

МОСКОВСКАЯ ПРЕДПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ

Технологический сектор. Практика заключительного этапа ХимБиоТех

Получение рекомбинантного фермента

Пероксидаза – это фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз, который катализирует окисление различных субстратов с использованием перекиси водорода (H_2O_2) в качестве окислителя. Общая реакция, катализируемая пероксидазой, может быть представлена следующим образом:



В клетке пероксидаза играет важную роль в защите от окислительного стресса, разрушая токсичную перекись водорода и другие активные формы кислорода.

Пероксидаза широко используется в различных отраслях промышленности и медицины. В пищевой промышленности она применяется для улучшения качества хлебобулочных изделий и стабилизации соков. В медицине пероксидаза используется в диагностических тестах, таких как иммуноферментный анализ (ELISA), для обнаружения антител или антигенов. Кроме того, фермент находит применение в биотехнологии для синтеза биологически активных соединений и в экологии для очистки сточных вод от токсичных органических соединений.

Пероксидаза широко распространена в природе. Она обнаружена в растениях, грибах, бактериях и животных тканях. Наиболее известным источником пероксидазы является корень хрена (*Armoracia rusticana*), из которого фермент выделяют для промышленных целей. Однако природные источники часто не обеспечивают достаточного количества фермента, что делает актуальным использование рекомбинантных технологий для его получения. В качестве источника гена, кодирующего пероксидазу рассматривают не только хрен, но и другие растения, что позволяет получать белки с широким спектром свойств.

Рекомбинантное получение пероксидазы предполагает использование генетически модифицированных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli*, для синтеза фермента. Этот подход имеет ряд преимуществ:

- Высокая продуктивность: бактерии быстро растут и могут производить большое количество целевого белка.
- Контроль условий культивирования: процесс можно оптимизировать для максимального выхода фермента.
- Экономическая эффективность: использование бактерий дешевле, чем выделение фермента из природных источников.

Получение рекомбинантной пероксидазы состоит из следующих этапов:

Выделение гена: ген, кодирующий пероксидазу, выделяют из природного источника (например, растения или гриба) с помощью ПЦР.

Создание плазмиды: ген встраивают в плазмидный вектор, который содержит регуляторные элементы для экспрессии белка в *E. coli*.

Получение штамма-продуцента: плазмиду вводят в клетки *E. coli* с помощью трансформации, получая рекомбинантный штамм, способный синтезировать пероксидазу.

Культивирование продуцента и выделение биомассы: рекомбинантный штамм культивируют в питательной среде при оптимальных условиях (температура, аэрация, pH). После достижения достаточной плотности клеточной культуры биомассу собирают центрифугированием.

МОСКОВСКАЯ ПРЕДПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ

Технологический сектор. Практика заключительного этапа ХимБиоТех

Получение рекомбинантного фермента

Выделение фермента и анализ его активности: для выделения пероксидазы используют методы лизиса клеток (например, ультразвуком или ферментативно) с последующей очисткой белка с помощью хроматографии. Количество фермента определяют спектрофотометрически, а активность – с помощью ферментативных тестов, измеряя скорость окисления субстрата (например, люминола или гваякола) в присутствии H_2O_2 .

Этапы выполнения задания

1. Работа с объектом

- 1) Охарактеризуйте фермент пероксидазу: к какому классу ферментов она относится, какие реакции катализирует, где встречается в природе.
- 2) Проведите анализ белковых экстрактов растений на наличие пероксидазной активности (приложение 1).
- 3) На основе полученных данных определите, какое растение может служить источником гена пероксидазы помимо хрена.
- 4) Определите концентрацию белков в экстракте выбранного растения (приложение 2).

2. Параметры процесса

- 1) Опишите бактерию *Escherichia coli*, в которой будет проводиться экспрессия гена растительной пероксидазы, – к какой группе бактерий относится данный организм по типу метаболизма и потребности в питательных веществах, оптимальной температуре роста, по типу дыхания, по оптимальному pH культуральной среды.
- 2) Определите условия, в которых будет проводиться культивирование рекомбинантной бактерии *Escherichia coli*, несущей ген пероксидазы (питательная среда, температура и pH).

3. Технологическая схема

- 1) Укажите, какие стадии включает получение и очистка рекомбинантной пероксидазы в условиях лаборатории. Технологическая схема должна начинаться со штамма микроорганизма и плазмиды, содержащей ген целевого белка, и заканчиваться очищенным раствором белка.
- 2) Рассмотрите оборудование, которое используется для проведения каждой стадии.
- 3) Составьте технологическую схему получения продуцента рекомбинантной пероксидазы, культивирования продуцента и выделения и очистки белка из биомассы.

4. Оценка эффективности технологической схемы

- 1) Проанализируйте преимущества и недостатки использования рекомбинантного продуцента для получения пероксидазы.
- 2) Перечислите области, в которых может использоваться данный белок. Приведите конкретные примеры применения в каждой из областей.
- 3) Методом Бредфорда вы определили концентрацию белков в экстракте растительных тканей, содержащем пероксидазу. Пусть общий объем данного экстракта составлял 10 мл, и единственным белком в экстракте была пероксидаза, а экстракция проводилась из 100 мг растительных тканей. Сравните содержание пероксидазы в растительных тканях и в бактериальной биомассе при получении пероксидазы рекомбинантным методом, если из 100 мг бактериальной биомассы выделили пероксидазу методом, аналогичным методу для растительного сырья. Объем экстракта составил 10 мл, а при определении концентрации белков по Брэдфорду оптическая плотность ОП₅₉₅ экстракта составила 0,64.

МОСКОВСКАЯ ПРЕДПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ
Технологический сектор. Практика заключительного этапа ХимБиоТех
Получение рекомбинантного фермента

Приложение 1. Протокол выполнения экспериментальной части

Команда _____

ФИО участника _____

Перед вами 3 образца белковых экстрактов, полученных из растений: одуванчика, сои, березы, а также образец белкового экстракта корня хрена (положительный контроль, содержащий пероксидазу) и вода (отрицательный контроль, не содержит пероксидазу). Вам необходимо определить наличие пероксидазной активности в этих экстрактах, и затем в экстракте с наибольшей активностью определить концентрацию белков методом Бредфорда. Результаты экспериментов вам необходимо внести в таблицы 1 и 2, а затем рассчитать концентрацию белка в экстракте, пользуясь приложением 2.

Перед началом работы внимательно ознакомьтесь с методикой. Все работы в химической лаборатории необходимо проводить в халате (застегнутом), волосы следует собирать. Прием пищи в лаборатории запрещается.

Материалы и оборудование

Штатив

Экстракты растительных белков в пробирках типа Эппендорф (1 – вода, 2 – соя, 3 – береза, 4 – одуванчик, 5 – хрен)

Пробирки типа Эппендорф с 0,5 мл реакционной смеси для определения пероксидазной активности (H_2O_2 – 10 ммоль/л, гваякол – 25 ммоль/л) – 5 шт.

Пипетки Пастера градуированные – 2 шт.

Планишет 96-луночный с плоским дном – 1 шт.

Пипетка автоматическая на 200 мкл с наконечниками – 1 шт.

Фотометр планшетный – 1 шт.

Маркер

Методика выполнения работы

1. Определение пероксидазной активности

Подпишите пробирки с реакционной смесью для определения пероксидазной активности в соответствии с номером растительного экстракта.

В подписанные пробирки пипеткой добавьте по 1 мл соответствующего экстракта. Закройте пробирки, тщательно перемешайте их содержимое. Изменение окраски отметьте в таблице 1. По результатам наблюдений выберите растительный экстракт с наибольшей активностью пероксидазы. Экстракт хрена служит положительным контролем (в нем содержится пероксидаза), вода служит отрицательным контролем. Используйте выбранный экстракт для следующего эксперимента.

МОСКОВСКАЯ ПРЕДПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ
Технологический сектор. Практика заключительного этапа ХимБиоТех
Получение рекомбинантного фермента

Таблица 1. Определение пероксидазной активности растительных экстрактов.

Пробирка	Образец	Наблюдения за ходом реакции
1		
2		
3		
4		
5		

2. Определение концентрации белков в экстракте

Реакция с реагентом Бредфорда проводится в 96-луночном планшете, оптическая плотность образцов определяется при длине волны 595 нм на планшетном фотометре. Данные операции выполняет лаборант.

Пробирку с выбранным растительным экстрактом закройте и пройдите к столу для фотометрии. Лаборант перенесет 100 мкл экстракта в лунку планшета, добавит 100 мкл реагента Бредфорда и перемешает содержимое планшета. Запишите номер лунки в таблице 2.

После добавления всех растворов в планшет, лаборант определит оптическую плотность образцов при длине волны 595 нм ($ОП_{595}$). Запишите полученное значение в таблице 2.

Таблица 2. Результаты количественного определения белка методом Бредфорда.

Исследуемый экстракт	
Лунка планшета	
$ОП_{595}$	

МОСКОВСКАЯ ПРЕДПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ
Технологический сектор. Практика заключительного этапа ХимБиоТех
Получение рекомбинантного фермента

Приложение 2. Количественное определение белка методом Бредфорда

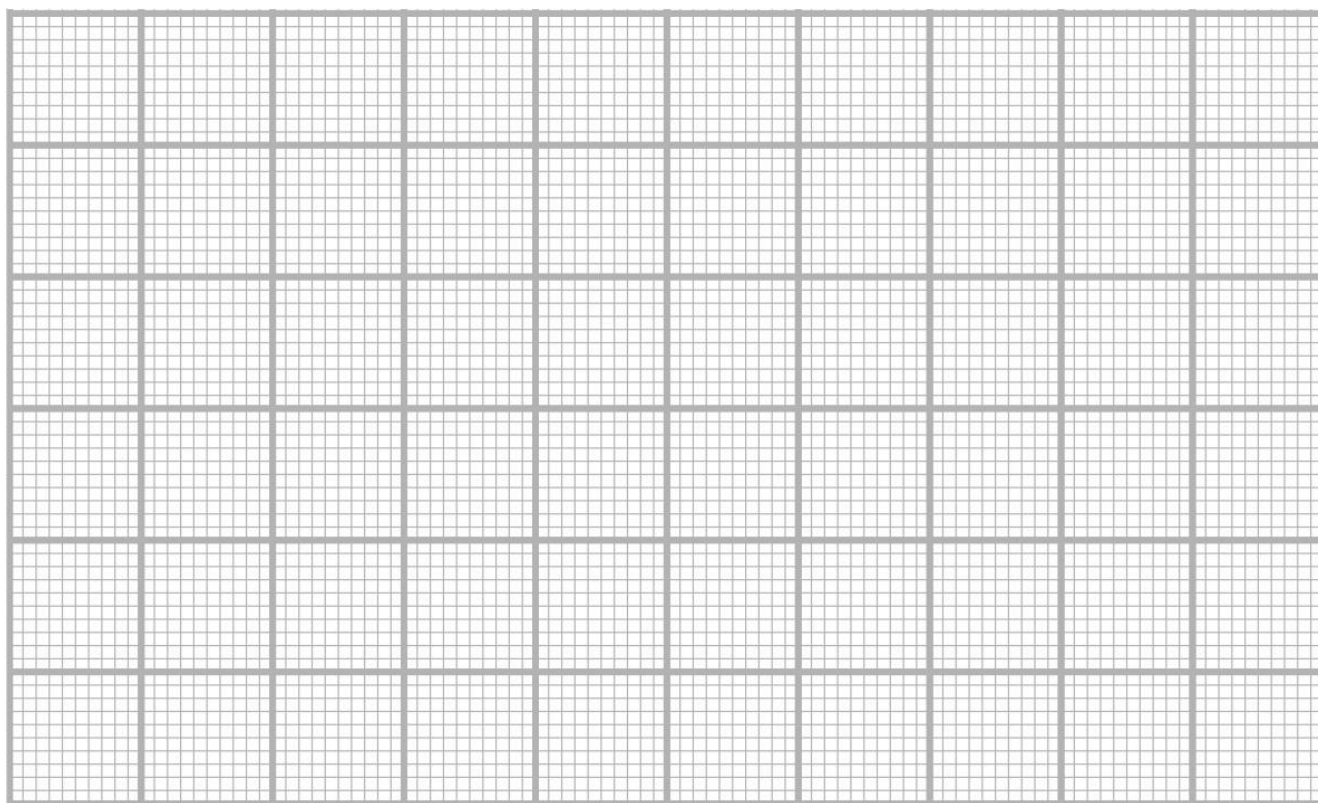
Метод Бредфорда – это широко используемый колориметрический метод для количественного определения белка в растворе. Он основан на взаимодействии белка с красителем бриллиантовым синим (Кумасси) G-250, который в кислой среде изменяет свой цвет с коричневого на синий при связывании с белком. Интенсивность окраски, выражаемая величиной оптической плотности (ОП), пропорциональна концентрации белка в образце.

Для применения данного метода необходимо построить калибровочную кривую. Для этого готовят растворы белка известной концентрации, проводят реакцию с реагентом Бредфорда и определяют оптическую плотность. По полученным данным строят зависимость концентрации белка от оптической плотности (ОП₅₉₅).

В таблице 1 представлены данные, полученные при калибровке метода Бредфорда. Постройте калибровочную кривую – график зависимости концентрации белка от оптической плотности образца (ОП₅₉₅). Определите концентрацию белка в растительном экстракте с наибольшей пероксидазной активностью.

Таблица 1. Данные для построения калибровочной кривой по методу Бредфорда.

С(белка), мкг/мл	0	5	10	15	20	25	30	40	50
ОП ₅₉₅	0,22	0,28	0,31	0,37	0,43	0,46	0,49	0,58	0,64



МОСКОВСКАЯ ПРЕДПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ
Технологический сектор. Практика заключительного этапа ХимБиоТех
Получение рекомбинантного фермента

Приложение 3. Требования к представлению решения кейса

Решение кейса оформить в виде постера формата А1 в соответствии с примером оформления.

Требования к оформлению постера:

1. В “шапке” или в углу постера указать название команды (в случае сборной команды указать все названия команд).
2. В “шапке” или в углу постера указать ФИО каждого ПРИСУТСТВУЮЩЕГО участника и его школу.
3. На постере необходимо отразить все этапы выполнения задания (тезисно/схематично).
4. Таблицу 1, таблицу 2 из Приложения 1 и график из Приложения 2 прикрепить к постеру как решение экспериментальной части.
5. При подготовке постера рекомендуется использовать схемы, таблицы, рисунки.
6. Не рекомендуется приводить на постере информацию, не имеющую отношения к решению кейса.
7. Сфотографировать постер, убедиться, что фотография хорошего качества и текст на ней читабелен.
8. Фотографию постера с решением загрузить по QR-коду ниже в папку с названием вашей команды.

Пример оформления постера

Название команды <i>(в случае сборной команды указать все названия команд)</i>	
ФИО, школа <i>(всех присутствующих участников команды)</i>	
Работа с объектом	Параметры процесса
Технологическая схема	
Анализ эффективности технологической схемы	

QR-код для загрузки постера

