструкции тиоредоксин/целевой белок упрощает его очистку посредством аффинной хроматографии [25].

Тиоредоксин *E. coli* представляет собой небольшой белок с молекулярной массой 11,7 кДа и может быть экспрессирован на довольно высоких уровнях. Малый размер и способность к высокой экспрессии белка вносят вклад в высокую внутриклеточную концентрацию. Тиоредоксин также характеризуется очень стабильной, плотной структурой, которая может минимизировать влияние на общую структурную стабильность, вызванную слиянием с желаемым пептидом или белком [26].

Трехмерная структура тиоредоксина *E. coli* известна и содержит несколько доменов, включая уникальную структуру активного сайта, формирующегося между остатками цистеина Cys<sub>33</sub> и Cys<sub>36</sub>. Активный сайт является идентифицируемым и не участвует в каких-либо взаимодействиях с остальной частью белка, что способствует его общей структурной стабильности [26].

Для экспрессии гибридного белка тиоредоксин-pHLIP был выбран штамм *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, предназначенный для осуществления манипуляций с экспрессионными системами, основанными на работе позднего промотора бактериофага T7. Данный штамм позволяет экспрессировать T7-РНК-полимеразу под контролем промотора lacUV5, что дает возможность осуществлять индукцию экспрессии рекомбинантных белков путем внесения ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) – синтетического аналога лактозы, специфического активатора T7-промотора [25].

## 2. Объект, методы и материалы исследования

### 2.1 Объект исследования

Объектом исследования является технология получения рН-зависимого встраивающегося пептида рНLIP в бактериальной системе экспрессии с использованием рекомбинантной плазмидной ДНК.

### 2.2 Материалы

В работе были использованы рабочие материалы: плазмиды рЕТ-32a(+) (Novagen) и рЕТ31b(+)-рНLIP (из коллекции Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ); штаммы *Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* Rosetta (DE3) рLysS; синтетические олигонуклеотиды (СибЭнзим, Новосибирск); эндонуклеазы рестрикции (СибЭнзим): Bam HI, Hind III.

Реактивы: 2-меркаптоэтанол, CNBr, HCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O, NaOH, NaCl, N-N'-метилен-бис-акриламид, имидазол, TEMED (тетраметилэтилендиамин), трис (гидроксиметил) аминметан, акриламид, глицерин, додецисульфат натрия (SDS), изопропиловый спирт, мочевиная кислота, персульфат аммония (PSA), трихлоруксусная кислота, уксусная кислота, этиловый спирт, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), леупептин, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), ТЕ-буфер (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0), глицерин.

Коммерческие наборы: для дефосфорилирования ДНК (термостабильная щелочная фосфатаза из кишечника теленка, SE-буфер W (10 мМ Tris-HCl; 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 100 мМ NaCl; 1 мМ DTT) (СибЭнзим); T4 ДНК лигаза (ДНК-лигаза фага T4), SE-буфер (50 мМ Tris-HCl; 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 10 мМ DTT; 1 мМ АТФ) (СибЭнзим); для выделения и очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей «Cleanup Standard» (Evrogen, Москва); для выделения плазмидной ДНК «Plasmid Miniprep» (Evrogen); набор реактивов для постановки ПЦР «Encyclo PCR kit» (Evrogen).

Для электрофоретического анализа ДНК использовали: агарозу, буфер 50×TAE (0,05 М ЭДТА; 1 М уксусная кислота, 2 М Трис). Для получения рабочего буфера 50-кратный буфер разводили дистиллированной водой 1:50.

Для электрофоретического анализа белков использовали: 30% полиакриламидный гель (акриламид; N-N'-метилден-бис-акриламид 37,5:1), 10% SDS, 1,5 М трис HCl pH 8,8, 0,5 М трис HCl, pH 6,8, 10% PSA, TEMED, Running buffer (25 мМ трис, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, pH 8.3).

Для трицин-ПААГ электрофореза использовали: стоковый раствор акриламида (акриламид 48%, N-N'-метилден-бис-акриламид 1%), 3,0 М трис-HCl, pH 8,45, глицерин, 10% SDS, 10% PSA, TEMED.

В работе использовали следующие антибиотики, со стоковыми концентрациями: ампициллин (рабочее разведение 1:1000) – сток 50 мг/мл, тетрациклин (рабочее разведение 1:1000) – сток 12 мг/мл.

В работе использовали следующие среды: LB (Broth-Miller, Amresco), бактериологический агар-агар (ЗАО «Фарма»), SOB среда (триптон; дрожжевой экстракт; NaCl; KCl; MgCl<sub>2</sub>; MgSO<sub>4</sub>).

В работе были использованы следующие расходные материалы: чашки Петри одноразовые пластиковые, одноразовые пластиковые наконечники для дозаторов переменного объёма (200 мкл, 1000 мкл), пробирки типа Эппендорф (0,6; 1,5 и 2 мл), одноразовые пластиковые пробирки (50 мл).

В работе были использованы следующие приборы: стеклянные колбы, стеклянные стерильные пробирки, автоматические дозаторы переменного объёма (0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл) (Ленпипет), Вортекс (BioSan), твердотельный настольный термостат (BioSan), ламинарный бокс II класса, термостат-инкубатор с естественной циркуляцией воздуха Memmert, гомогенизатор Bandelin Sonopuls HD 2070, амплификатор (Thermal Cycler; Applied Biosystems), спектрофотометр (Nanodrop 2000), система геледокументирования (G:BOX Chemi; XT4), источник питания и камера для горизонтального геле-электрофореза (Biosom), аналитические весы (Adventure), лабораторная термостатируемая качалка (КТ 103), генератор

чешуйчатого льда (PORKKA), термостат-инкубатор с естественной конвекцией (Binder), центрифуга с охлаждением (Sigma), холодильник низкотемпературный (Sanyo), настольная центрифуга (Eppendorf).

## **2.3 Методы**

### **2.3.1 Стерилизация посуды**

В работе использовали стерильную посуду, наконечники, пробирки.

Стерилизация стеклянной посуды: закрытую фольгой посуду стерилизовали в сухожаровом шкафу при 150°C в течение 2 часов.

Стерилизация пластика: наконечники и пробирки помещали в стеклянную банку, закрытую фольгой, и стерилизовали в сухожаровом шкафу в течение двух часов при 110°C.

### **2.3.2 Приготовление сред**

Жидкая среда LB (Broth-Miller, Amresco): 25 г среды разводили в 1 л дистиллированной воды.

Агаризованная LB-среда (LB-агар): 15 г бактериологического агара смешивали с 25 г LB (Broth-Miller, Amresco), растворяли в 1 л дистиллированной воды.

SOB-среда: триптон 4 г, дрожжевой экстракт 1 г, 5M NaCl 400 мкл; 1M KCl 500 мкл; доводили дистиллированной водой до 200 мл.

После стерилизации в термостате-инкубаторе с естественной конвекцией вносили стерильные растворы 1M MgCl<sub>2</sub> – 2 мл; 1M MgSO<sub>4</sub> – 2 мл.

Стерилизация сред проводилась в стеклянных колбах, закрытых фольгой, 2 ч при 110°C.

Предварительно прогретую, полностью растворённую при 110 °C среду LB-агар разливали по чашкам с добавлением соответствующего антибиотика в концентрациях, указанных ранее, чашки хранили не более двух

недель при 4°C, в холодильнике, запаковав их парафиновой плёнкой (Parafilm M, США).

### **2.3.3 Приготовление растворов**

ТВ (1М CaCl<sub>2</sub> 10 мл, 1М MnCl<sub>2</sub> 5 мл, 1М HEPES 1 мл, дистиллированная вода до 100 мл); тетрациклин (12 мг/мл).

Буфер для окрашивания образцов, на 1 мл: 50 мкл 10% SDS, 200 мкл 0,5М ЭДТА, pH 8,0, 500 мкл глицерина, 250 мкл 0,5% БФС.

### **2.3.4 Приготовление компетентных клеток**

Штамм *Escherichia coli* XL1-Blue культивировали в жидкой LB-среде с тетрациклином на лабораторной качалке в течение ночи при 37 °С. Отбирали 1 мл ночной культуры и инкубировали в 100 мл среды SOB в течение 2 часов при 37 °С на лабораторной качалке.

Культуру охлаждали во льду в течение часа при периодическом помешивании, затем центрифугировали 10 мин 3000 rpm при 4 °С. Удаляли надосадочную жидкость, осадок отмывали от среды и ресуспендировали в 50 мл охлаждённого ТВ.

Далее выдерживали на льду в течение 30 мин, центрифугировали 10 мин 3000 rpm при 4 °С, удаляли надосадочную жидкость, после чего аккуратно, обрезанным носиком пипетки, ресуспендировали в 5 мл охлаждённого ТВ, содержащего 15% глицерина. Выдерживали 15 мин для распределения по объёму и расфасовывали по 200 мкл в 1,5 мл пробирки типа Эппендорф.

Компетентные клетки хранили при температуре минус 80°C [27].

## 2.3.5 Получение рНЛIP в бактериальной системе экспрессии

### 2.3.5.1 Выделение плазмидной ДНК из ночной культуры

Колонию, трансформированную рЕТ32a(+) вектором, помещали с чашки Петри в 5 мл LB-среды, с добавлением ампициллина (1:1000) и инкубировали в термостатируемой качалке при 37 °С и 200 rpm в течение ночи.

Выделение плазмидной ДНК осуществляли согласно инструкции производителя набором Plasmid MiniPrep (Evrogen). Эффективность выделения оценивали, измеряя концентрацию плазмиды на спектрофотометре Nanodrop 2000.

### 2.3.5.2 Синтез фрагмента ДНК, кодирующего рН-зависимый пептид, методом полимеразной цепной реакции

Получение фрагмента ДНК, кодирующего пептид рНЛIP проводили методом ПЦР с использованием оригинальных олигонуклеотидных праймеров: Forward 5'-TCCAGGATCCATGGCGTGCGAACAGA-3'

Reverse 5'-GCATAAGCTTCATGGTGCCTTCATCCGC-3'

Для проведения ПЦР готовили реакционную смесь, смешивая реагенты в конечных концентрациях, представленных в таблице 2.1.

Таблица 2.1 — Состав реакционной смеси для ПЦР

| Компонент              | На 50 мкл реакции, мкл | Конечная концентрация |
|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 10×Encyclo буфер       | 5                      | 1×                    |
| dNTP                   | 1                      | 0,2 мМ                |
| Праймер Forward        | 1                      | 0,4 мкМ               |
| Праймер Reverse        | 1                      | 0,4 мкМ               |
| 50× Encyclo полимеразы | 1                      | 0,5 е.а.              |
| Стерильная вода        | 41                     | —                     |

ПЦР проводили в амплификаторе (Thermo Cycler; Applied Biosystems) по следующей программе (всего 24 цикла): начальная денатурация – 94 °С, 5

минут и далее – денатурация 94 °С, 15 секунд, отжиг – 58 °С, 15 секунд, элонгация – 72 °С, 15 секунд, конечная элонгация – 72 °С, 2 минуты.

### **2.3.5.3 Рестрикция ДНК**

Рестрикцию осуществляли ферментами эндонуклеазами рестрикции (СибЭнзим) Bam HI, Hind III согласно инструкции фирмы-производителя. На 1 мкг ДНК брали 10 е.а. фермента, смесь инкубировали в твердотельном термостате при 37 °С в течение 2 часов. После рестрикции плазмиду отделяли от продуктов неполной рестрикции с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением с использованием набора «Cleanup Standard» (Evrogen).

### **2.3.5.4 Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле**

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР и фрагментов рестрикционной смеси проводили в 1,2% агарозном геле, приготовленном на основе 1× TAE буфера, с добавлением интеркалирующего агента бромистого этидия (EtBr), при постоянном электрическом токе 200 мА, напряжении 150 В.

### **2.3.5.5 Выделение ДНК из агарозного геля**

После электрофоретического разделения фрагментов в агарозном геле фрагмент заданной длины вырезали из геля, визуализируя его под «мягким» УФ-излучением (365 нм) и минимальном времени экспозиции, переносили в пробирки типа Эппендорф. После извлечения полос гель вносили в трансиллюминатор для подтверждения корректности вырезанных фрагментов ДНК. Далее определяли вес вырезанного фрагмента геля.

Выделение из геля фрагмента ДНК проводили в соответствии с инструкцией производителя при помощи набора Cleanup Standard (Евроген). Концентрацию выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop 2000.

### **2.3.5.6 Дефосфорилирование выделенной плазмиды**

Дефосфорилирование выделенной после рестрикции плазмиды рЕТ32a(+) осуществляли с использованием термостабильной щелочной фосфатазы из кишечника теленка (СибЭнзим). На 1 мкг ДНК линейаризованной рестриктазами плазмиды брали 1 е.а. фермента, смесь инкубировали в твердотельном термостате при 37 °С в течение 30-60 минут. После дефосфорилирования плазмиду очищали и выделяли из реакционной смеси с использованием набора «Cleanup Standard» (Evrogen).

Для контроля качества дефосфорилирования проводили трансформацию компетентных клеток линейаризованной дефосфорилированной плазмидой.

### **2.3.5.7 Лигирование полученного ПЦР-продукта в рЕТ32a(+) вектор**

Лигирование проводили с использованием T4 ДНК-лигазы и соответствующего SE overnight ligation буфера (СибЭнзим) в течение ночи при 14 °С согласно инструкции производителя.

### **2.3.5.8 Трансформация компетентных клеток**

Компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS трансформировали лигазной смесью или плазмидой.

Для этого компетентные клетки размораживали на льду, к 100 мкл компетентных клеток добавляли 10 мкл лигазной смеси/1 мкг плазмидной ДНК, аккуратно перемешивали обрезанным носиком. Трансформированные клетки выдерживали во льду в течение 30 мин, после чего проводили хит-шок — инкубировали в твердотельном термостате 5 мин при 37 °С.

Далее добавляли 1 мл LB-среды и инкубировали в течение часа при 37°С в суховоздушном термостате. Центрифугировали 3 мин при 6000 оборотов в минуту на настольной центрифуге (Eppendorf). Далее удаляли

супернатант, осадок клеток высевали на чашки Петри с селективной средой (LB-агар), содержащей антибиотик ампициллин.

### **2.3.5.9 Оптимизация условий экспрессии пептида рНЛIP в составе белка слияния с тиоредоксином**

Оптимизацию условий экспрессии слитого белка Trx-рНЛIP проводили в бактериальной системе *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Для этого 50 мкл ночной культуры переносили в 5 мл LB-среды, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и выращивали на термостатируемой качалке при 37 °С 180 rpm в течение 3 часов (до достижения оптической плотности культуры  $OD_{600}=0,6$ ). Отбирали 20 мкл культуры для SDS-ПААГ электрофореза. Далее вносили ИПТГ до конечной концентрации 0,1; 0,5 и 1 мМ и выращивали на качалке в течение 4 часов при 25 °С и 37 °С. Отбирали 20 мкл культуры для SDS-ПААГ электрофореза. SDS-ПААГ электрофорез проводили по стандартной методике [28] с последующей обработкой SDS-ПААГ электрофореграмм для денситометрической оценки выхода слитого белка при помощи соответствующего программного обеспечения (GeneTool, SynGene).

### **2.3.5.10 Индукция экспрессии белка слияния**

рНЛIP экспрессировали в составе белка слияния с тиоредоксином (Trx-рНЛIP).

Экспрессию пептида в составе белка слияния проводили в бактериальной системе *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Для этого трансформированную колонию с чашки Петри пересаживали в 5 мл LB-среды с добавлением ампициллина и инкубировали в течение суток на качалке при температуре 37 °С и 200 rpm.

По истечении времени 50 мкл ночной культуры переносили в 50 мл LB-среды, инкубировали на качалке при 37 °С в течение 3 часов. Через три часа измеряли оптическую плотность. При достижении оптической плотности 0,5 добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ.

Белок экспрессировали в течение 4 часов при 25 °С. По окончании индукции пробы центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин при 4 °С. Культуральную жидкость удаляли, осадок замораживали.

#### **2.3.5.11 Приготовление осветлённого лизата**

Для разрушения клеточной стенки клетки подвергали циклу замораживания/размораживания и далее к суспензии клеток, ресуспендированных в лизирующем буфере с добавлением PMSF, ЭДТА, леупептина и глицерина в концентрации 100 мМ, 1 мМ, 1 мкг/мл, 20 % соответственно, добавляли лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл и обрабатывали ультразвуком на льду 6 циклов в течение 10 секунд с перерывом 10 секунд с использованием ультразвукового гомогенизатора (Bandelin Sonopuls). Полученный лизат клеток центрифугировали 20 минут при 10000 g 4 °С.

Далее белок, содержащийся в супернатанте, очищали методом металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы.

#### **2.3.5.12 Очистка белка на Ni-NTA агарозе (металл-хелатная аффинная хроматография)**

Для очистки белка использовали следующие буферы:

**Лизирующий** – 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол; рН 8.0

**Промывочный** – 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол; рН 8.0

**Элюирующий** – 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазол; рН 8.0

Для снижения неспецифического связывания имидазол добавлялся в лизирующий и промывочный буферы.

Предварительно Ni-NTA агарозу уравнивали лизирующим буфером, после чего смешивали с осветлённым лизатом в соотношении 2:1.

Инкубировали на мультиротаторе в течение одного часа при 4 °С и 500 rpm. Смесь наносили на колонку.

Для начала давали стечь фракции несвязавшихся белков. Затем колонку промывали восемью объемами (от исходного объема Ni-NTA агарозы) промывочного буфера и отбирали пробы для анализа методом SDS-ПААГ электрофореза.

Элюция белка проводилась элюирующим буфером по половине от объема Ni-NTA агарозы трёхкратно. Фракции элюатов собирали в пробирки. Из каждой пробирки отбирали пробы для анализа методом SDS-ПААГ электрофореза.

Эффективность очистки проверяли методом SDS-ПААГ электрофореза.

### 2.3.5.13 Анализ методом SDS-ПААГ электрофореза

Для анализа проб методом SDS-ПААГ электрофореза использовали камеру для вертикального электрофореза BioRad. Гель для электрофореза имел следующий состав (см. таблицу 2.2).

Таблица 2.2 — Состав полиакриламидного геля для электрофоретического анализа.

| Компонент                      | Разделяющий гель,<br>10 мл<br>(3.75M Tris, pH 8.8) | Концентрирующий<br>гель, 5 мл<br>(125M Tris, pH 6.8) |
|--------------------------------|--|--|
| Концентрация мономера, %       | 18   | 4  |
| Акриламид 30%, мл              | 6  | 650  |
| Вода дистиллированная, мл      | 1,29   | 3  |
| SDS 10%, мкл                   | 100  | 50   |
| 1.5M Tris HCl, pH 8.8, мл      | 2,5  | —  |
| 0.5M Tris HCl, pH 6.8, мл      | —  | 1,25   |
| Персульфат аммония 10%,<br>мкл | 100  | 50   |
| TEMED, мкл                     | 10   | 5  |

Электрофорез проводили в течение двух часов при напряжении 150 В и силе тока 40 мА. По окончании процесса гель фиксировали в течение 40 минут в 10% растворе трихлоруксусной кислоты. После фиксации гель помещали в окрашивающий раствор, содержащий изопропанол, ледяную уксусную кислоту, кумасси R-250 и воду и инкубировали в течение часа на шейкере. Затем краску отмывали в отмывочном буфере (изопропанол; ледяная уксусная кислота; вода) в течение суток.

#### **2.3.5.14 Диализ**

Полученный после очистки на Ni-NTA агарозе препарат белка диализовали против воды с использованием диализной мембраны 3500 MWCO (CelluSep, Канада) в течение двух суток (с заменой буфера каждые 24 часа) и третий раз через два часа.

После диализа очищенный белок замораживали на минус 80°C для последующей лиофилизации.

#### **2.3.5.15 Оценка чистоты и выхода белка**

Чистоту и выход слитого белка в процентном соотношении от тотального белка оценивали путем анализа SDS-ПААГ электрофореграммы, отсканированной специализированным программным обеспечением (GeneTool, SynGene), и согласно методике [29].

#### **2.3.5.16 Лиофилизация слитого белка Trx-pHLIP**

Полученные после очистки и диализа пробы белка лиофилизировали на лиофильной сушилке FreeZone 1 Benchtop Freeze Dry System (LabConco, США) при давлении 0,109 мБар и температуре минус 40 °С.

### 2.3.5.17 Разделение белка слияния при помощи бромциана

После лиофилизации белок растворяли в 100 мкл 75% муравьиной кислоты и добавляли бромциан, после чего инкубировали в темноте в течение суток. Для эффективного разделения белка слияния брали бромциан в 100-кратном молярном избытке относительно количества метионина, содержащегося в последовательности экспрессированного белка. Реакцию останавливали добавлением пятикратного избытка дистиллированной воды и проводили диализ против воды (используя диализную мембрану с размером пор 3500 кДа) со сменой воды дважды через 24 часа и третий раз через 2 часа. Диализированную пробу, содержащую пептид, замораживали на минус 80°C и лиофилизировали.

Анализ полученной смеси осуществляли методом трицин-ПААГ электрофореза.

### 2.3.5.18 Анализ методом трицин-ПААГ электрофореза

Для анализа образцов, содержащих пептиды, использовали метод трицин-ПААГ электрофореза. Состав геля, использованного для электрофореза, приведён в таблице 2.3.

Таблица 2.3 — Состав гелей для трицин-ПААГ электрофореза

| Компонент                       | Разделяющий гель | Концентрирующий гель |
|---------------------------------|------------------|----------------------|
| Разделяющий гель (сток), мл     | 3                | —                    |
| Концентрирующий гель (сток), мл | —                | 0,5                  |
| Вода дистиллированная, мл       | 2                | 4                    |
| SDS 10%, мкл                    | 90               | 45                   |
| Глицерин, мл                    | 0,95             | —                    |
| Буферный раствор, мл            | 3                | 1,5                  |
| Персульфат аммония 10%, мкл     | 90               | 60                   |
| TEMED, мкл                      | 9                | 6                    |

Электрофорез проводили при напряжении 100 В и силе тока 38 мА в течение 45 минут, далее процесс проводили при 15 мА в течение 5 часов. По окончании электрофореза гель помещали в раствор для фиксации (изопропанол; уксусная кислота; вода) на 30 минут. Окрашивание осуществляли в течение часа с использованием окрашивающего раствора (уксусная кислота; вода; кумасси R-250). Далее осуществляли отмывку в 10% уксусной кислоте в течение 2 часов с заменой раствора каждые 30 минут.

## **4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение**

В данной работе исследуется технология получения рекомбинантного рН-зависимого пептида рНLIP в бактериальной системе экспрессии.

В настоящее время все более актуальным становится вопрос о методах ранней диагностики онкологических заболеваний. Немаловажным фактором является доступность и дешевизна диагностических молекул, разработка более совершенных методов производства подобных веществ является перспективным направлением современной биотехнологии. Одной из таких молекул является рН-зависимый пептид рНLIP, который в настоящее время получают сложным и дорогим методом твердофазного синтеза [30].

В качестве экспрессионной системы выбрана бактерия *Escherichia coli*, поскольку данный микроорганизм хорошо размножается в лабораторных условиях и способен легко адаптироваться к неблагоприятным условиям, приобретая необходимые для исследования свойства [31].

### **4.1 Предпроектный анализ**

#### **4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования**

Отличительной чертой российского рынка медицинских диагностических услуг является превалирующая государственная форма собственности: на данный момент государственные учреждения контролируют порядка 90% рынка диагностических услуг. Тем не менее, в настоящее время Правительством РФ проводится серьезная работа по созданию нормативно-правовой базы в сфере обращения медицинских изделий. Другая характерная особенность — высокие показатели, которые демонстрирует динамика развития рынка платных медицинских диагностических услуг. На долю медицинской диагностики среди сегментов рынка частной медицины в России приходится около 10% рынка, более того,

как показали данные исследования Index Vox, прирост рынка платной лабораторной диагностики составляет ежегодно почти 50%.

Доступность диагностических услуг в России и странах Центральной и Восточной Европы ограничена для населения, что рождает ряд проблем, особенно для коммерческих лечебных учреждений. Альтернативные модели финансирования, предлагаемые поставщиками медицинского оборудования, а также поддержка частно-государственного партнёрства на национальном уровне будут стимулировать рост на этом рынке.

На основании вышеизложенного с учётом бурного роста информационных технологий и уровня здравоохранения в РФ можно сделать вывод о перспективности данного рынка. В настоящее время большинство диагностических препаратов поставляется из-за рубежа, поэтому прогнозируется высокий спрос на отечественный препарат для ранней диагностики онкологии и других сложных отклонений.

#### **4.1.2 Диаграмма Исикавы**

Диаграмма причины-следствия Исикавы (Cause-and-Effect-Diagram) — графический метод анализа и формирования причинно-следственных связей, инструмент для систематического определения причин проблемы и последующего графического представления (Рисунок 4.1).

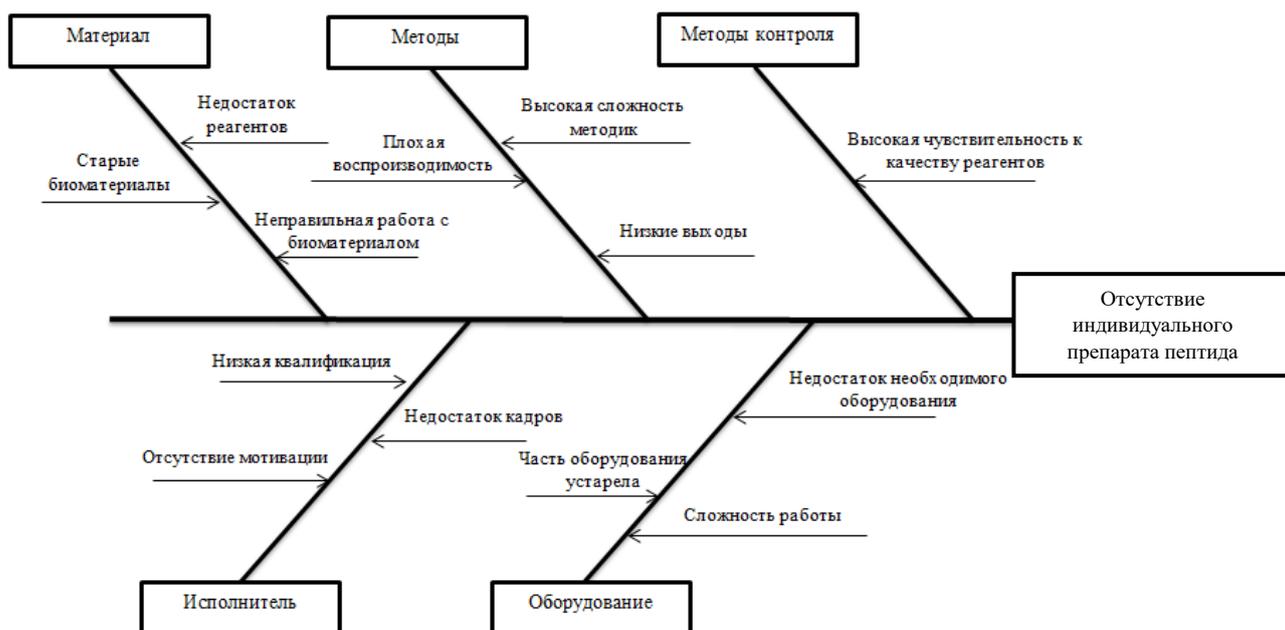


Рисунок 4.1 — Диаграмма Исикавы

### 4.1.3 Оценка готовности проекта к коммерциализации

На каждой стадии жизненного цикла научной разработки необходима оценка степени её готовности к коммерциализации, а также выяснение уровня знаний разработчика для её проведения и завершения. С этой целью была заполнена специальная форма, содержащая показатели о степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и компетенции разработчика научного проекта (Таблица 4.1).

Таблица 4.1 — Оценка готовности проекта к коммерциализации

| Наименование   | Степень проработанности проекта | Уровень знаний у разработчика |
|--|---------------------------------|-------------------------------|
| Определён имеющийся научно-технический задел                                     | 4                               | 4                             |
| Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела | 4                               | 4                             |
| Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке        | 5                               | 4                             |
| Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок  | 4                               | 4                             |
| Определены авторы и осуществлена охрана их прав                                  | 3                               | 3                             |

#### Продолжение таблицы 4.1

|   |    |    |
|---|----|----|
| Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности                         | 3  | 3  |
| Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта                                 | 3  | 3  |
| Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки                        | 2  | 2  |
| Определены пути продвижения научной разработки на рынок                           | 3  | 2  |
| Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки                       | 5  | 4  |
| Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок    | 4  | 3  |
| Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот | 3  | 2  |
| Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки            | 2  | 2  |
| Имеется команда для коммерциализации научной разработки                           | 3  | 3  |
| Проработан механизм реализации научного проекта                                   | 4  | 4  |
| Итого баллов  | 52 | 47 |

Оценка готовности научного проекта к коммерциализации (или уровень имеющихся знаний у разработчика) определяется по формуле:

$$B_{\text{сум}} = \sum B_i \quad (1)$$

$B_{\text{сум}}$  — суммарное количество баллов по каждому направлению;  
 $B_i$  — балл по  $i$ -му показателю.

Значение  $B_{\text{сум}}$  для проработки составило 52 балла, для уровня знаний разработчика — 47, следовательно, перспективность разработки выше среднего. Слабыми местами проекта являются бизнес-план и вопросы финансирования коммерциализации. Решением этой проблемы может стать повышение экономических компетенций разработчиков или включение в проектную группу экономиста.

#### **4.1.4 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования**

Коммерциализацию исследования планируется осуществлять и использованием метода продажи патентной лицензии. Производство конечного продукта на коммерческой основе требует масштабирования

процесса получения препарата, что сопряжено со значительными финансовыми затратами, а также требует наличия собственных производственных линий. Следовательно, наиболее простым способом коммерциализации проекта является продажа лицензии.

#### 4.1.5 Организационная структура проекта

Таблица 4.2 — состав рабочей группы, выполняющей проектное исследование

| № п/п | ФИО, основное место работы, должность | Роль в проекте  | Функции   | Трудовые затраты, час. |
|-------|---------------------------------------|---|---|------------------------|
| 1     | Першина Александра Геннадьевна        | Научный руководитель  | Осуществление детального планирования проекта, курирование выполняемых работ  | 100 часов              |
| 2     | Кабдеш Ильяс Муратулы                 | Исполнитель-магистрант  | Выполнение всех работ по проекту  | 2920 часов             |
| 3     | Бабушкина Надежда Петровна            | Внешний исполнитель — ДНК-секвенирование  | Подтверждение корректности клонированного фрагмента ДНК   | 24 часа                |
| 3     | Лущик Александр Яковлевич             | Внешний исполнитель — масс-спектрометрия; хроматография                               | Подтверждение структуры полученного пептида; Консультирование и проведение работ по выделению пептида из смеси              | 600 часов              |
| 5     | Креницына Зоя Васильевна              | Консультант раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» | Курирование выполнения раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» в магистерской диссертации | 2 часа                 |

#### Продолжение таблицы 4.2

|       |                                   |  |   |            |
|-------|-----------------------------------|--|---|------------|
| б     | Ахмеджанов<br>Рафик<br>Равильевич | Консультант раздела<br>«Социальная<br>ответственность» | Курирование<br>выполнения раздела<br>«Социальная<br>ответственность» в<br>магистерской<br>диссертации | 2 часа     |
| Итого |                                   |  |   | 3648 часов |

#### 4.2 Планирование управления научно-техническим проектом

Группа процессов планирования включает в себя процессы, необходимые для определения содержания работ, уточнения целей, а также разработки последовательности необходимых для достижения поставленных целей действий.

Диаграмма Гантта — тип столбчатых диаграмм (гистограмм), который используется для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме представляются протяжёнными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ

| Вид работ  | Исполнители              | Т <sub>к</sub> , дни | сен | окт | ноя | дек | янв | фев | мар | апр | май | июн |
|--|--------------------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Определение целей и задач, разработка плана, дизайн исследования             | Руководитель, магистрант | 7                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Клонирование кодирующей пептид последовательности в плазмидную ДНК           | Магистрант               | 21                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Подтверждение корректности клонированного фрагмента ДНК                      | Внешний исполнитель      | 28                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Оценка количества экспрессируемого белка «тиоредоксин-pHLIP»                 | Магистрант               | 70                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Оптимизация методов выделения химерного белка «тиоредоксин-pHLIP»            | Магистрант               | 49                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Подтверждение структуры пептида; Хроматографическая очистка пептида из смеси | Внешний исполнитель      | 14                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Анализ результатов, составление отчётов                                      | Руководитель, магистрант | 28                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Написание диссертации  | Магистрант               | 56                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Рисунок 4.2 — Календарный план-график проведения проекта по теме «Выбор экспрессионного вектора для получения рекомбинантного пептида pHLIP в клетках *E. coli*».

 работы, выполняемые магистрантом;

 работы, выполняемые руководителем.

### 4.3 Бюджет научного исследования

При планировании бюджета научного исследования необходимо обеспечить полное и достоверное отражение всех видов необходимых для его выполнения планируемых расходов.

#### 4.3.1 Сырьё, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты (за вычетом отходов)

Таблица 4.3 — Материальные затраты на получение целевого пептида с использованием рекомбинантных технологий.

| Наименование                        | Ед-ца измерения | Количество | Цена за ед-цу, руб. | Затраты на материалы, руб |
|-------------------------------------|-----------------|------------|---------------------|---------------------------|
| LB-среда                            | Кг              | 0,1 кг     | 5774                | 577,4                     |
| N-N'-метилден-бис-акриламид         | Г               | 4 г        | 55                  | 220                       |
| Ni-NTA-агароза                      | Мл              | 3 мл       | 846,65              | 2540                      |
| Акриламид                           | кг              | 0,1        | 170                 | 17                        |
| Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид | г               | 5 г        | 4239                | 21195                     |
| Лизоцим                             | кг              | 10 г       | 29500               | 295                       |
| Кумасси G-250                       | г               | 3          | 110                 | 330                       |
| Кумасси R-250                       | г               | 5          | 110                 | 550                       |
| Итого                               |                 |            |                     | 25848,1                   |

Общие материальные затраты исследования составили 75000 руб.

#### 4.3.2 Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

В рамках данной статьи приведены затраты на приобретение оборудования, необходимого для проведения работ по теме проекта, а также рассчитаны амортизационные отчисления.

Таблица 4.4 — Расчёт бюджета затрат на приобретение спецоборудования для научных работ.

| Наименование оборудования | Кол-во ед-ц, шт. | Цена ед. оборуд-я, руб. | Общая стоимо | Срок службы, лет | Амортизационные отчисления за |
|---------------------------|------------------|-------------------------|--------------|------------------|-------------------------------|
|---------------------------|------------------|-------------------------|--------------|------------------|-------------------------------|

|   |   |         | сть,<br>руб. |    | период работы,<br>руб. |
|---|---|---------|--------------|----|------------------------|
| Вортекс Microspin FV-2400   | 1 | 12780   | 12780        | 10 | 213,43                 |
| Твердотельный настольный термостат БИС*                                       | 1 | 4300    | 4300         | 10 | 4300                   |
| Термостат-инкубатор с естественной конвекцией Binder                          | 1 | 93340   | 93340        | 10 | 155,88                 |
| Спектрофотометр Unico   | 1 | 69000   | 69000        | 10 | 11152,3                |
| Источник питания и камера для вертикального электрофореза BioRad Mini-PROTEAN | 1 | 350000  | 350000       | 10 | 5845                   |
| Аналитические весы Ohaus Adventurer   | 1 | 68000   | 68000        | 10 | 1135,6                 |
| Лабораторная качалка с термостатом КТ 103*                                    | 1 | 12000   | 12000        | 10 | 12000                  |
| Ледогенератор PORKKA  | 1 | 70000   | 70000        | 10 | 1169                   |
| Центрифуга с охлаждением Sigma  | 1 | 36000   | 36000        | 10 | 601,2                  |
| Холодильник Бирюса*   | 1 | 15000   | 15000        | 10 | 15000                  |
| Холодильник низкотемпературный Sanyo  | 1 | 75000   | 75000        | 10 | 1252,5                 |
| Настольная центрифуга Eppendorf   | 1 | 56780   | 56780        | 10 | 948,23                 |
| Роторный шейкер Multi-Rotator*  | 1 | 15000   | 15000        | 10 | 15000                  |
| Система гель-документирования Syngene   | 1 | 180000  | 180000       | 10 | 300,6                  |
| Ультразвуковой гомогенизатор Vandelin Sonopuls HD 2070                        | 1 | 172100  | 172100       | 10 | 2874,07                |
| Магнитная мешалка Magnetic Stirrer MSH-300*                                   | 1 | 9500    | 9500         | 10 | 9500                   |
| Установка для лиофильной сушки FreeZone 1                                     | 1 | 418390  | 418390       | 10 | 6987,11                |
| Ламинарный шкаф   | 1 | 310000  | 310000       | 10 | 5177                   |
| Итого   |   | 2083190 | 2083190      |    | 85548,34               |

\* — оборудование не входит в основные фонды, вместо амортизационных отчислений учитывается полная стоимость.

Расчёт амортизационных отчислений осуществляется по формуле:

$$E_{\text{ам}} = \frac{\sum K_{\text{об}i} \cdot H_{\text{об}i} \cdot T_{\text{об}i}}{365 \cdot 100} \quad (2)$$

где  $K_{обі}$  — стоимость ед. прибора или оборудования, руб.;

$N_{амі}$  — норма амортизации прибора или оборудования, %;

$T_{обі}$  — время использования оборудования, дни.

### 4.3.3 Основная заработная плата

В настоящую статью включается основная заработная плата работников, непосредственно участвующих в исследовании, включая премии, доплаты и дополнительную заработную плату. Величину расходов по данной статье определяют с учётом трудоёмкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда.

Таблица 4.5 — Основная заработная плата исполнителей темы

| Исполнители     | Исполнители по категориям | Трудоёмкость, чел.-дн | Зар.плата, приходящаяся на один чел.-дн., тыс. руб. | Всего заработная плата по тарифу (окладам), руб. |
|-----------------|---------------------------|-----------------------|---|--|
| Магистрант      |                           | 273                   | 0,098   | 27000  |
| Руководитель    | к.б.н., доцент            | 68                    | 2,165   | 147220   |
| По экономике    | доцент, к.т.н.            | 7,5                   | 1,821   | 13657,5  |
| По охране труда | профессор, д.б.н.         | 7,5                   | 1,821   | 13657,5  |
| По ин.яз.       | ст. преп.                 | 7,5                   | 1,821   | 13657,5  |
| Итого           |                           |                       |   | 211597,5   |

Основная заработная плата ( $Z_{осн}$ ) руководителя от ТПУ рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_p \quad (3)$$

где  $Z_{осн}$  — основная заработная плата одного работника;

$T_p$  — продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

$Z_{дн}$  — среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \cdot M}{F_{\text{д}}} \quad (4)$$

где  $Z_{\text{м}}$  – месячный должностной оклад работника, руб.;

$M$  — количество месяцев работы без отпуска в течение года:

при отпуске в 48 раб. дней  $M=10,4$  месяца, 6-дневная неделя;

$F_{\text{д}}$  — действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн.

Таблица 4.6 — Баланс рабочего времени

| Показатели рабочего времени                  | Руководитель | Консультанты |
|--|--------------|--------------|
| Календарное число дней                       | 365          | 365          |
| Количество нерабочих дней                    |              |              |
| - выходные дни                               | 52           | 46           |
| - праздничные дни                            | 14           | 12           |
| Потери рабочего времени                      |              |              |
| - отпуск                                     | 48           | 48           |
| - невыходы по болезни                        | 0            | 0            |
| Действительный годовой фонд рабочего времени | 251          | 251          |

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_{\text{м}} = Z_{\text{тс}} \cdot (1 + k_{\text{пр}} + k_{\text{д}}) \cdot k_{\text{р}} \quad (5)$$

где  $Z_{\text{тс}}$  – заработная плата по тарифной ставке, руб.;  $k_{\text{пр}}$  – премиальный коэффициент, равный 0,3 (т.е. 30% от  $Z_{\text{тс}}$ );  $k_{\text{д}}$  – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2;  $k_{\text{р}}$  – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Результаты расчёта фонда заработной платы производственных рабочих вносятся в таблицу 4.7.

Таблица 4.7 — Расчёт фонда заработной платы

| Исполнители                       | Категория                | З <sub>тс</sub> ,<br>руб. | k <sub>пр</sub> | k <sub>д</sub> | k <sub>р</sub> | З <sub>м</sub> ,<br>руб | З <sub>дн</sub> ,<br>руб. | Т <sub>р</sub> ,<br>раб.<br>дн. | З <sub>осн</sub> ,<br>руб. |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------|----------------|----------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Магистрант                        |                          | 2250                      | 0,3             | 0,2            | 1,3            | 4563                    | 0,098                     | 273                             | 27000                      |
| Руководитель                      | к.б.н,<br>с.н.с.         | 24903,8                   | 0,3             | 0,2            | 1,3            | 48562,5                 | 2165                      | 68                              | 147220                     |
| Консультант<br>по экономике       | Доцент,<br>к.т.н.        | 23256,4                   | 0,3             | 0,2            | 1,3            | 45350                   | 1821                      | 7,5                             | 13657,5                    |
| Консультант<br>по охране<br>труда | профессор,<br>д.б.н.     | 23256,4                   | 0,3             | 0,2            | 1,3            | 45350                   | 1821                      | 7,5                             | 13657,5                    |
| Консультант<br>по англ. языку     | Старший<br>преподаватель | 23256,4                   | 0,3             | 0,2            | 1,3            | 45350                   | 1821                      | 7,5                             | 13657,5                    |
| Итого                             |                          |                           |                 |                |                |                         |                           |                                 | 215181                     |

#### 4.3.4 Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы учитывают величину предусмотренных Трудовым кодексом РФ доплат за отклонение от нормальных условий труда, а также выплат, связанных с обеспечением гарантий и компенсаций.

Расчет дополнительной заработной платы ведется по следующей формуле:

$$Z_{\text{доп}} = k_{\text{доп}} \cdot Z_{\text{осн}} \quad (6)$$

$$Z_{\text{доп.магистранта}} = 0,12 \cdot 27000 = 3240 \text{ руб}$$

$$Z_{\text{доп.руководителя}} = 0,12 \cdot 147220 = 17666,4 \text{ руб}$$

$$Z_{\text{доп.консультанта}} = 0,12 \cdot 13657,5 = 1638,9 \text{ руб}$$

где  $k_{\text{доп}}$  – коэффициент дополнительной заработной платы (на стадии проектирования принимается равным 0,12).

### 4.3.5 Отчисления на социальные нужды

Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется следующей формулой:

$$Z_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}), \quad (7)$$

где  $k_{\text{внеб}}$  – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный, фонд обязательного медицинского страхования и т.д.).

На 2015 г. в соответствии с Федеральным законом от 24.07.2009 №212-ФЗ установлен размер страховых взносов равный 30%. На основании пункта 1 ст.58 закона №212-ФЗ для учреждений, осуществляющих образовательную и научную деятельность, в 2014 году была введена пониженная ставка – 27,1% [32]. Таким образом,  $k_{\text{внеб}}$  принимается равным 0,271.

$$Z_{\text{внеб.}} = 0,271 * (147220 + 17666,4) = 44684 \text{ руб.}$$

Таким образом, величина отчислений составила 44684 рублей.

### 4.3.6 Накладные расходы

К накладным расходам относятся затраты на управление и хозяйственное обслуживание, а также расходы по содержанию, эксплуатации и ремонту оборудования, производственного инструмента и инвентаря, зданий, сооружений и др.

$$C_{\text{накл}} = k_{\text{накл}} * (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}), \quad (8)$$

где  $k_{\text{накл}}$  – коэффициент накладных расходов.

Коэффициент накладных расходов принимается равным 0,9

$$C_{\text{накл}} = 0,9 * (215181 + 22545,3) = 213953,67 \text{ руб.}$$

Таблица 4.8 — Бюджет научного исследования

| Наименование статьи  | Сумма, руб. |
|--|-------------|
| 1. Материальные затраты НТИ  | 75000       |
| 2. Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ | 2083190     |

|   |            |
|---|------------|
| 3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы       | 215191     |
| 4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы | 22545,3    |
| 5. Отчисления во внебюджетные фонды                             | 63335,8    |
| 6. Затраты на научные и производственные командировки           | 21159,75   |
| 8. Накладные расходы  | 213953,67  |
| Итого:  | 2787875,52 |

#### 4.4 Организационная структура проекта

В практике используется несколько базовых вариантов организационных структур: функциональная, проектная, матричная. Поскольку степень неопределённости условий реализации текущего проекта и его сложность являются высокими и в связи с новизной предлагаемой технологии данное исследование имеет проектную организационную структуру.



Рисунок 4.3 — Проектная структура проекта «Выбор экспрессионного вектора для получения рекомбинантного пептида rHLIP в клетках *E. coli*»

#### 4.5 Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проекта формируется матрица ответственности (таблица 4.15)

Таблица 4.9 — Матрица ответственности

| Этапы проекта  | Руководитель | Исполнитель-магистрант | Внешний исполнитель –<br>масс-спектрометрия | Внешний исполнитель –<br>ДНК-секвенирование | Внешний специалист –<br>хроматография | Консультант Финансовый<br>менеджмент | Консультант Социальная<br>ответственность | Консультант Английский<br>язык |
|--|--------------|------------------------|---|---|---------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------------|
| Обзор литературных источников, дизайн экспериментальной части                  | У,<br>С      | И                      |   |   |                                       |                                      |   |                                |
| Дизайн исследования определен  | У            | И                      |   |   |                                       |                                      |   |                                |
| Клонирование пептида рНЛIP в вектор для экспрессии в клетках <i>E.coli</i>     | У            | И                      |   |   |                                       |                                      |   |                                |
| Подтверждение корректности клонированного фрагмента ДНК                        | У            | С                      |   | И   |                                       |                                      |   |                                |
| Корректность фрагмента ДНК подтверждена  | У            | С                      |   |   |                                       |                                      |   |                                |
| Получение пептида рНЛIP в бактериальной системе экспрессии                     | У            | И                      |   |   | И                                     |                                      |   |                                |
| Подтверждение структуры полученного пептида                                    | У            | С                      | И   |   |                                       |                                      |   |                                |
| Структура пептида подтверждена   | У            | С                      |   |   |                                       |                                      |   |                                |
| Оформление экспериментальной части -<br>написание раздела «Материалы и методы» | У            | И                      |   |   |                                       |                                      |   |                                |

|  |  |   |  |  |  |   |   |   |
|--|--|---|--|--|--|---|---|---|
| Написание раздела «Финансовый менеджмент»      |  | И |  |  |  | У |   |   |
| Написание раздела "Социальная ответственность» |  | И |  |  |  |   | У |   |
| Написание раздела на английском языке          |  | И |  |  |  |   |   | У |

Степень участия в проекте может характеризоваться следующим образом:

- *Ответственный (О)* — лицо, отвечающее за реализацию этапа проекта и контролирующее его ход;
- *Исполнитель (И)* — лицо (лица), выполняющие работы в рамках этапа проекта;
- *Утверждающее лицо (У)* – лицо, осуществляющее утверждение результатов этапа проекта (если этап предусматривает утверждение);
- *Согласующее лицо (С)* – лицо, осуществляющее анализ результатов проекта и участвующее в принятии решения о соответствии результатов этапа требованиям.

#### 4.6 План управления коммуникациями

План управления коммуникациями отражает требования к коммуникациям со стороны участников проекта. Фрагмент плана приведён в таблице 4.17.

Таблица 4.10 — План управления коммуникациями проекта «Выбор экспрессионного вектора для получения рекомбинантного пептида рНЛIP в клетках *E. coli*».

| Какая информация передаётся | Кто передаёт информацию | Кому передаётся информация | Когда передаётся информацию |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|

|   |                                     |                                       |   |
|---|-------------------------------------|---------------------------------------|---|
| Дизайн исследования   | Исполнитель-магистрант              | Руководителю                          | В течение месяца после начала проекта               |
| Обмен информацией о текущем состоянии проекта                   | Исполнитель-магистрант              | Руководителю                          | Еженедельно (пятница)                               |
| Данные по анализу структуры полученного продукта                | Внешний исполнитель — спектрометрия | Руководителю, исполнителю-магистранту | В течение 3-х дней после выполнения задачи          |
| Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение | Исполнитель-магистрант              | Консультант Финансовый менеджмент     | Не позже двух недель до завершающей вехи по проекту |

#### 4.7 Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включают в себя возможные неопределённые события, которые могут возникнуть в проекте и привести к нежелательным последствиям.

Таблица 4.11 — Реестр возможных рисков проекта

| Риск   | Потенциальное воздействие                         | Вероятность наступления (1-5) | Влияние риска (1-5) | Уровень риска | Способы смягчения риска                          |
|--|---|-------------------------------|---------------------|---------------|--|
| Низкий выход целевого продукта                         | Удорожание проекта, повышение трудоёмкости        | 3                             | 5                   | высокий       | Оптимизация условий экспрессии целевого продукта |
| Загрязнение пептида присутствующими в клетке белками   | Снижение эффективности диагностического препарата | 3                             | 5                   | средний       | Подбор оптимальных условий очистки               |
| Отсутствие финансовой поддержки следующего этапа работ | Невозможность выполнения отдельных работ          | 3                             | 4                   | средний       | Тщательное планирование бюджета исследования     |

#### 4.8 Оценка сравнительной эффективности исследования

Определение эффективности осуществляют на основе расчёта интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Интегральный показатель финансовой эффективности научного исследования получают в ходе оценки бюджета затрат трёх (или более) вариантов исполнения научного исследования. Для этого наибольший интегральный показатель реализации технической задачи принимается за базу расчёта (как знаменатель), с которым соотносятся финансовые значения по всем вариантам исполнения.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется по формуле:

$$I_{\Phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}}, \quad (9)$$

где  $I_{\Phi}^p$  – интегральный финансовый показатель разработки;  $\Phi_{pi}$  – стоимость  $i$ -варианта исполнения;  $\Phi_{max}$  – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т. ч. аналогов).

Таблица 4.12 — Сравнение интегральных показателей разработки

| Вариант выполнения                | Бюджет затрат НИИ, руб | Интегральный финансовый показатель разработки |
|-----------------------------------|------------------------|---|
| 1 – предлагаемая технология       | 2 787 875,52           | 0,19  |
| 2 – химический синтез             | 10 884 749             | 0,74  |
| 3 – выделение из природного сырья | 14 694 411 (max)       | 1   |

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах (значение больше единицы), либо соответствующее

численное удешевление стоимости разработки в разгах (значение меньше единицы, но больше нуля).

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p, \quad (10)$$

где  $I_m$  – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов;  $a_i$  – весовой коэффициент  $i$ -го параметра;  $b_i^a, b_i^p$  – бальная оценка  $i$ -го параметра для аналога и разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;  $n$  – число параметров сравнения.

Таблица 4.13 — Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта.

| ПО<br>Критерии                            | Весовой коэффициент параметра | Текущий проект — рекомбинантные технологии | Химический синтез | Выделение из природных источников |
|---|-------------------------------|--|-------------------|-----------------------------------|
| 1. Стоимость                              | 0,25                          | 5  | 3                 | 1                                 |
| 2. Экологичность                          | 0,15                          | 4  | 2                 | 3                                 |
| 3. Возможность масштабирования технологии | 0,15                          | 5  | 2                 | 3                                 |
| 4. Трудоемкость                           | 0,20                          | 4  | 3                 | 1                                 |
| 5. Надёжность                             | 0,1                           | 5  | 3                 | 3                                 |
| Итого                                     | 1                             | 23   | 13                | 11                                |

$$I_{\text{ТП}} = 0,25 \cdot 5 + 0,15 \cdot 4 + 0,15 \cdot 5 + 0,2 \cdot 4 + 0,1 \cdot 5 = 3,9;$$

$$I_{\text{хим.синтез}} = 0,25 \cdot 3 + 0,15 \cdot 2 + 0,15 \cdot 2 + 0,2 \cdot 3 + 0,1 \cdot 3 = 2,25;$$

$$I_{\text{природн.ист}} = 0,25 \cdot 1 + 0,15 \cdot 3 + 0,15 \cdot 3 + 0,2 \cdot 1 + 0,1 \cdot 3 = 1,65.$$

Интегральный показатель эффективности разработки ( $I_{\text{финр}}^p$ ) и аналога ( $I_{\text{финр}}^a$ ) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{финр}^p = \frac{I_m^p}{I_\phi^p} \quad (11)$$

$$I_{финр}^a = \frac{I_m^a}{I_\phi^a} \quad (12)$$

$$I_{финр}^p = \frac{3,9}{0,19} = 20,53;$$

$$I_{финр}^a = \frac{2,25}{0,74} = 3,04.$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта. Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{ср} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^a}; \quad (13)$$

$$\mathcal{E}_{ср} = \frac{20,53}{3,04} = 3,47.$$

Таблица 4.14 — Сравнительная эффективность разработки.

| № п/п | Показатели  | Аналог | Разработка |
|-------|---|--------|------------|
| 1     | Интегральный финансовый показатель разработки           | 0,74   | 0,19       |
| 2     | Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки | 2,25   | 3,9        |
| 3     | Интегральный показатель эффективности                   | 3,04   | 20,53      |
| 4     | Сравнительная эффективность вариантов исполнения        | 6,75   |            |

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет установить намного более высокую эффективность проектируемой разработки по сравнению с существующими аналогами с позиции финансовой и ресурсной эффективности.

На основании проведенной сравнительной оценки характеристик проекта можно сделать вывод, что данный проект по сравнению с аналогом является более экономически выгодным и эффективным. Но стоит отметить, что проект нуждается в более детальной проработке, а также необходима более полная оценка возможных рисков и детализация затрат.

## **Список публикаций студента**

«Recombinant pH low insertion peptide synthesis», публикация тезисов в сборнике материалов Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ЦНИЛ СибГМУ «Molecules and systems for diagnostics and targeted therapy», Томск, 1-3 ноября 2017 года.

«Высокоэффективная экспрессия рекомбинантного пептида pHLP в составе белка-слияния с тиоредоксином», диплом II степени, публикация тезисов в сборнике материалов XIX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке», Томск, 21-24 мая 2018 года

# Приложения

## Приложение А

### Раздел 1 (Обзор литературы)

Студент:

| <b>Группа</b> | <b>ФИО</b>            | <b>Подпись</b> | <b>Дата</b> |
|---------------|-----------------------|----------------|-------------|
| 4ДМ61         | Кабдеш Ильяс Муратулы |                |             |

Консультант – лингвист отделения иностранных языков

| <b>Должность</b>                   | <b>ФИО</b>   | <b>Ученая степень, звание</b> | <b>Подпись</b> | <b>Дата</b> |
|------------------------------------|--------------|-------------------------------|----------------|-------------|
| Старший преподаватель отделения ИЯ | Кобзева Н.А. |                               |                |             |

## 1 Literature review

### 1.1 pH-low insertion peptide pHLIP for selective delivery to the tumor

Series of studies have shown that the extracellular pH of a cancer tumor is usually lower than in normal tissue, and a low pH contributes to invasive tumor growth in primary and metastatic cancer. The acidity increasing occurs mainly due to the transition of cancer cells to glycolysis, including due to hypoxia and following a decrease in blood flow, which is a characteristic phenotypic property of many cancer cells (Warburg effect). This physiological feature of tumors can be used for selective delivery to a tumor. pHLIP (pH-low-insertion-peptide) is a group of peptides obtained in 1971 from a spiral of bacteriorhodopsin isolated from the halobacterial cell membrane *Halobacterium halobium*. The peptide in various variations consists of 35-40 amino acids and its main property is the integration into the cell membrane at a low value of the hydrogen index (below 7.0) (Figure 1.1).

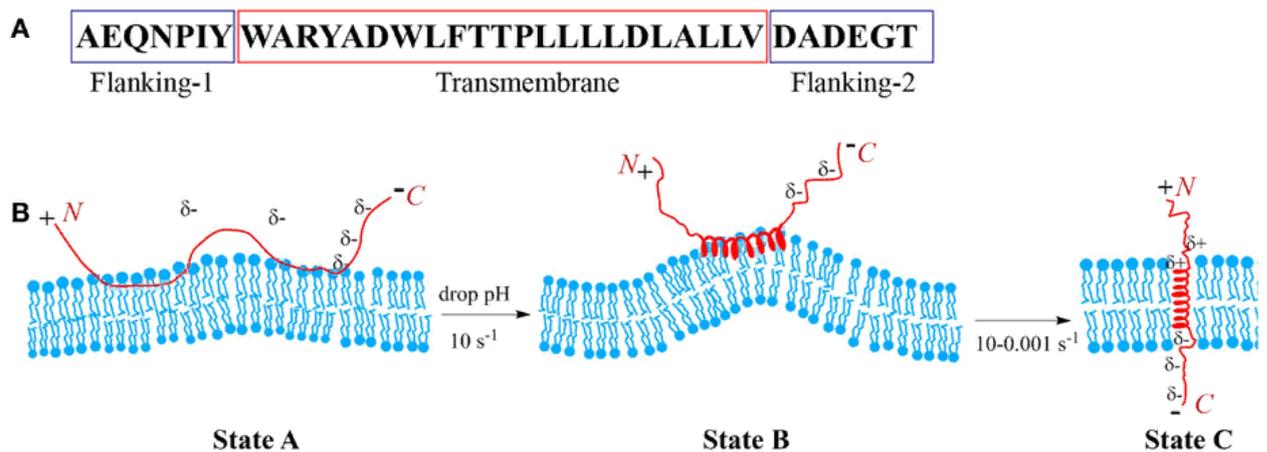


Figure 1.1 — The process of insertion of the pHLIP peptide into the plasmatic membrane

At the local acidification of the extracellular medium (pH below 7) - characteristic of many tumors - pHLIP changes its conformation due to the presence

in its structure of a large number of amino acid residues of glutamine and asparagine and inserts in the cell membrane.

The pH-dependent penetration of the pHLIP peptide into the cell, according to kinetic analysis data, occurs in several steps. The first and fastest (0.1 s) stage is the formation of an  $\alpha$ -helix, the second stage, much slower (100 s), is the formation of a ring for penetration into the membrane. The unfolding process and the transition of the peptide from the two-layer membrane, which can be caused by a rapid increase of pH from acidic to basic, occurs approximately 400 times faster than the processes of transition into the  $\alpha$ -helix, ring, or various intermediate states. Upon exiting the membrane, the spiral-ring transition is initiated, while the polypeptide continues to be inside the membrane. The peptide begins to come out when about 30% of the spiral unfolds and continues to exit much faster when the spiral begins to unfold inside the membrane.

Considering the earlier accumulated knowledge of the pH-induced passage of a pH-dependent peptide with the formation of a spiral through lipid bilayers, it is vastly promising to consider the peptide pHLIP as a vector molecule. Attaching a marker to the pHLIP peptide can be carried out both to the C-terminus and to the N-terminus.

The transfer inside the cell through the lipid bilayer occurs at a low pH, so the nanoconjugate, the contrast label or directly the preparation with the pHLIP peptide can only penetrate cells that are under local acidosis. Currently, developed to create the conjugates with the pHLIP peptide for the selective delivery of therapeutic molecules and diagnostic imaging of tumors.

## **1.2 Solid-phase synthesis of pHLIP peptide**

Currently, pHLIP is produced by the solid-phase synthesis method (Figure 1.2). The carboxyl group of the N-protected C-terminal amino acid residue is attached to the solid support. After loading the first amino acid the desired peptide

sequence is synthesized linearly from the C-terminus to the N-terminus (strategy C-N) through repeated deactivation cycles of the  $\alpha$ -amino group and the amino acid coupling reactions.

The functional groups of the side chains must be deactivated with permanent protecting groups stable under the coupling conditions of the amino acid residues at the peptide elongation. The  $\alpha$ -amino group is protected by a temporary protecting group (usually a urethane derivative) that can be easily removed under mild conditions that preserve the integrity of the peptide and reduce the epimerization rate.

After binding the excess reagents are filtered off and the reaction mixture is washed. The temporary N-terminal protecting group is removed and this allows the addition of the next amino acid residue protected by N-urethane by activation of its  $\alpha$ -carboxylic acid. This process (deprotection / binding) is repeated until the obtaining of desired sequence. In the final step, the peptide is released from the resin while removing the side chain protecting groups.

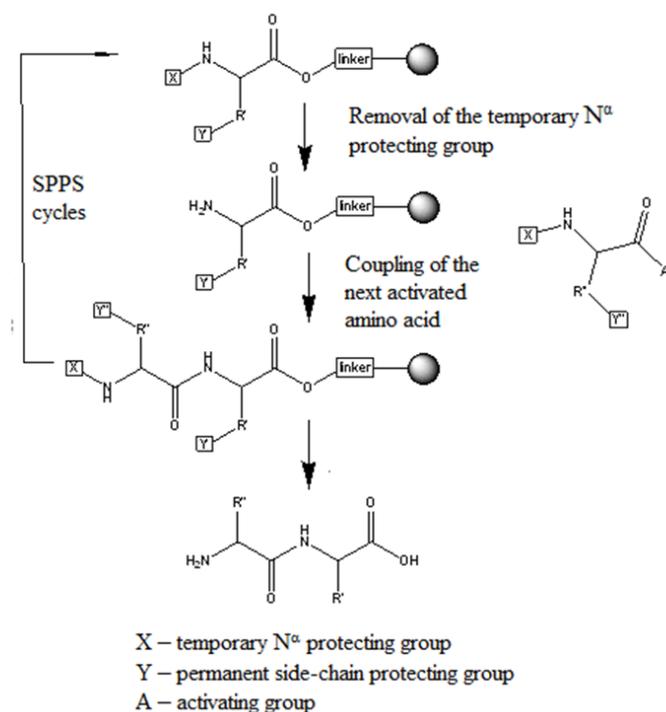


Figure 1.2 — Principle of solid phase peptide synthesis

Limitations of the SPPS method are high cost and reagents toxicity, contamination of the target product with products of adverse reactions and purifying complexity the target peptide are due to the fact that by-products are of a similar nature.

The genetically engineered method of obtaining peptides is economically advantageous. However, it is important to note that the recombinant technology of producing membrane peptides faces the problem of selecting a vector, a producer strain and optimizing the expression conditions.

### **1.3 Protein expression systems**

Nowadays most of medical proteins are obtained not from natural sources, but from the synthesis of their recombinant analogues. For this purpose are used various expression systems: bacterial (*E. coli*), yeast (*Saccharomyces cerevesiae*, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*), animal cells (Chinese hamster ovary cells, etc.), etc. This makes it possible to obtain on an industrial scale commercially available proteins that would not be possible to obtain in sufficient quantities by traditional extraction methods (for example, insulin or human growth hormone).

The production of recombinant proteins is based on recombinant DNA technology involving the cloning of a target gene encoding a pharmaceutically valuable (target) protein and its transfer to producer cells in which the target protein will be synthesized. For bacterial expression systems inherent simplicity of genetic engineering manipulations, the high rate of cell division, the significant biomass yield, the high level of expression of recombinant proteins and the possibility of large-scale protein production in bioreactors.

Along with this the prokaryotic cell is not able to perform many post-translational modifications of the synthesized recombinant protein, including, first of all, its glycosylation and the correct formation of disulfide bonds. It should be noted that incorrect posttranslational modifications or their absence may to some

extent affect the properties of the recombinant protein, including its biological activity and pharmacokinetics. Thus, prokaryotic expression systems are used primarily for the synthesis of relatively simple therapeutic proteins, such as insulin, interferon or human growth hormone.

Also important is the step of isolating the recombinant protein synthesized in the prokaryotic expression system, because this stage is associated with purification of the target product from pyrogenic endotoxins and other metabolic products of bacterial cells in the culture. On average, the yield of the recombinant protein in the bacterial expression system is from 20 to 400 mg / L of the culture medium.

Near the human type, post-translational modifications of the recombinant protein are carried out in expression systems based on mammalian cell cultures, but these systems are not without flaws. These include the high cost of cultivation, the difficulty of scaling the process and the risk of infection of the cell culture with human and animal pathogens.

The use of yeast for the production of recombinant proteins is often accompanied by incorrect posttranslational modifications associated with the formation of hyperglycosylated recombinant proteins.

The market for pharmaceutically valuable proteins is growing faster than the pharmaceutical market as a whole, and according to forecasts of experts will reach \$ 278.2 billion by 2020. The largest biotechnology and pharmaceutical companies show great interest and invest considerable funds in the development of scientific research on the development of new platforms for the production of recombinant proteins and their introduction into production.

The advantages, disadvantages and potential applications of some of the most widely used recombinant expression systems are shown in table (Application B).

## 1.4 Fusion proteins in recombinant technologies

A major benefit resulting from the advent of recombinant DNA technology has been the large-scale production of proteins of medical or industrial importance. The production of heterologous proteins in the bacterial expression system is currently the most accessible and simplified way of obtaining protein in large quantities. However, in the expression of certain proteins and peptides, researchers are confronted with problems associated with the proteolysis of the peptide / protein and its possible toxic effect on the producer (host cell).

To solve these problems, peptide expression is performed in their composition with fusion proteins, which present a complex of two or more genes that encode an individual protein each. Subsequently, the translation of this "fusion" gene leads to the synthesis of a protein that combines certain functional properties of individual source proteins. Thus, for the last decade using recombinant technologies, peptides-antagonists of  $\alpha v\beta 6$  integrin have been obtained, intended for diagnostics and targeted delivery to pancreatic and colon tumors. Targeting to the tumor in this case is realized due to high affinity interaction and is realized only in relation to tumor cells on the surface of which the integrin is overexpressed.

While production of heterologous proteins in bacterial hosts has been implemented successfully in the biotechnology industry, there are numerous instances where bacterial expression systems have given less than satisfactory results. For example, when high-expression levels are achieved, recombinant proteins are frequently expressed in *Escherichia coli* as insoluble protein aggregates termed "inclusion bodies" that have been the subject of many protein-folding studies, which have been reviewed. Although initial purification of inclusion body material by cell lysis and centrifugation is relatively simple, the agglomerated protein must be resolubilized by strong denaturants (urea, GuHCl); and the protein must be refolded to its correct three-dimensional conformation. The conditions for refolding the denatured protein must be optimized for each specific protein, and the

renaturation yield may be low even in an optimized system. Thus, it is often desirable to maximize the expression of the protein in completely soluble form, and thereby avoid the trial-and-error procedures required to develop an efficient refolding process.

Table 1.1 lists the main commercial and most effective fusion proteins with an estimate of their solubility.

Table 1.1 - Predicted solubility of the main available partner proteins

| Protein        | MW (kDa) | Amino acid length | Probability of solubility or insolubility |
|----------------|----------|-------------------|---|
| NusA           | 55.0     | 495               | 95% soluble                               |
| BFR            | 18.5     | 158               | 95% soluble                               |
| GrpE           | 21.7     | 197               | 92% soluble                               |
| Thioredoxin    | 11.7     | 109               | 73% soluble                               |
| DsbA           | 21.1     | 189               | 59% soluble                               |
| MBP            | 38.5     | 370               | 55% insoluble                             |
| GST            | 26.0     | 218               | 56% soluble                               |
| hIL-3          | 15.1     | 133               | 73% insoluble                             |
| bGH            | 21.6     | 189               | 85% insoluble                             |
| hIFN- $\gamma$ | 17.1     | 146               | 96% insoluble                             |

Currently, the most widely implemented carrier proteins for fusion protein expression in *E. coli* are *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase (GST), *E. coli* maltose-binding protein (MBP), and *E. coli* thioredoxin. GST and MBP were chosen as fusion partners because of the combined advantage of high-level expression and affinity purification; on the other hand, thioredoxin was chosen based on its high-level soluble protein expression. While these carrier proteins have resulted in the successful overexpression of many heterologous proteins in *E. coli*, each was discovered empirically.

In some cases, these tags double as affinity tags, not only facilitating soluble expression but also increasing the efficiency of protein purification. In other cases,

these solubility tags have been combined with a simple hexahistidine (His6) tag, allowing the fusion partner to maintain its solublizing functionality and also double as an affinity tag.

Table 1.2 - The most widely used polypeptides for purifying recombinant proteins

| Tag      | Protein                      | Affinity matrix    |
|----------|------------------------------|--------------------|
| His6     | Hexahistidine tag            | Metal chelates     |
| GST      | Glutathione S-transferase    | Glutathione        |
| MBP      | Maltose-binding protein      | Amylose            |
| FLAG     | FLAG tag peptide             | Anti-FLAG antibody |
| BAP      | Biotin acceptor peptide      | Avidin             |
| Strep-II | Streptavidin-binding peptide | Streptavidin       |
| CBP      | Calmodulin-binding peptide   | Calmodulin         |

However, in addition to the above-described fusion proteins increasing the solubility of the target polypeptide, at present, in practice, peptides also obtain in the fusion protein with ketosteroidisomerase (KSI), which provides the formation of insoluble aggregates. The amino acid sequence of this enzyme (KSI) was obtained from the bacterium *Pseudomonas testosteroni* and was subsequently modified as follows: five amino acid residues of aspartic acid were replaced by glutamic acid residues, which allowed the stability of the resulting fusion protein to acidic cleavage, while leaving its ability to form inclusion bodies. This approach is applicable for the synthesis of peptides, since in this case there is no need for refolding.

Thus, in spite of the wide experience of obtaining different peptides using different expression systems, the optimization task of obtaining a specific peptide is usually solved empirically.

In this regard, within the framework of the present work, we proposed to compare the expression efficiency and the level of pH-low insertion peptide yield in the fusion proteins with ketosteroidisomerase and thioredoxin, directing insoluble and soluble expression, respectively.

## 1.5 pET32a(+)

To obtain a genetic construct directing the synthesis of the pH-low insertion peptide pHLIP in the bacterial system, we chose the commercially available plasmid DNA pET32a (+) (Figure 1.2).

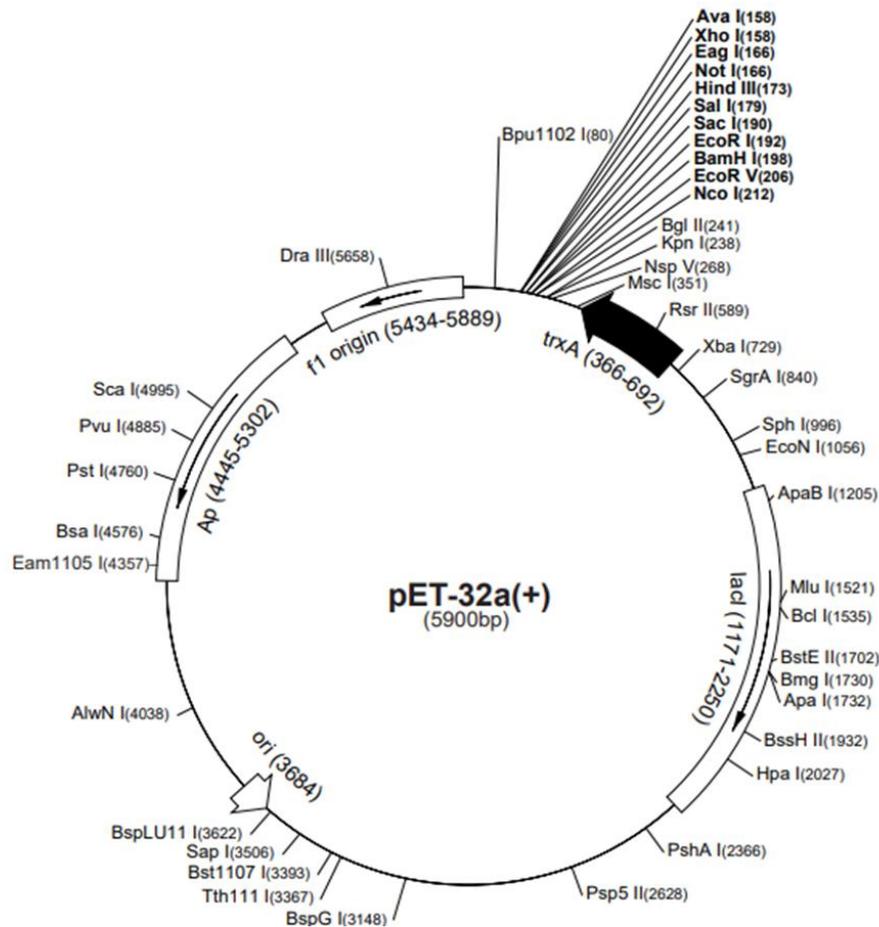


Figure 1.2 - Plasmid pET32a (+) and its structural elements

Plasmid DNA pET32a (+) is designed for high-efficiency expression of peptides in the fusion protein with thioredoxin at the N-terminus, the desired peptide at the C-terminus, and a sequence of six histidine blocks (6x His-tag) to purify the fusion protein using a metal chelate affinity chromatography. The advantage of this genetic construction is that the fusion partner thioredoxin (Trx) provides high expression, solubility and proper folding of the target protein. The presence of six

histidine residues in the thioredoxin / target protein structure facilitates its purification by affinity chromatography.

*E. coli* thioredoxin is a small protein, only 11.7 kDa, and can be expressed to high levels. The small size and capacity for high expression of the protein contributes to a high intracellular concentration. *E. coli* thioredoxin is further characterized by a very stable, tight structure which can minimize the effects on overall structural stability caused by fusion to the desired peptide or proteins.

The three dimensional structure of *E. coli* thioredoxin is known and contains several surface loops, including a unique active site loop between residues Cys<sub>33</sub> and Cys<sub>36</sub> which protrudes from the body of the protein. This active site loop is an identifiable, accessible surface loop region and is not involved in any interactions with the rest of the protein that contribute to overall structural stability.

To express the thioredoxin-pHLIP hybrid protein, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS strain was chosen to manipulate expression systems based on the late T7 bacteriophage promoter. This strain allows the expression of T7-RNA polymerase under the control of the lacUV5 promoter, which makes it possible to induce the expression of recombinant proteins by introducing IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside), a synthetic lactose analogue, a specific activator of the T7 promoter.

## Приложение В

### Основные характеристики различных систем экспрессии белков

| Экспрессионная система          | Преимущества   | Недостатки  | Приложения  | Производители   |
|---------------------------------|--|---|---|---|
| <i>Escherichia coli</i>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Потенциально очень высокие уровни экспрессии</li> <li>• Низкая стоимость</li> <li>• Простые условия культивирования</li> <li>• Быстрый рост</li> <li>• Простое преобразование протоколов</li> <li>• Свободны от эндотоксинов</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Неэффективное формирование дисульфидных связей</li> <li>• Возможное нарушение формирования белков в цитоплазме</li> <li>• Рефолдинг <i>in vitro</i> неэффективен</li> <li>• Кодоны отличаются от эукариотических</li> <li>• Минимальные пост-трансляционные модификации</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Очищенный белок (структура, энзимология, разработка лекарственных препаратов)</li> <li>• Белковая терапия</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Invitrogen / Life Technologies</li> <li>• EMD Millipore</li> <li>• New England Biolabs</li> <li>• Promega</li> <li>• Clontech</li> <li>• Avidis</li> </ul> |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокие уровни экспрессии</li> <li>• Возможность выбора между секретируемой и клеточной экспрессией</li> <li>• Низкая стоимость</li> <li>• Простые условия культуры</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Более низкая экспрессия, чем с <i>Pichia pastoris</i></li> <li>• Секреция ниже, чем у <i>Pichia pastoris</i></li> <li>• Гликозилирование различно в разных клетках млекопитающих</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Очищенный белок (структура, энзимология, разработка лекарственных препаратов)</li> <li>• Белковая терапия</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Invitrogen/Life Technologies</li> </ul>  |

|                        |  |  |   |  |
|------------------------|--|--|---|--|
|                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Способность выполнять большинство эукариотических пост-трансляционных модификаций</li> <li>• Эффективная укладка белков</li> <li>• Свободны от эндотоксинов</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Тенденция к гипергликозилированию белков</li> <li>• N-гликановые структуры считаются аллергенными</li> </ul>  |   |  |
| <i>Pichia pastoris</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокие уровни экспрессии</li> <li>• Низкая стоимость</li> <li>• Простые условия культивирования</li> <li>• Относительно быстрый рост</li> <li>• Возможность выбора между секретлируемой или внутриклеточной экспрессией</li> <li>• Секреция белка эффективна и позволяет простую очистку</li> <li>• Широкие пост-трансляционные</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• При использовании метанола в качестве индуктора следует учитывать правила техники безопасности по обращению с легко воспламеняющимися веществами</li> <li>• Гликозилирование еще различно в отношении клеток млекопитающих</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Очищенный белок (структура, энзимология, разработка лекарственных препаратов)</li> <li>• Белковая терапия</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Invitrogen/Life Technologies</li> </ul> |

|  |   |  |   |  |
|--|---|--|---|--|
|  | <p>модификации белков</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Эффективная укладка белков</li> <li>• N-гликозилирование схоже с гликозилированием у высших эукариот</li> <li>• Свободна от эндотоксинов</li> </ul>  |  |   |  |
| <p>Бакуловирус-инфицированные клетки насекомых</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Хорошие уровни экспрессии (особенно для внутриклеточных белков)</li> <li>• Относительно быстрый рост</li> <li>• Эффективная укладка белков</li> <li>• Умеренный масштаб измерения</li> <li>• Широкая пост-трансляционная модификация белков</li> <li>• Гликозилирование как в клетках млекопитающих</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Дорогая культуральная среда</li> <li>• Большие объемы вируса, необходимые на расширение исследований</li> <li>• Неэффективная обработка пропептидов в секреторном пути</li> <li>• Гликозилирование еще различно в отношении клеток млекопитающих</li> <li>• Вирусная инфекция приводит к лизису клеток и возможному ухудшению свойств экспрессируемых белков</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Очищенный белок (структура, энзимология, разработка лекарственных препаратов)</li> <li>• Белковая терапия</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Invitrogen/Life Technologies</li> <li>• Oxford Expression Technologies</li> <li>• BD Biosciences</li> <li>• Clontech</li> </ul> |

|                      |  |   |   |  |
|----------------------|--|---|---|--|
|                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Относительно легкое ферментативное гликозилирование белков</li> <li>• Свободны от эндотоксинов</li> </ul>   |   |   |  |
| Клетки млекопитающих | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Хороший уровень экспрессии</li> <li>• Умеренный масштаб измерения</li> <li>• Суспензионно-адаптированные клетки удобны для исследования</li> <li>• Эффективная укладка белков</li> <li>• Хорошо подходит для секретируемых белков</li> <li>• Все пост-трансляционные модификации</li> <li>• Свободны от эндотоксинов</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Дорогая культуральная среда</li> <li>• Сложные требования для роста</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Очищенный белок (структура, энзимология, лекарственные препараты)</li> <li>• Белковая терапия</li> <li>• Клеточные исследования</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Invitrogen/Life Technologies</li> <li>• EMD Millipore</li> <li>• Promega</li> <li>• Stratagene</li> </ul> |