

Е.С.Брилинская (6 курс, каф. БФ), М.Н.Берлов (ГУ НИИЭМ РАМН),
К.В.Соловьев, к.б.н., Н.А.Грудинина, к.б.н. (ГУ НИИЭМ РАМН),
В.В.Егоров, к.б.н. (ГУ НИИ гриппа РАМН)

ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА СЛИЯНИЯ ФРАГМЕНТА ЭКЗОНА 2 ГЕНА АЛЬФА–ЛАКТАЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА И ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА.

Амилоидозы — это группа конформационных заболеваний, при которых происходит потеря нативной конформации какого-либо белка, ведущая к образованию нерастворимых фибриллярных агрегатов. Свойства амилоидогенных белков в нативном состоянии различны: некоторые являются растворимыми олигомерами (например, транстиретин, фибриллогенез которого связан с развитием семейной амилоидной полинейропатии), другие не имеют выраженной пространственной структуры (амилоид-бета пептид, образующий фибриллы при болезни Альцгеймера). Для детекции амилоидогенных белков часто используют такие распространенные красители, как тиофлавин Т и Конго Ред. Но эти красители способны не только хорошо связываться с фибриллами, но и сами могут влиять на фибриллогенез. Таким образом, для изучения начальных стадий фибриллогенеза они не подходят.

К настоящему времени в клеточной биологии в качестве биологических маркеров интенсивно используются флуоресцентные белки. Один из таких белков, Зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescence Protein, GFP), не способен образовывать аномальные фибриллы, однако сохраняет способность к флуоресценции в условиях для фибриллогенеза некоторых белков.

В нашей лаборатории для изучения механизмов фибриллогенеза был выбран альфа-лактальбумин человека (АЛЧ) — один из белков молочной сыворотки. В ходе предыдущих исследований было показано, что фрагмент, кодируемый экзоном 2 гена АЛЧ, способен к фибриллогенезу *in vitro*. В предварительных экспериментах было показано, что добавление к АЛЧ пептида, гомологичного бета-домену АЛЧ, не предотвращает фибриллогенез этого белка, но приводит к уменьшению токсичности префибриллярных форм АЛЧ в отношении прокариот. Для изучения механизмов образования и структуры префибриллярных форм АЛЧ возникла необходимость в получении белка, способного к флуоресценции, но несущего фрагмент АЛЧ, участвующий в начальных этапах фибриллогенеза АЛЧ.

Целью данной работы являлось получение белка слияния фрагмента АЛЧ и GFP.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) получение генетической экспрессионной конструкции, кодирующей белок слияния фрагмента АЛЧ и GFP;

2) экспрессия полученной генетической конструкции.

Для создания такой конструкции был использован ген eGFP из коммерческой плазмиды eGFPN3, фрагмент экзона 2 гена АЛЧ, полученный с помощью ПЦР и коммерческая экспрессионная плазида pET22b(+). Было проведено наращивание и очистка плазмиды eGFPN3 в бактериальной системе. С целью получения гена, кодирующего eGFP, методом ПЦР, были подобраны праймеры для амплификации соответствующего участка плазмиды eGFPN3, содержащие сайты рестрикции для вставки в экспрессионный вектор pET22b(+). Протяженность продукта амплификации составила 720 п.н. После вставки полученного продукта амплификации в MCS pET22b(+) был получен вектор, способный экспрессировать eGFP (pET-GFP). Наличие вставки гена зеленого белка проверяли с помощью рестрикционного анализа. Направление вставки определяли по размеру продуктов ПЦР, проведенной со стандартным праймером к T7 промотору и одним из праймеров к eGFP. Были подобраны праймеры для амплификации фрагмента экзона 2 гена АЛЧ, несущие сайты

рестрикции для вставки его в полученную конструкцию. Протяженность амплифицируемого участка составила 173 п.н. Была проведена ПЦР с использованием таких праймеров, очистка полученного продукта и обработка его эндонуклеазами рестрикции. Полученный после рестрикции фрагмент очищали с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением ДНК на колонке и переосаждением. Протяженность такого участка составила 85 п.н. Подготовленный фрагмент АЛЧ был вставлен в MCS плазмиды рЕТ-GFP. Наличие вставки определяли с помощью анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов выделяемых плазмид. Таким образом, в результате работы была получена генетическая конструкция, содержащая последовательность ДНК, кодирующую белок слияния GFP и фрагмента АЛЧ, пригодная для последующей экспрессии такого белка в штамме BL21 *E.Coli*. Планируется провести секвенирование полученной конструкции и получение рекомбинантного белка для дальнейших исследований начальных стадий фибриллогенеза.