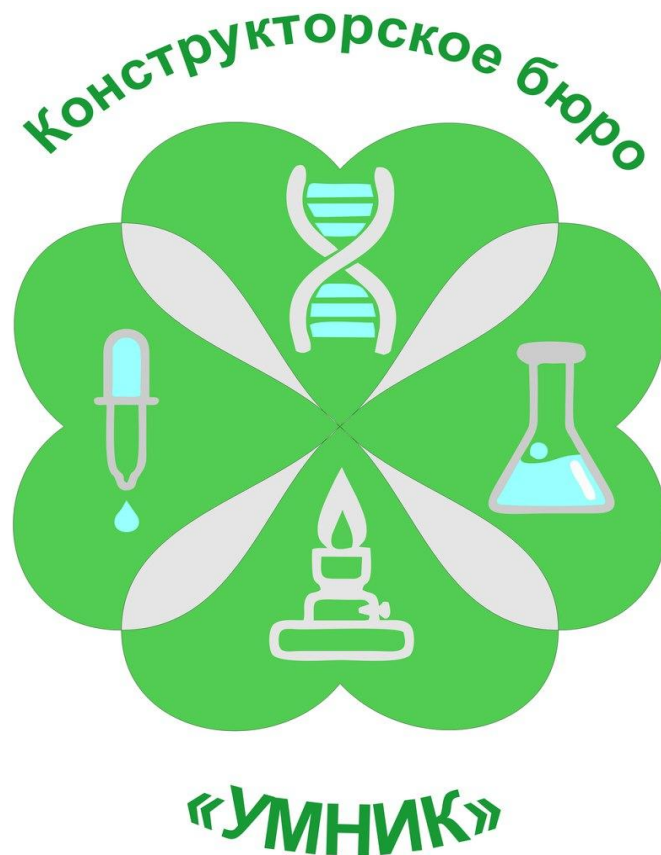


Материалы школы

https://vk.com/z_umnik



Как правильно построить научный эксперимент

Щербаков Д.Н.

Как не нужно строить научный эксперимент

Щербаков Д.Н.

Сыр



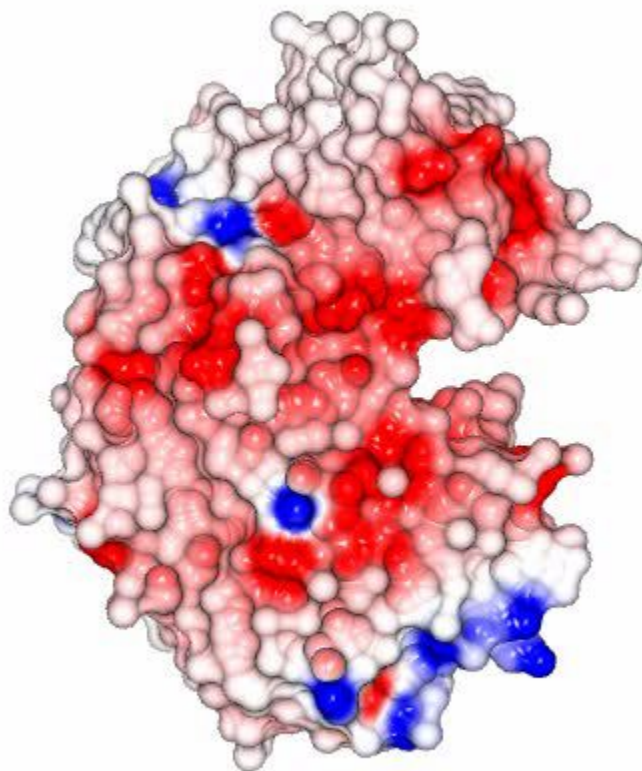
Так делают сыр



Как получают натуральный ХИМОЗИН



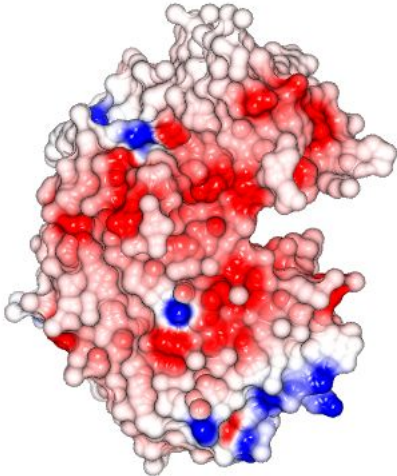
ХИМОЗИН



CCP4MG

CCP4MG version 2.10.6





File Edit View Display Applications Windows Tools Help CCP42



Display Table

Create object, Tools,

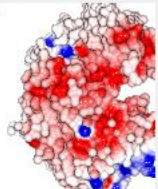
1cms

	CA t..	Atom..	Ribb..
	Solv..	Atom..	Cyli..
	All ..	Atom..	Bonds
	All ..	Same..	elec..

Display Table Simplified Display Table

Movie editor: 123

00001



Save snapshot here

Record 8,00 secs

View rotate about y

Details

Origin: -18.308 -26.916 -25.362 | Size: 1219 x 791

Action Edit Help

ХИМОЗИН

mrclvllavfalsqgaeitriplykgkslrkalkehglledflqkqqygisskysgfgevasvpltnyldsqqyfkgiylgtppqeftvlfdtgssdfwvpsiycksnac
1| 10| 20| 30| 40| 50| 60| 70| 80| 90| 100| 110|

Пре Пропептид Зрелый химозин

knhrfdprkssstfqnlgkplsihygtgsmqgilgydvtvsnivdiqqtvglstqepgdvftyaefdgilgmaypslaseysipvfdnmnrhlvaqdlfsvymdrngq
120| 130| 140| 150| 160| 170| 180| 190| 200| 210| 220|

Зрелый химозин

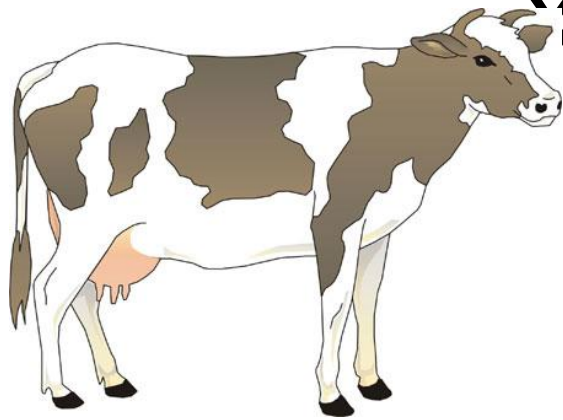
esmltlgaidpsyytgsllhwvpvtvqqywfvtvdsvtisgvvvaceggcqaieldtgtsklvgpssdilniqqaigatqnqygefddidcdnlsympvtfvfeingkmypltp
230| 240| 250| 260| 270| 280| 290| 300| 310| 320| 330|

Зрелый химозин

saytsqdqgfgctsgfqsenhsqkwilgdvfireyyvfdrannlvglakai
340| 350| 360| 370| 380| 381|

Зрелый химозин

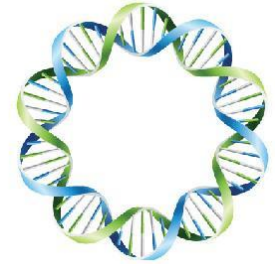
Сделать рекомбинантный ХИМОЗИН - ЛЕГКО



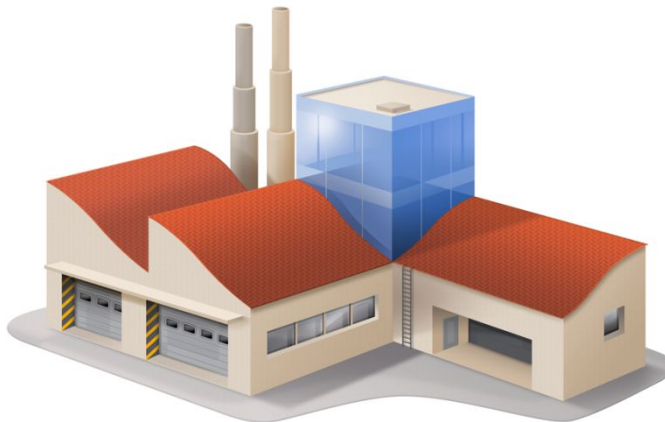
Ген химозина



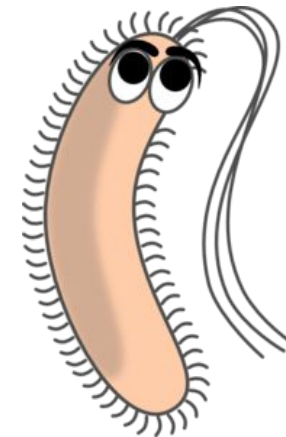
Рекомб-ая
плазмида



Исходная
плазмида



Client : Aastra

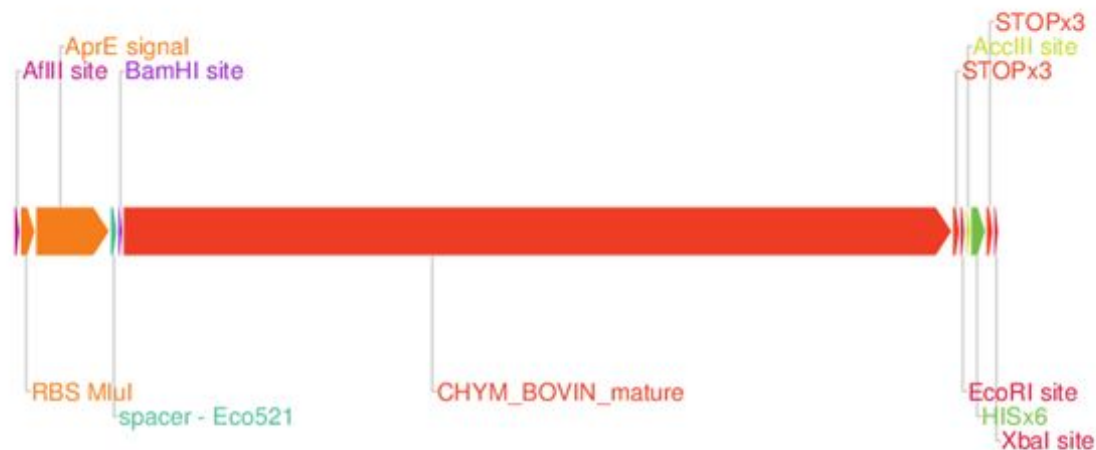


Бактерия

Я предлагаю синтезировать вариант Bosta_CHYMB_4fin2_Bsu

В нем в аминокислотной последовательности бычьего химозина последний Ile был заменен на Gly – чтобы ввести сайт рестрикции MroNI (GCCGGC), поэтому этот белок можно клонировать как с гистидинами на С-конце, так и без них.

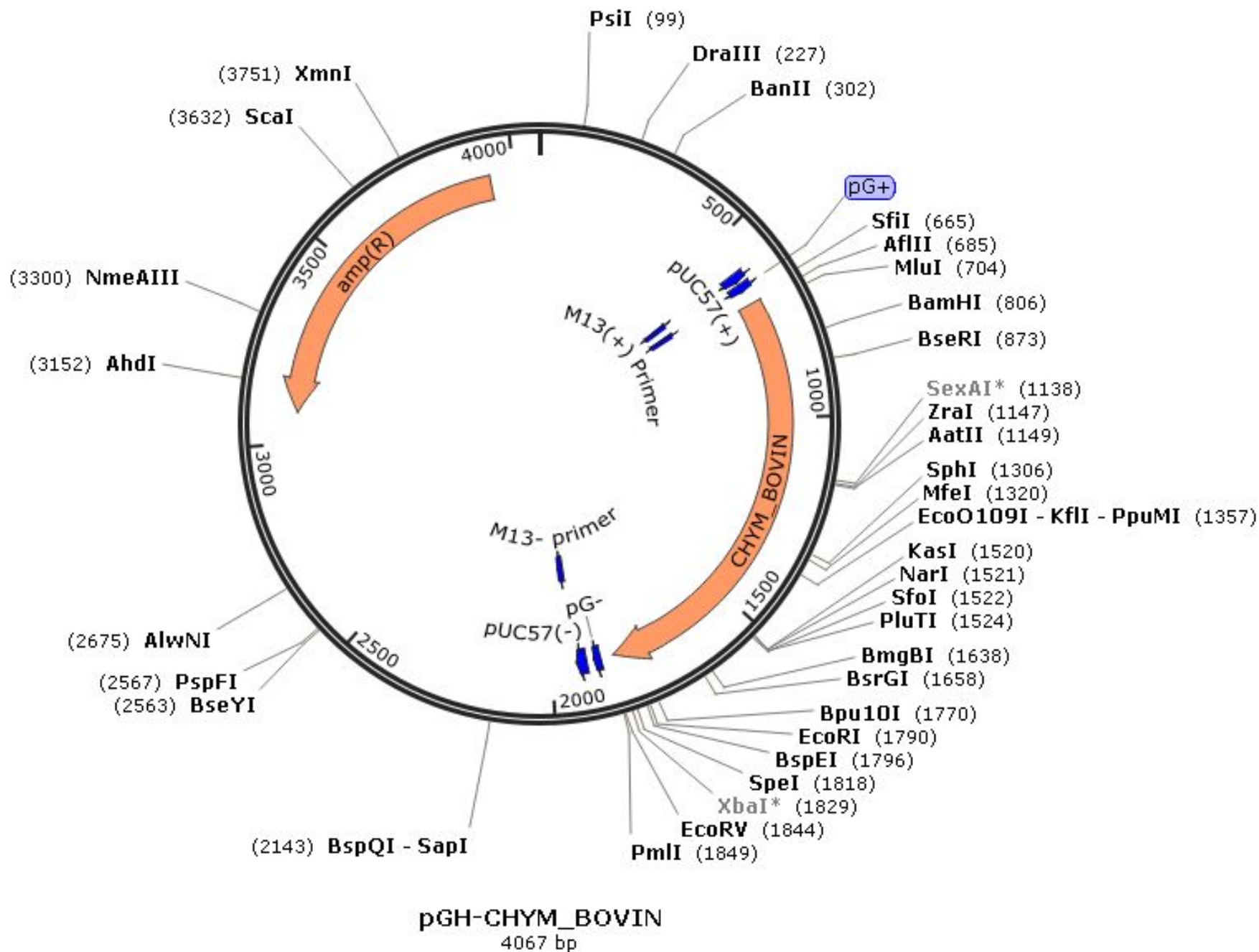
Ген сконструирован так, чтобы быть совместимым с плазмидой pBE-S - в нем отсутствуют сайты из ее MCS (кроме тех, которые нужны для клонирования).

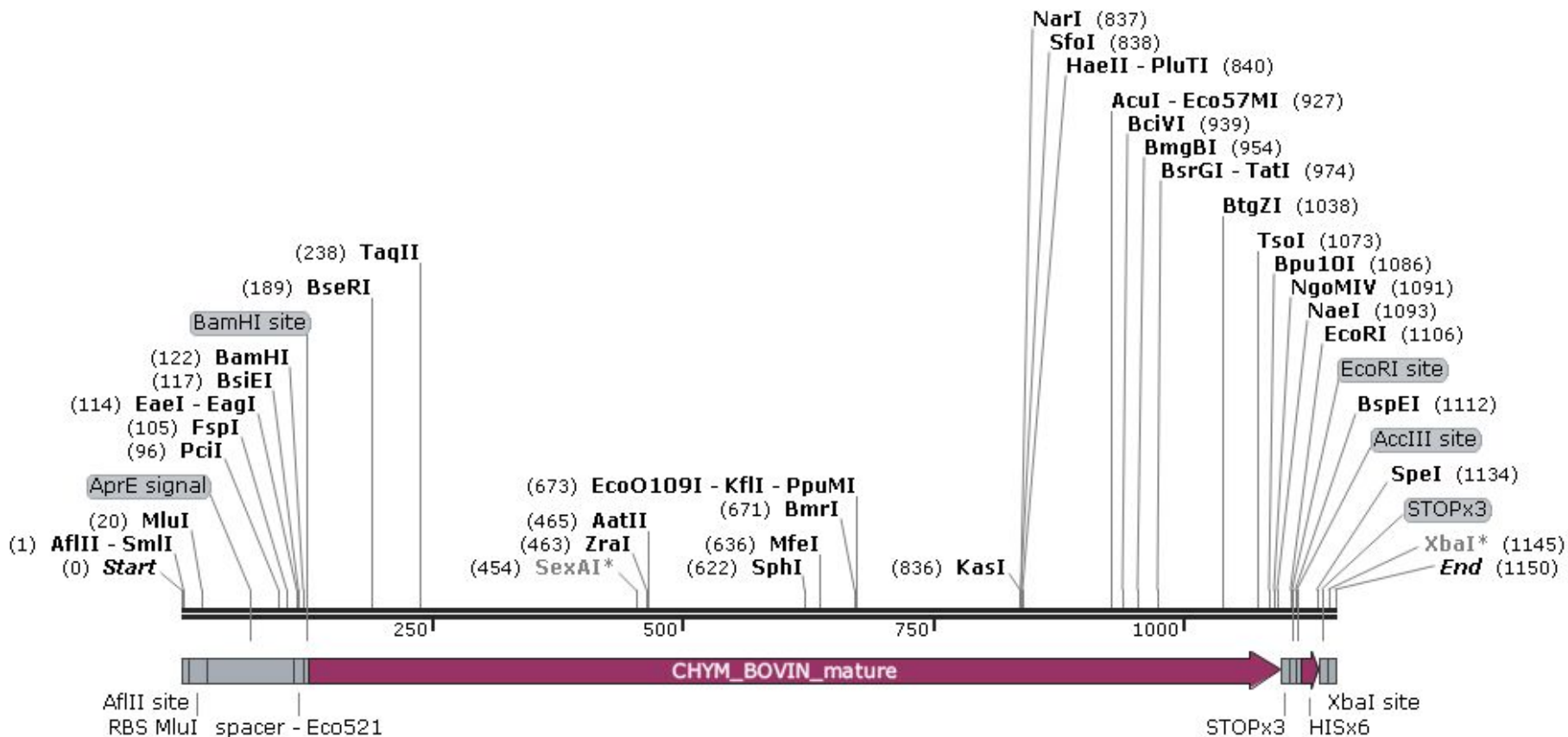


Непосредственно на С-конце химозина перед первыми тремя стоп-кодонами расположен сайт MroNI (GCCGGC), совместимый с сайтом AccIII (TCCGGA).

Таким образом, если мы хотим получить секретиремый белок в *Bacillus subtilis*, не содержащий С-концевых остатков гистидина, мы клонируем по AflIII/EcoRI (или AccIII, или XbaI)

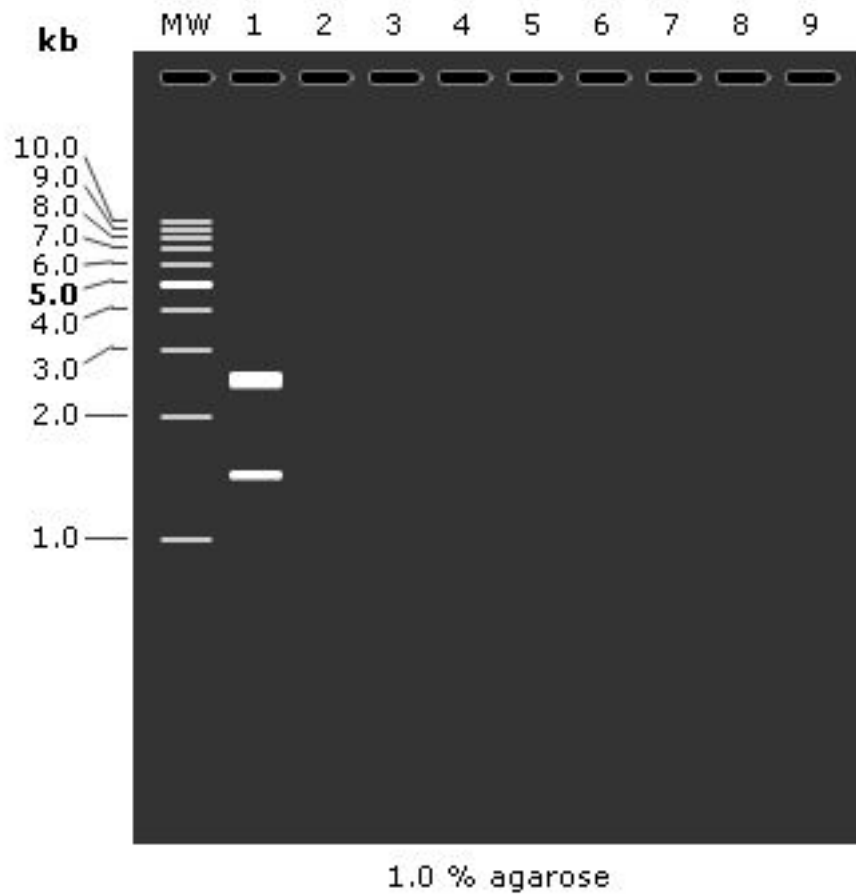
Если мы хотим получить рекомбинантный химозин с С-концевыми гистидинами, то перед клонированием делаем следующий финт ушами: режем фрагмент по MroNI (GCCGGC) и AccIII (TCCGGA) и лигируем. При этом вырезаются три первых стоп-



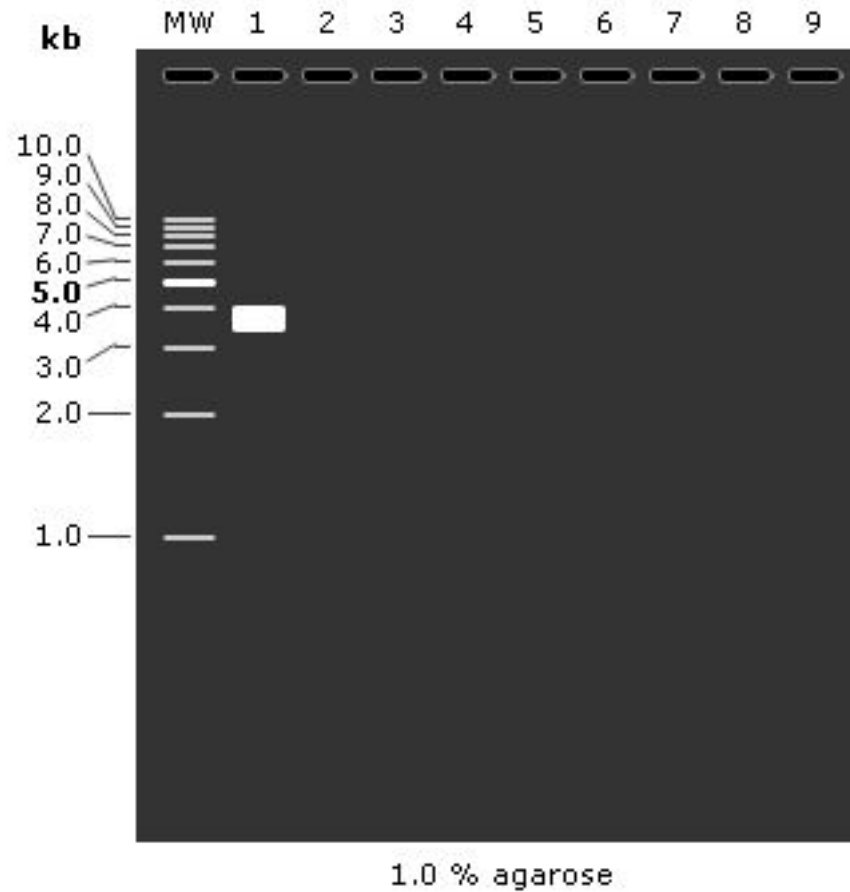


Bosta_CHYMB_4fin2_Bsu
1150 bp

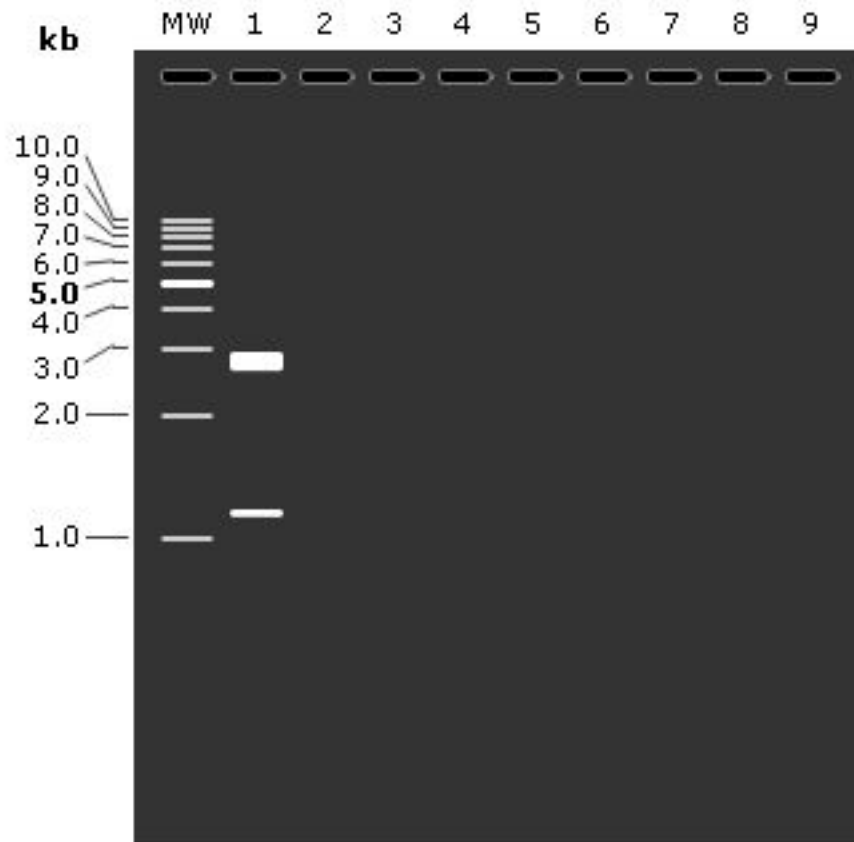
Гидролиз в присутствии рестриктаз MroNI/AccIII



Гидролиз в присутствии рестриктаз AflIII/XbaI



Перетрансформация в JM103 и последующий гидролиз



1.0 % agarose

Cat. # 3380

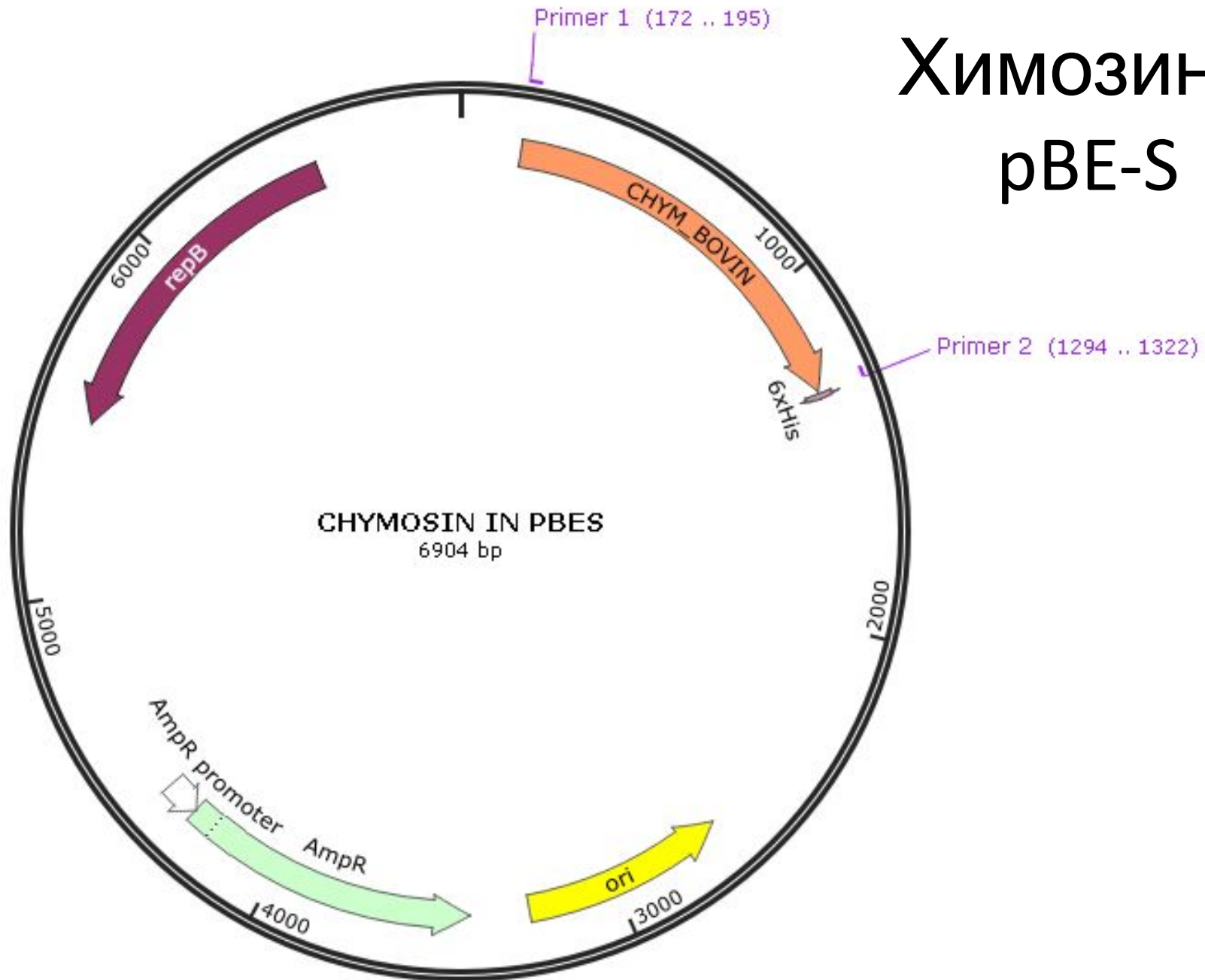
For Research Use

TAKARA

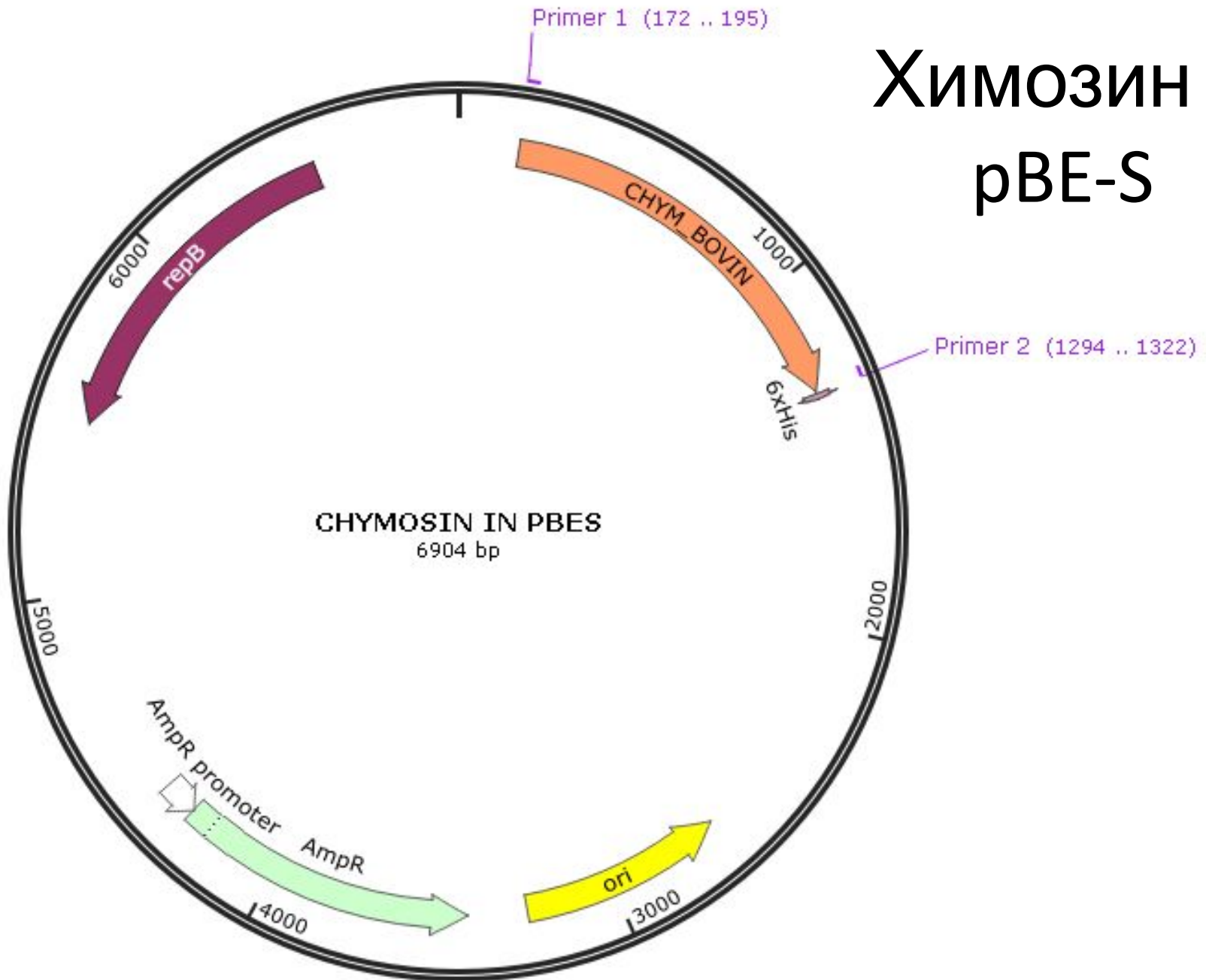
***B. subtilis* Secretory
Protein Expression System**

Product Manual

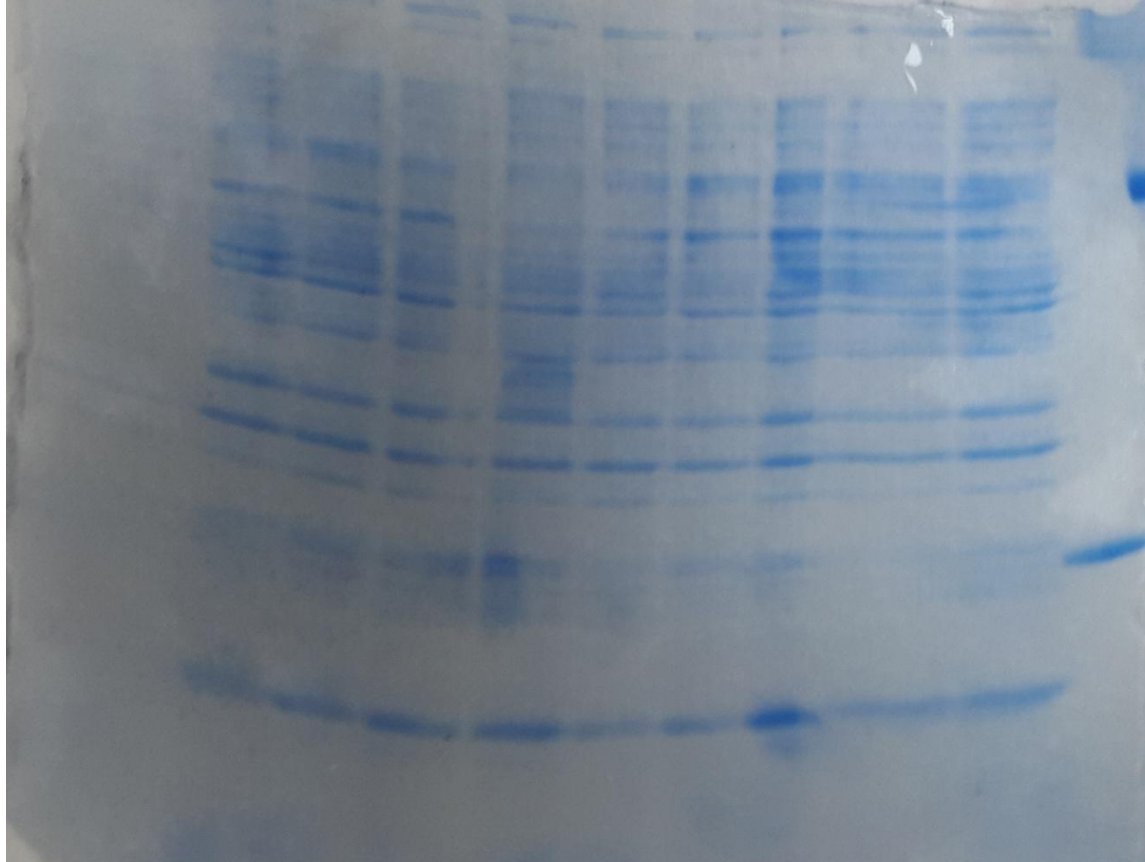
ХИМОЗИН В pBE-S



ХИМОЗИН В pBE-S

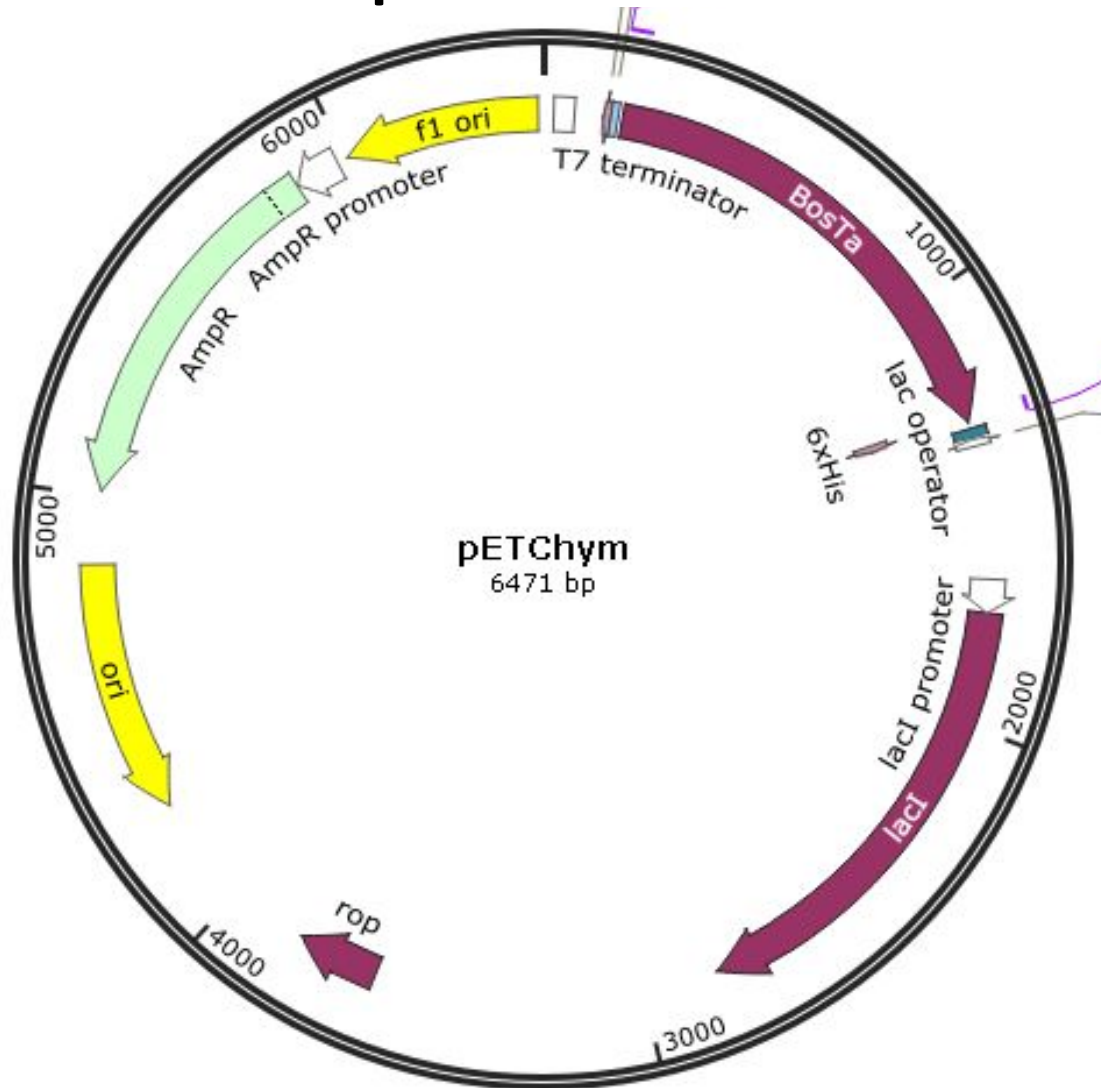


Белковый электрофорез биомассы *B.subtilis*

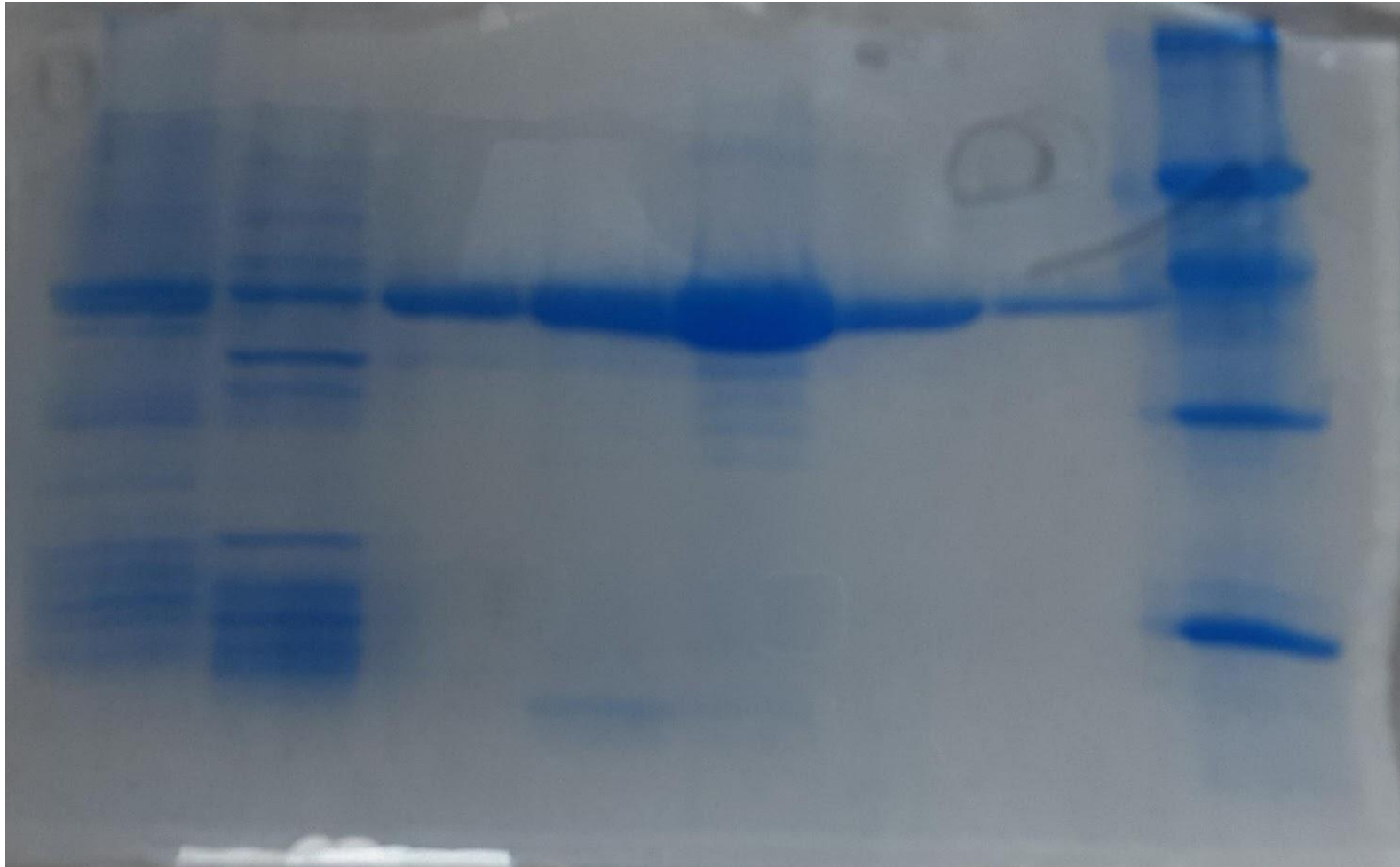


Не знаем как устроен промотер

Переклонирование в векторе pET21a



Белковый электрофорез биомассы *E.coli*



Молокосвертывающая активность

ХИМОЗИН

mrclvlllavfalsqgaeitriplykgkslrkalkehglledflqkqqygisskysgfgevasvpltnyldsqqyfkgiylgtppqeftvlfdtgssdfwvpsiycksnac
1| 10| 20| 30| 40| 50| 60| 70| 80| 90| 100| 110|

Пре Пропептид Зрелый химозин

knhrfdprkssstfqnlgkplsihygtgsmqgilgydvtvsnivdiqqtvglstqepgdvftyaefdgilgmaypslaseysipvfdnmnrhlvaqdlfsvymdrngq
120| 130| 140| 150| 160| 170| 180| 190| 200| 210| 220|

Зрелый химозин

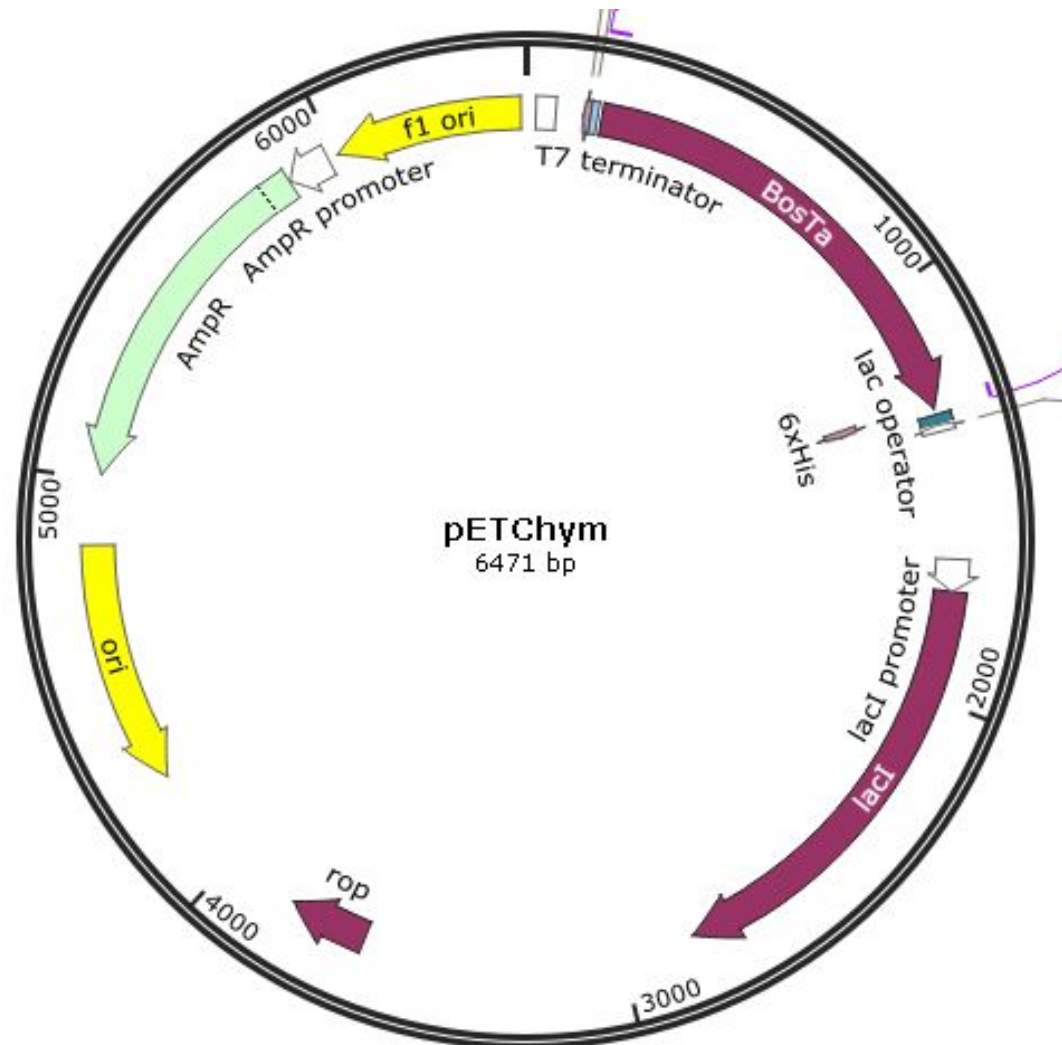
esmltlgaidpsyytgsllhwvpvtvqqywfvtvdsvtisgvvvaceggcqaieldtgtsklvgpssdilniqqaigatqnqygefddidcdnlsympvtfvfeingkmypltp
230| 240| 250| 260| 270| 280| 290| 300| 310| 320| 330|

Зрелый химозин

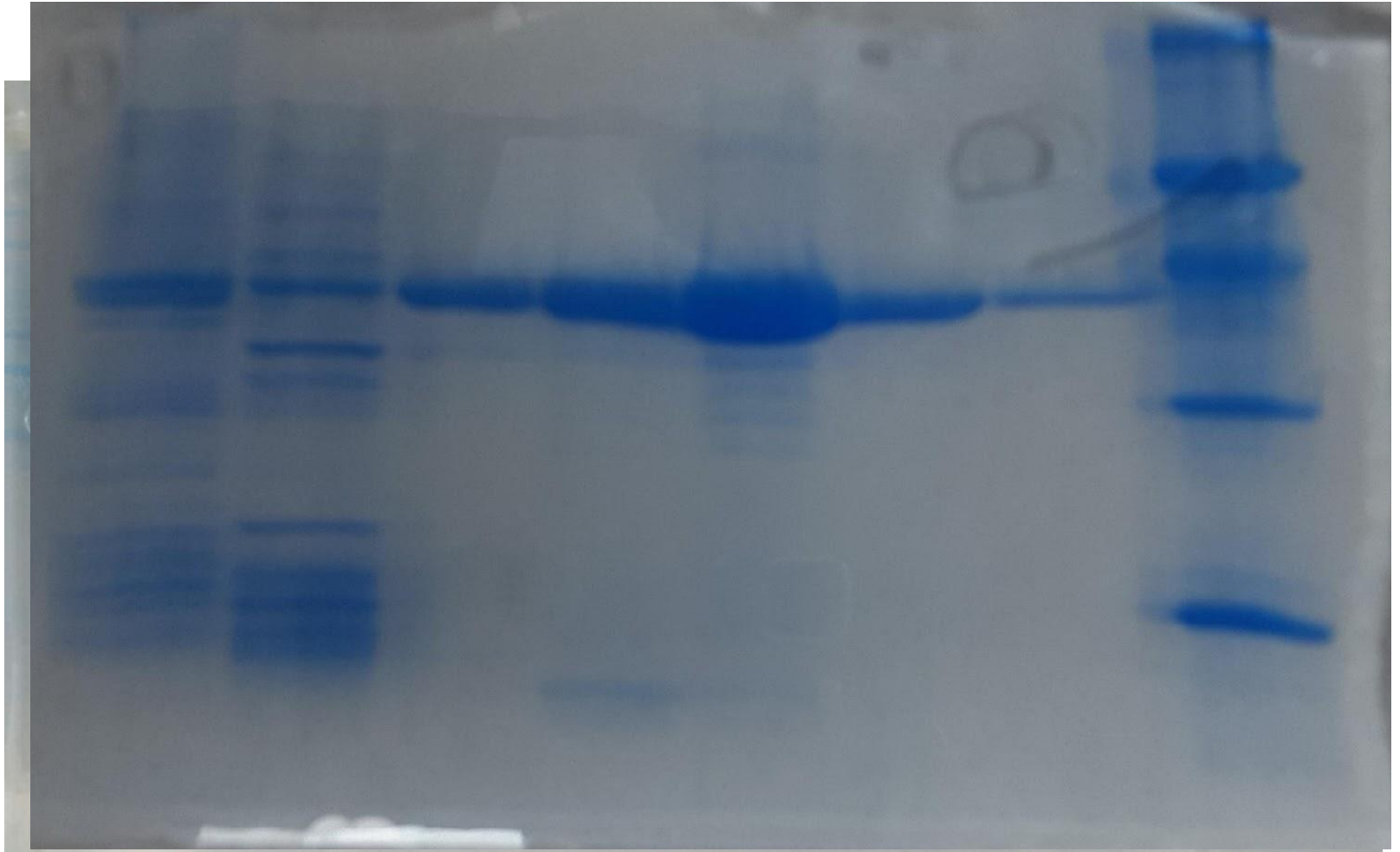
saytsqdqgfcstgfsenhsqkwilgdvfireyysvdrannlvglakai
340| 350| 360| 370| 380| 381|

Зрелый химозин

Встройка пропептида

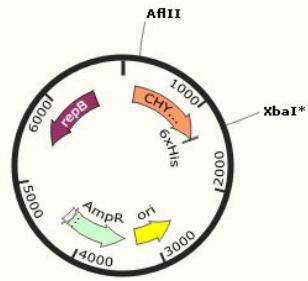


Белковый электрофорез биомассы *E.coli*

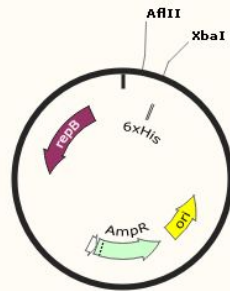


Молокосвертывающая активность

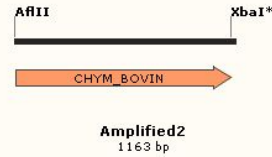
500 IU



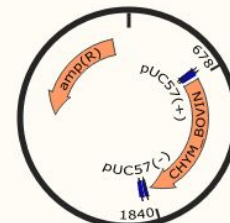
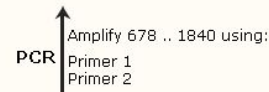
CHYMOSIN IN PBES
6904 bp



pBE-S DNA
5938 bp



Amplified2
1163 bp



pGH-CHYM_BOVIN
4067 bp

Правила

- Подробное изучение предмета
- Четкий план работ и стандартные методы
- Не нужно верить теоретикам
- Подбор адекватных методов и инструментов
- Использование специализированных программ
- Формулировать план Б (В, Г...)
- Не экономить на расходных материалах и проверять качество расходных материалов и приборов
- Тщательный подбор сотрудников
- Обсуждение и контроль
- Лабораторный журнал