

Экспрессия и очистка мутантного варианта рекомбинантного белка основного фактора роста фибробластов FGF-2¹

Елистратов Павел Алексеевич²

Студент

*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия
E-mail: pohcho-1@yandex.ru*

Основной фактор роста фибробластов (FGF-2) принадлежит к большому семейству ростовых факторов фибробластов (24 члена). Он во многом определяет пролиферацию, дифференцировку и функциональные свойства клеток различного происхождения, стимулирует рост новых кровеносных сосудов, обеспечивает нормальное заживление ран и восстановление тканей.

FGF-2 содержит 4 остатка цистеина, которые не образуют межмолекулярных дисульфидных связей и два сайта фосфорилирования протеин-киназами А и С (серин-64 и треонин-112). Показано, что 78-й и 96-й остатки цистеинов находятся на внешней стороне белковой глобулы и могут способствовать образованию димерных и тетрамерных структур (Sheng Xiong et al., 2005). Согласно литературным данным, замена этих цистеинов на серины повышает выход экспрессии в 5 раз за счёт улучшения растворимости белка и на порядок увеличивает его биологическую активность (Ju Wang et al., 2006).

Методом сайт-специфического мутагенеза 78-й и 96-й остатки цистеина были заменены на остатки серина - в ген белка были последовательно введены соответствующие нуклеотидные замены. Мутированный ген был клонирован в экспрессирующий вектор рЕТ32а, которым были трансформированы клетки бактериального штамма *E.coli* BL21(DE3) для экспрессии мутантного слитного белка Ttx/FGF-2(C78SC96S) и его последующей очистки.

Ранее в нашей лаборатории уже была выработана методика для получения и очистки дикого типа рекомбинантного белка FGF-2. Белок FGF-2 экспрессировался в клетках *E.coli* в растворимом виде и впоследствии очищен.

Аналогичная методика экспрессии и очистки была применена и для мутантного белка FGF-2(C78SC96S). Мутантный белок экспрессировался в клетках *E.coli* в растворимом виде. Уровень экспрессии составил 0.6 г с литра. Слитный белок Ttx/FGF-2 (C78SC96S) был очищен от примесных белков методом аффинной хроматографии на колонке NiNTA, после чего был расщеплен энтеропептидазой и затем белок FGF-2 (C78SC96S) был окончательно отделён от тиоредоксина и остатков примесных белков на гепариновой сефарозе. Окончательно было очищено 7.5 мг белка со 100 мл клеток.

Дальнейшие исследования включают в себя проверку биологической активности белка FGF-2(C78SC96S) и сравнение его активности с активностью дикого типа.

¹ Работа выполнена в рамках исследований ИБХ РАН им. Шемякина и Овчинникова под руководством проф. Д.А.Долгих и М.Э.Гаспарян.

² Автор выражает глубокую признательность своим руководителям и коллегам за помощь и поддержку во время выполнения данной работы.