



School of Molecular and Theoretical Biology 2013

Лаборатория кристаллографии белка

Марчин Новотный
Елизавета Новак
Анна Потапова
Ульяна Швырева

Учащиеся: Валерия Шестакова

Мария Белова
Роман Раевский
Денис Литвинов



ВВЕДЕНИЕ

Кристаллография белка – метод расшифровки трехмерной структуры макромолекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты. Он позволяет понять механизм действия молекулы на атомном уровне. Кристаллография включает несколько этапов:

Клонирование → Экспрессия белка → Очистка белка → Кристаллизация белка → Рентгеноструктурный анализ белка

РЕЗУЛЬТАТЫ

Тестовые белки:

EIAV RT - обратная транскриптаза ретро-вируса животных

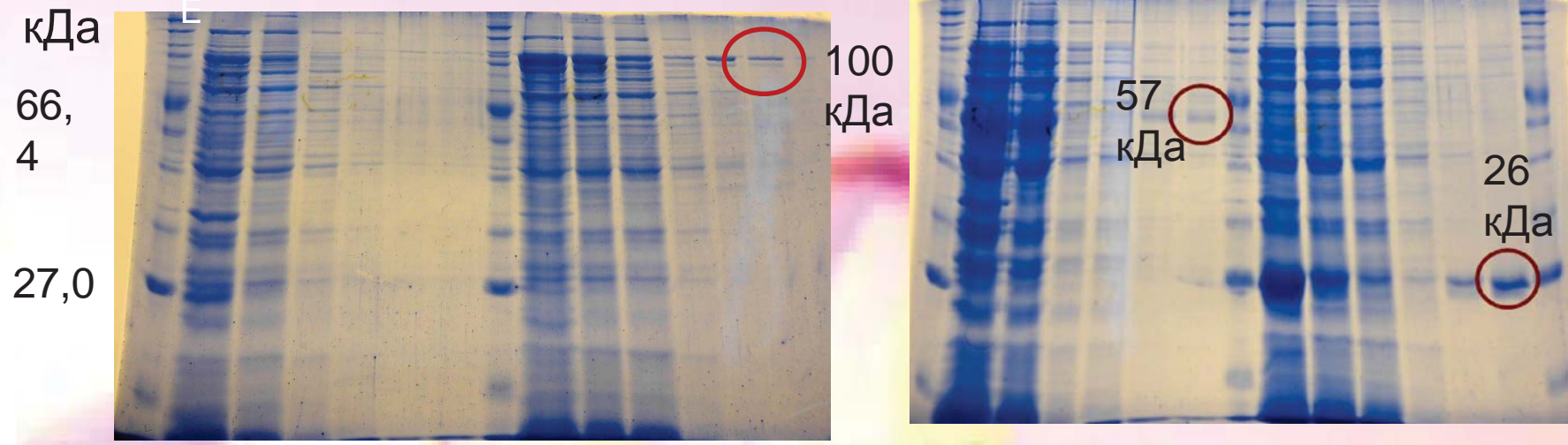
SUMO protease – высокоспецифичная протеаза часто используемая при очистки белков

Трансформация компетентных клеток **E. coli**, **RIL** и **Magic**

Очистка белков с помощью **Ni-NTA** колонок



RIL SUMO протеаза



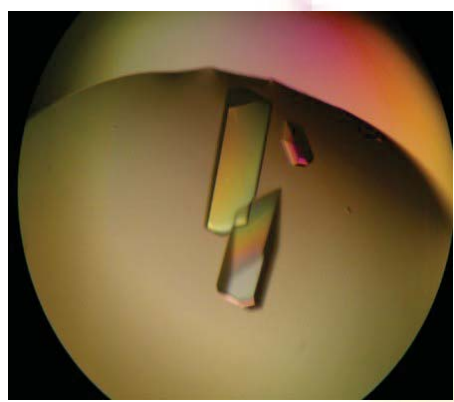
SUMO Protease (FL) RT EIAV EIAV (SL) RT SUMO Protease

M – маркеры молекулярного веса белков
L1 – суммарный клеточный лизат
L2 – растворимая фракция белков
NB – фракция белков не связавшихся с колонкой
W1 – промывка 20мМ раствором имидазола
W2 – промывка 60мМ раствором имидазола
E – элюирование белка связанного с колонкой 300мМ раствором имидазола

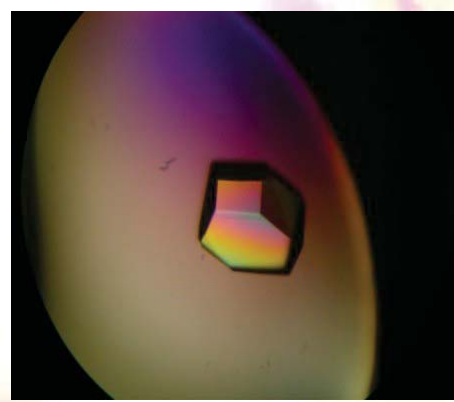
Кристаллизация белков была проведена с помощью **Hampton screens** “Crystal screen”, “Crystal cryo” и “Index1”:

Лизоцим, **RNAse H** (отдельно и в комплексе с гибридом РНК-ДНК)

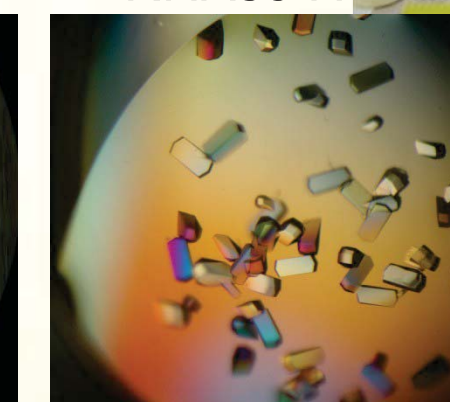
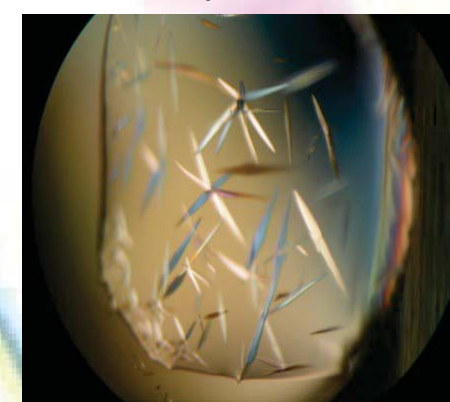
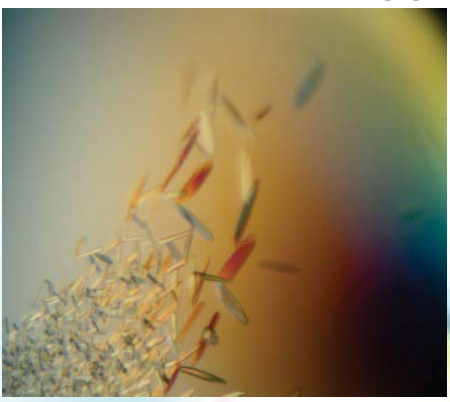
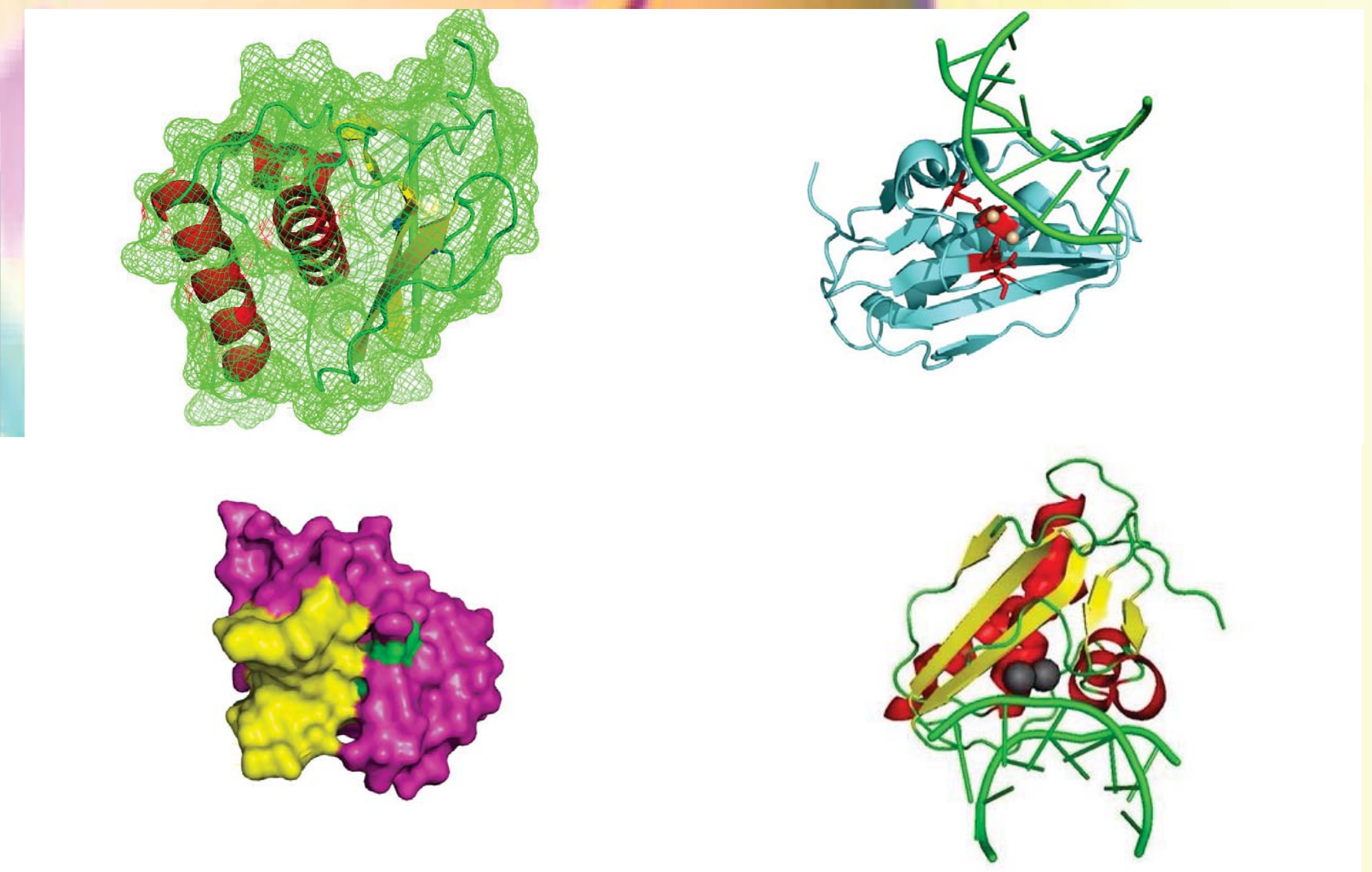
Построение трехмерной структуры **RNAse H** в комплексе с гибридом РНК-ДНК с использованием программы **Pymol**



RNAse H – RNA/DNA



RNAse H



Ранее не исследованные белки:

UvrC – главная нуклеаза системы репарации ДНК у бактерий

TnsB – каталитическая субъединица бактериальной транспозазы

PAN2-PAN3 – нуклеазный комплекс человека регулирующий экспрессию белков, удаляя поли-А конец мРНК

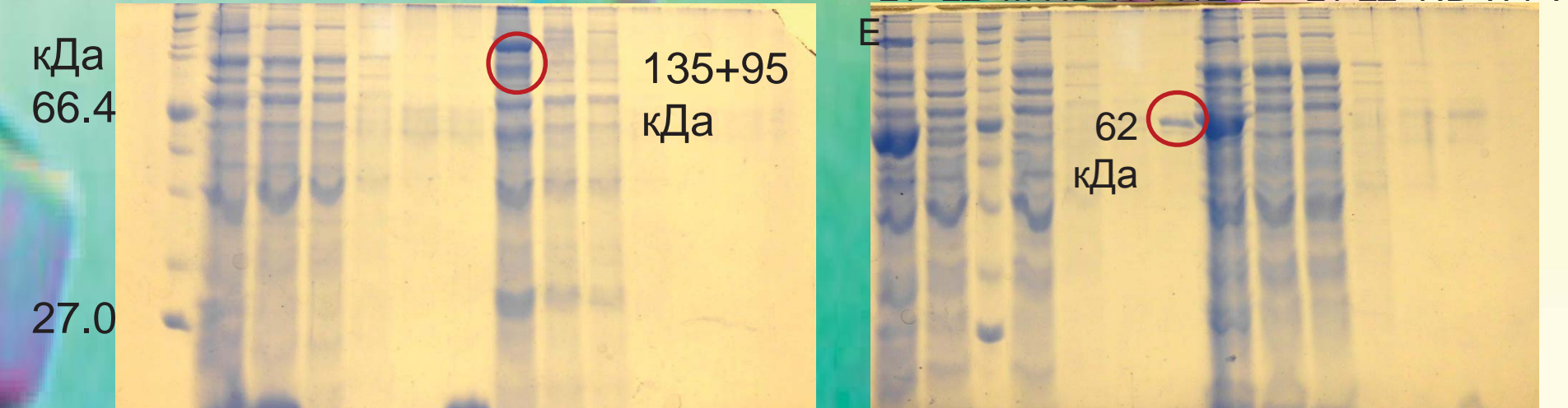
Blv – обратная транскриптаза бычьего вируса лейкемии

Трансформация компетентных клеток

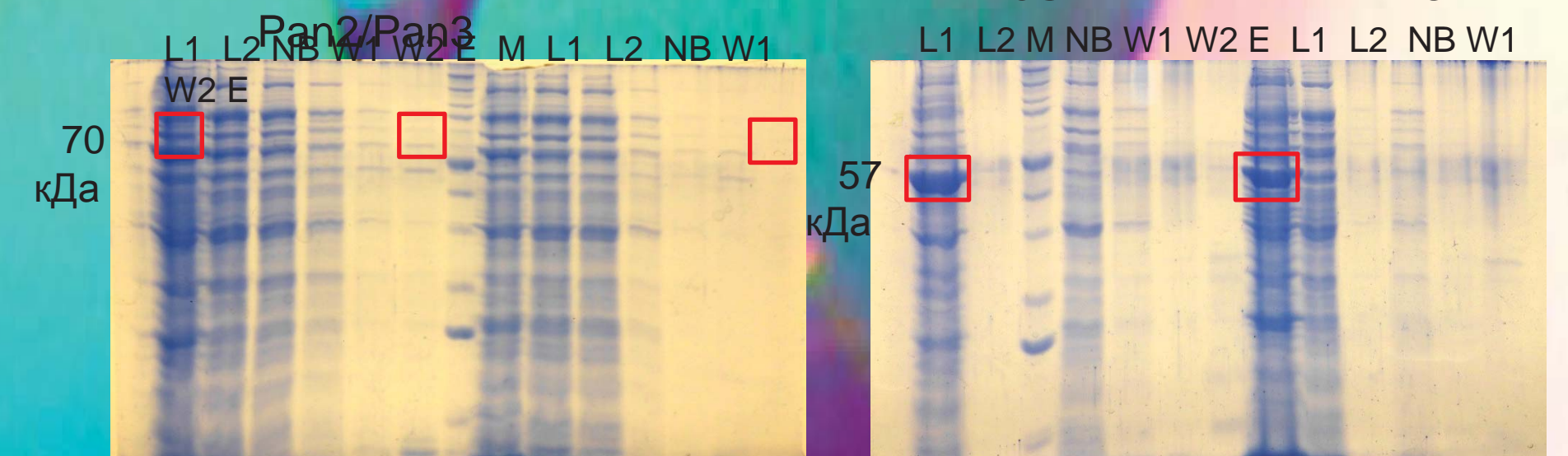
E. coli, **RIL**, **BL21** и **STAR**.

Очистка белков с помощью колонок с **Ni-NTA** агарозой

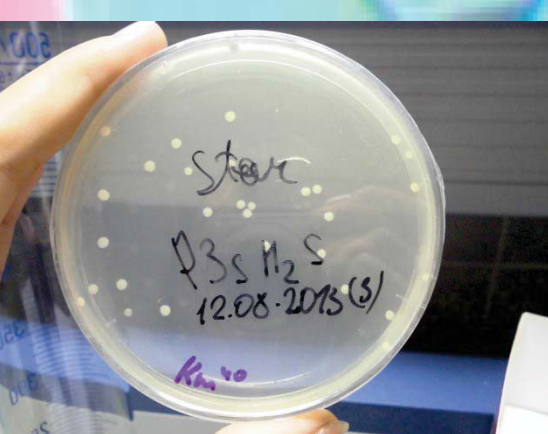
M L1 L2 NB W1 W2 E M L1 L2 NB W1 W2 E M L1 L2 NB W1 W2 E M L1 L2 NB W1 W2



UvrC P3S TmhC



Blv (BL21) Blv (RIL) TNRc (RIL) (BL21) TNRc



BL21 star PAN3

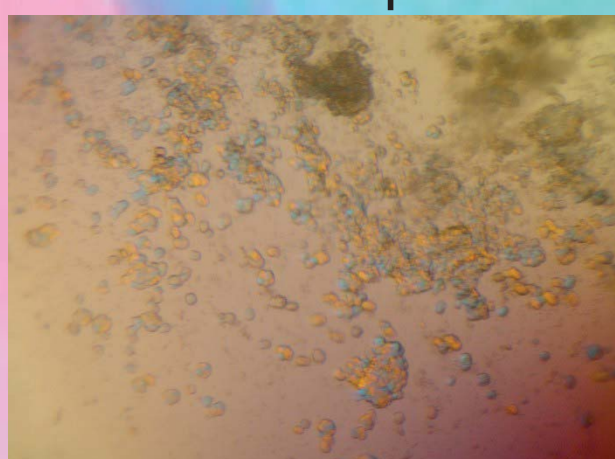


BL21 star PAN2-PAN3

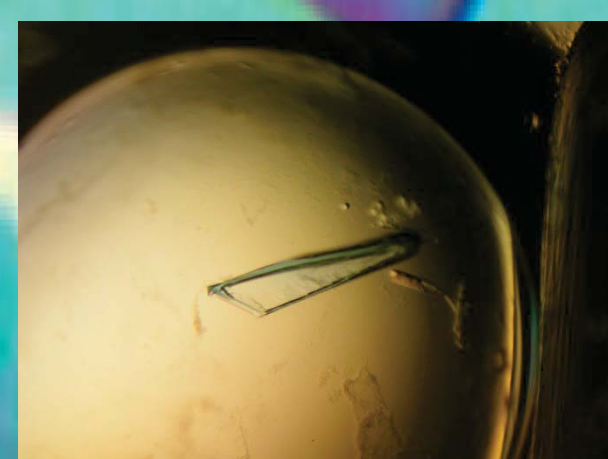


RIL UvrC

Кристаллизация



Кристаллы **PAN3**
(1,5 М сульфат аммония 0,1 М Tris pH 8.5 20% глицерин)



Кристалл **EIAV RT**
(0,1 М BICINE pH 9,0 2% 1,4 диоксан 10 % ПЭГ 20.000)

Выводы: А) по работе с тестовыми белками

1. Плазмиды тестируемых белков EIAV и SUMO были трансформированы в клетки E. Coli BL21* и RIL.
2. Экспрессия была получена при 37°C с индукцией 0,1 mM IPTG. SUMO, протеаза не экспрессируется в клетках E. coli BL21*.
3. EIAV и SUMO были очищены на никелевых колонках из 20 мл культуры.
4. Кристаллы лизоцима и RNAse H были получены с помощью наборов условий для кристаллизации белков Index, Cryo и Crystal от Hampton.
5. Модель RNAse H была получена с помощью программы Coot и изображения структуры белка были сделаны в программе Pymol.

Б) по работе ранее не тестированными белками

1. Плазмиды исследуемых белков были трансформированы в клетки E. Coli BL21* и RIL.
2. Экспрессия была получена при 37°C с индукцией 0,1 mM IPTG.
3. а) Pan3S был экспрессирован и очищен на никелевой колонке.
б) Pan2-Pan3 комплекс был экспрессирован, но оказался нерастворимым.
в) BLV был слабо экспрессирован в клетках и результат очистки неясен.
г) TnRC был экспрессирован, но оказался нерастворимым.
е) UvrC не был экспрессирован.
4. Кристаллизация новых белков привела к формированию микрокристаллов Pan3 и кристалла EIAV RT.