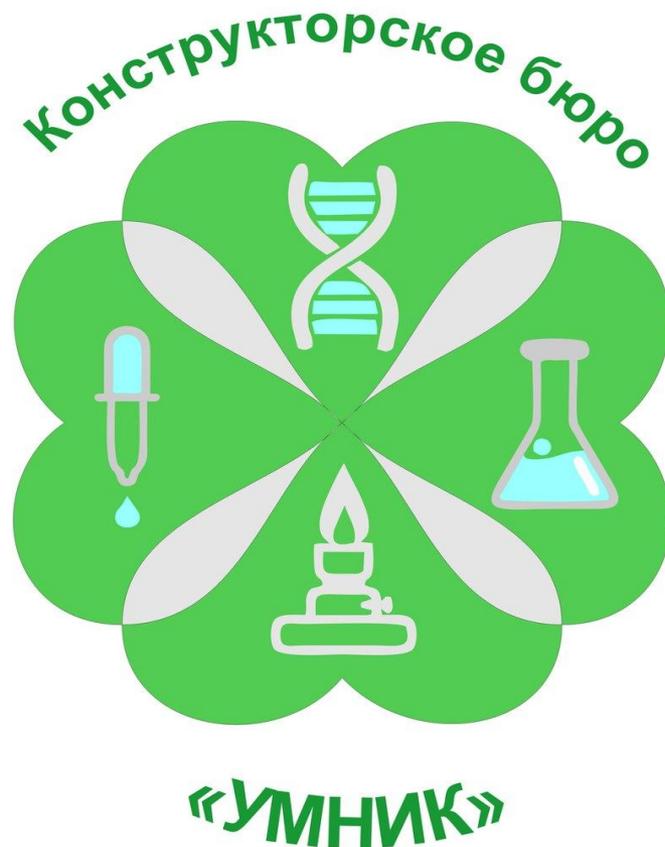


# Материалы школы

[https://vk.com/z\\_umnik](https://vk.com/z_umnik)



# Как правильно построить научный эксперимент

Щербаков Д.Н.

# Как не нужно строить научный эксперимент

Щербаков Д.Н.

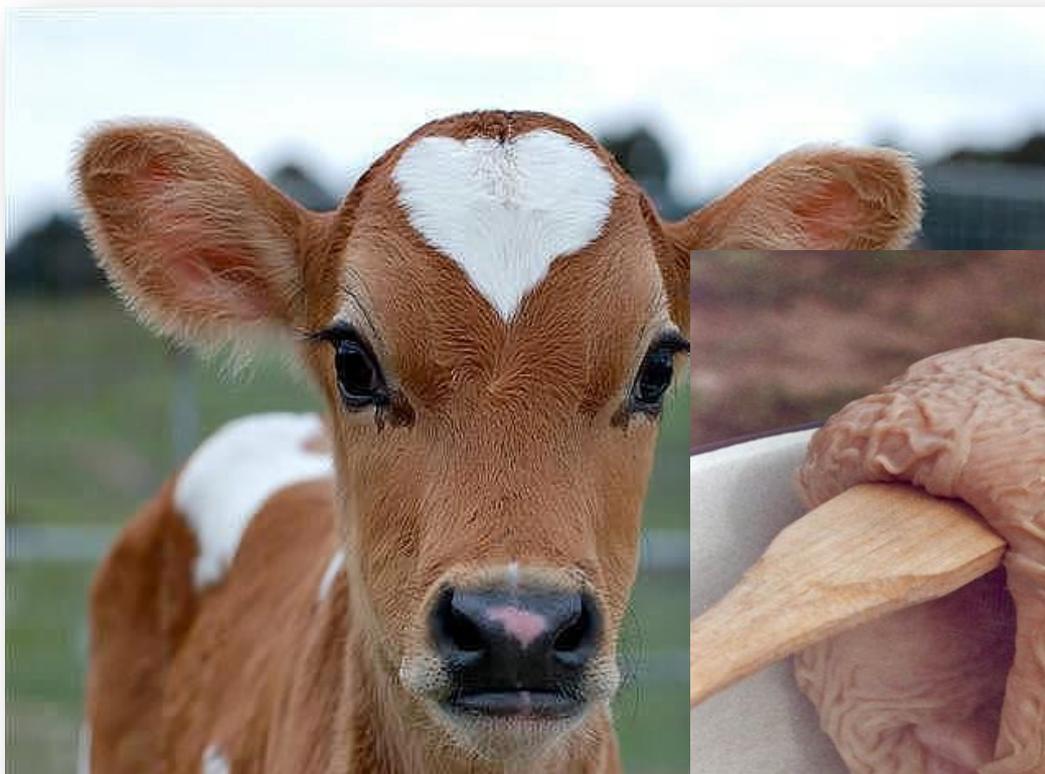
# Сыр



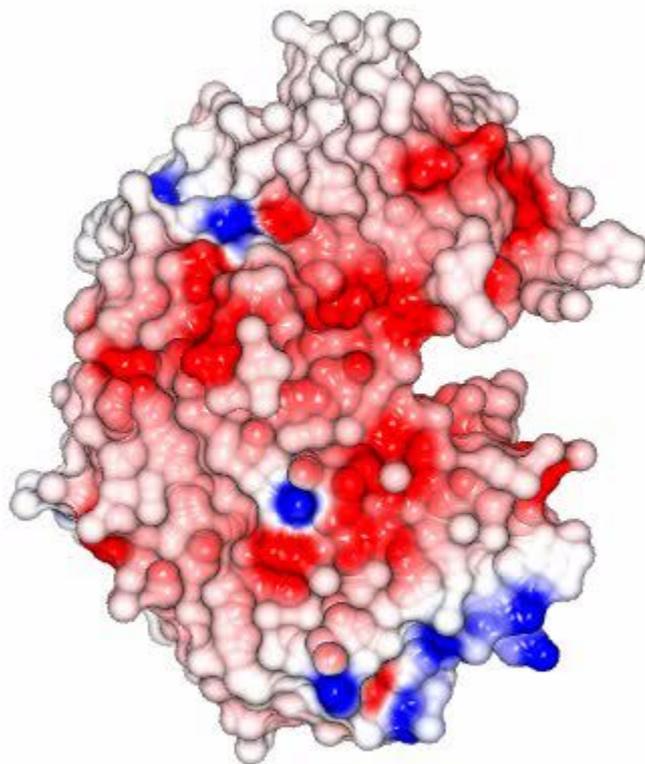
# Так делают сыр



# Как получают натуральный ХИМОЗИН



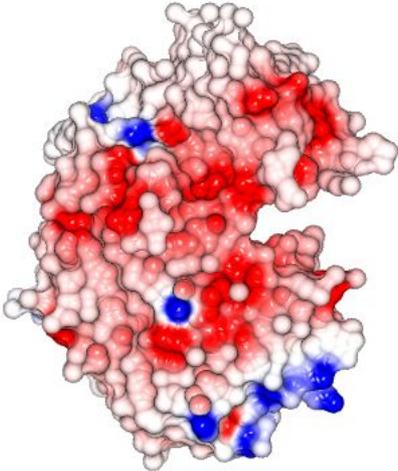
# ХИМОЗИН



# CCP4MG

CCP4MG version 2.10.6

File Edit View Display Applications Windows Tools Help CCP42



Display Table

Create object, Tools,

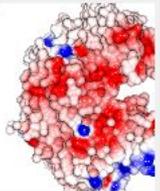
1cms

	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

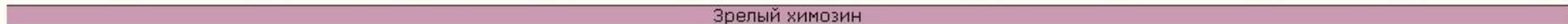
Action Edit Help

# ХИМОЗИН

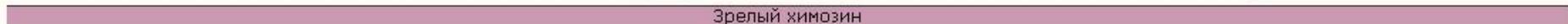
mrclvlllavfalsqgaeitriplykgkslrkalkehgllledflqkqqygisskysgfgevasvpltnyldsqqyfkgiylgtppqeftvlfdtgssdfwvpsiycksnac  
1| 10| 20| 30| 40| 50| 60| 70| 80| 90| 100| 110|



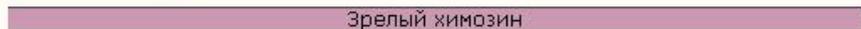
knhrfdprkssstfnlgkplsihygtgsmqgilgydvtvsnivdiqqtvglstqepgdvftyaefdgilgmaypslaseysipvfdnmnrhlvaqdlfsvymdrngq  
120| 130| 140| 150| 160| 170| 180| 190| 200| 210| 220|



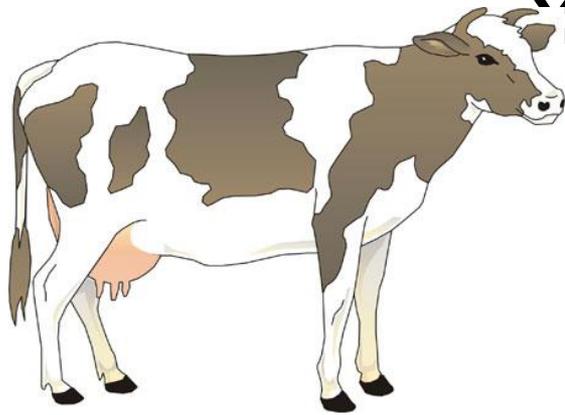
esmltlgaidpsyytgsllhwvpvtvqqywfvtvsvtisgvvvaceggcqaieldtgtsklvgpssdilniqqaigatqnqygefddidcdnlsympvtfvfeingkmypltp  
230| 240| 250| 260| 270| 280| 290| 300| 310| 320| 330|



saytsqdqgfgctsgfqsenhsqkwilgdvfireyysvdrannlvglakai  
340| 350| 360| 370| 380| 381|



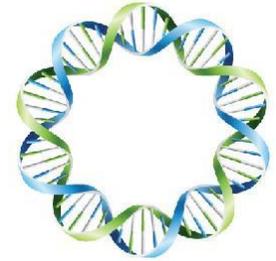
# Сделать рекомбинантный ХИМОЗИН - ЛЕГКО



Ген химозина



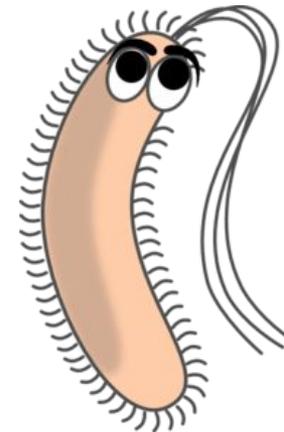
Рекомб-ая  
плазида



Исходная  
плазида



Client : Aastra

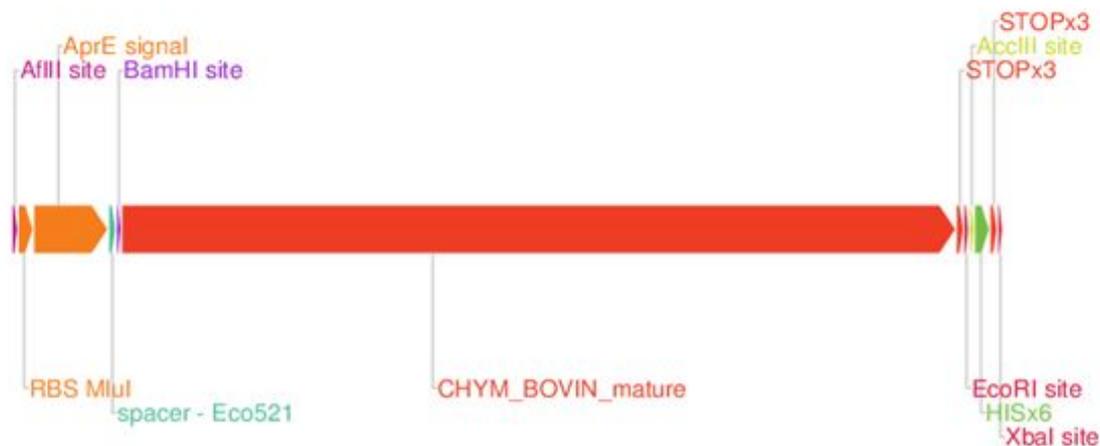


Бактерия

Я предлагаю синтезировать вариант `Vosta_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 C-конце, так и без них.

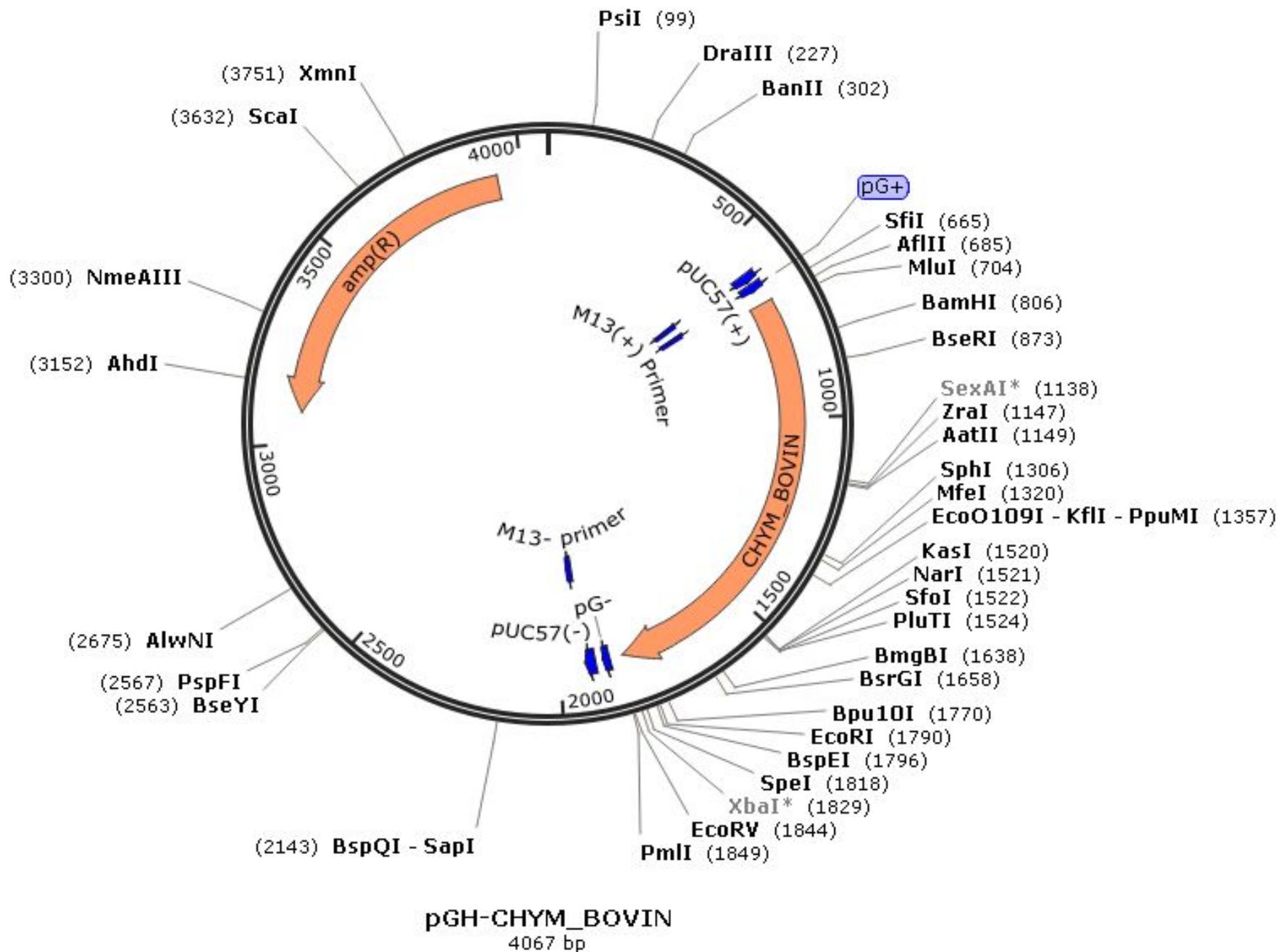
Ген сконструирован так, чтобы быть совместимым с плазмидой `pBE-S` - в нем отсутствуют сайты из ее `MCS` (кроме тех, которые нужны для клонирования).

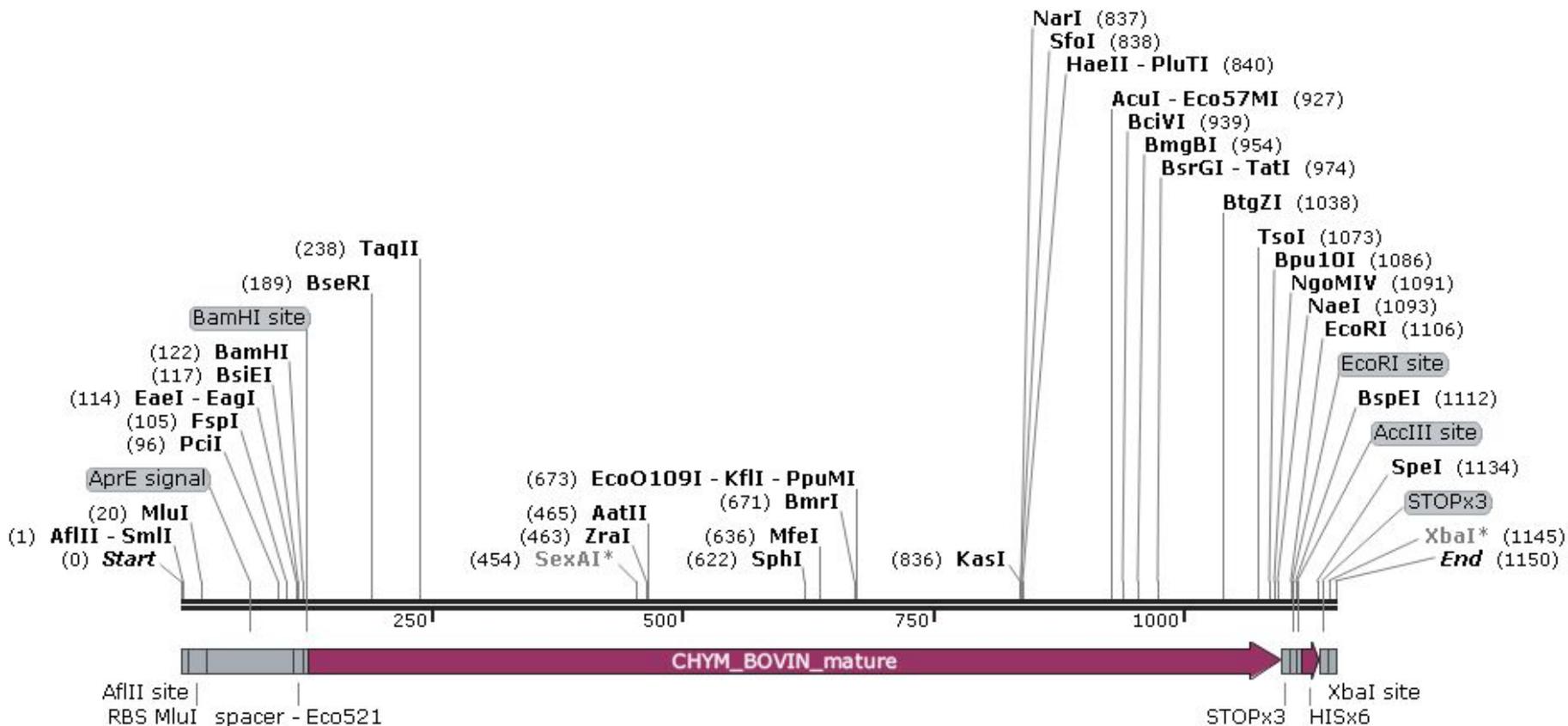


Непосредственно на C-конце химозина перед первыми тремя стоп-кодонами расположен сайт `MroNI` (`GCCGGC`), совместимый с сайтом `AccIII` (`TCCGGA`).

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

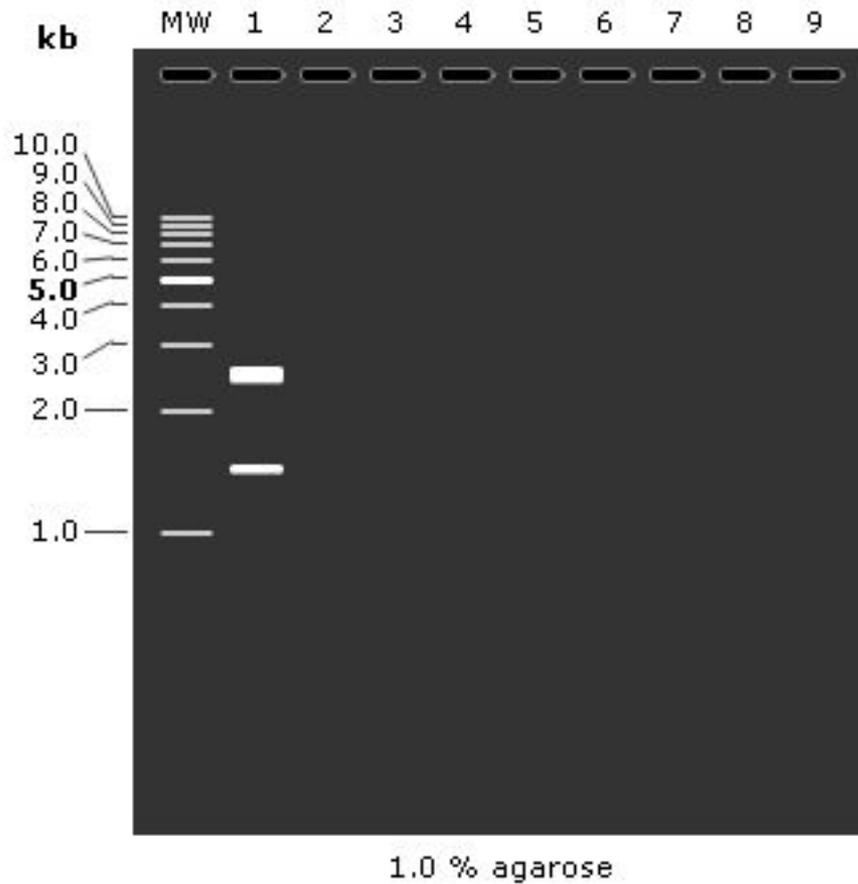
Если мы хотим получить рекомбинантный химозин с C-концевыми гистидинами, то перед клонированием делаем следующий финт ушами: режем фрагмент по `MroNI` (`GCCGGC`) и `AccIII` (`TCCGGA`) и лигируем. При этом вырезаются три первых стоп-



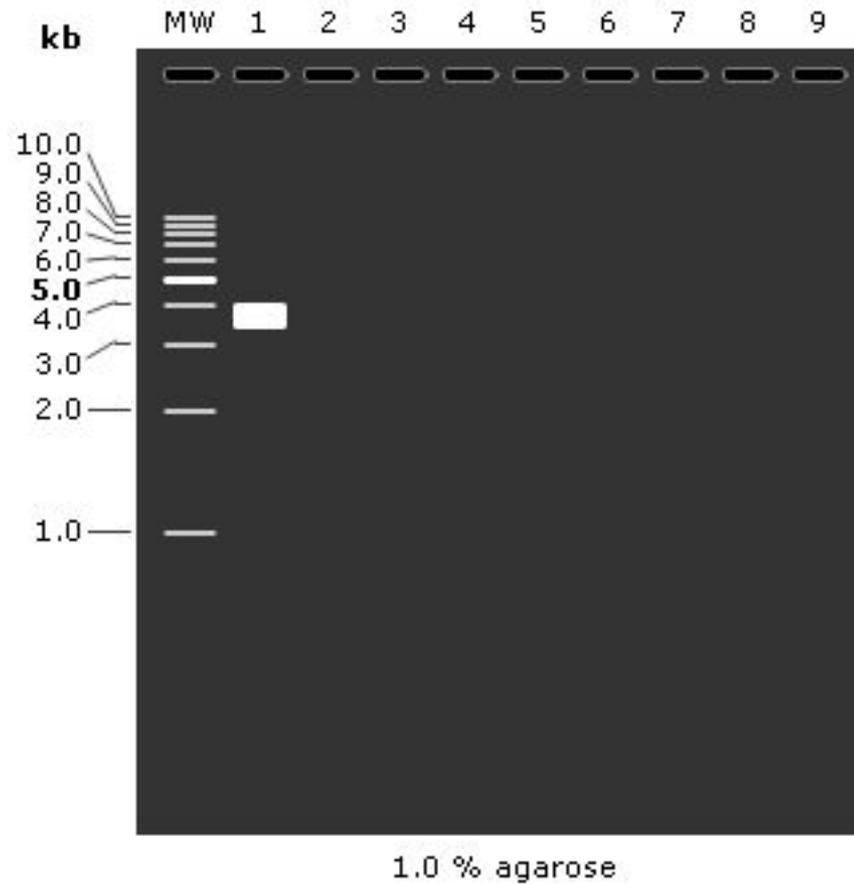


Bosta\_CHYMB\_4fin2\_Bsu  
1150 bp

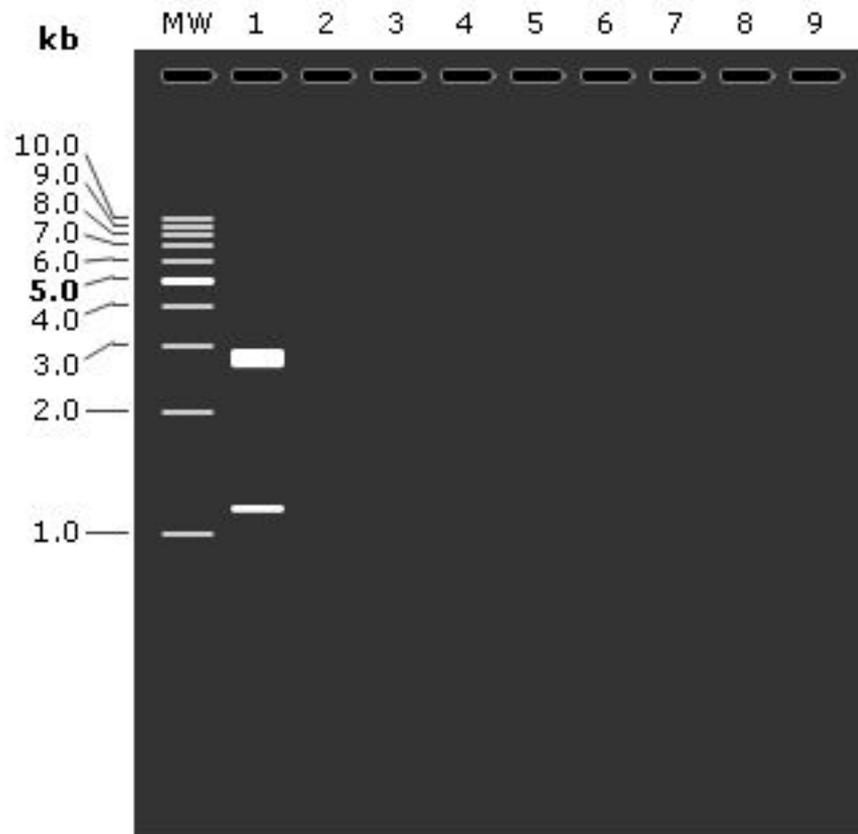
# Гидролиз в присутствии рестриктаз MroNI/AccIII



# Гидролиз в присутствии рестриктаз AflIII/XbaI



# Перетрансформация в JM103 и последующий гидролиз



1.0 % agarose

Cat. # 3380

For Research Use

---

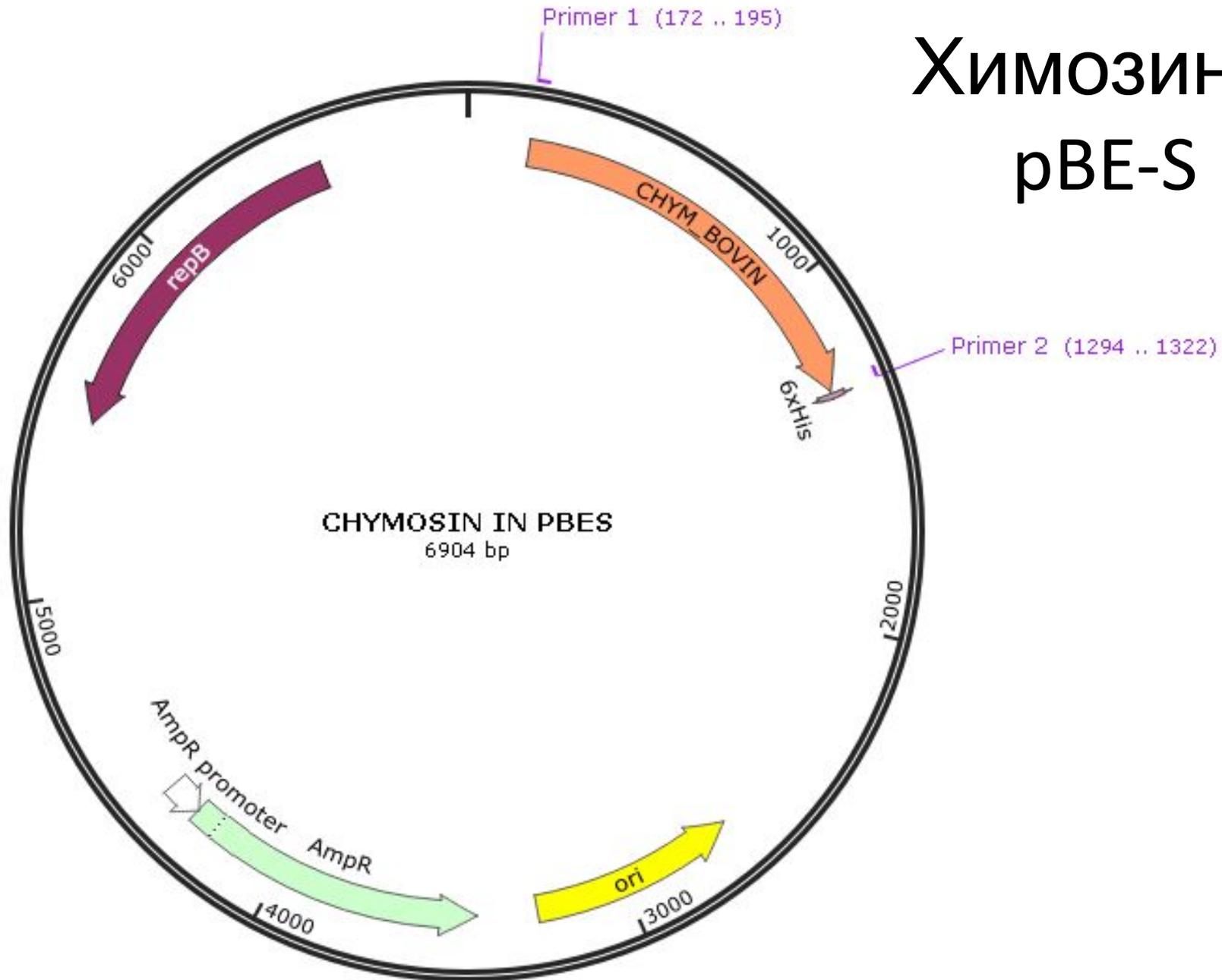
**TAKARA**

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

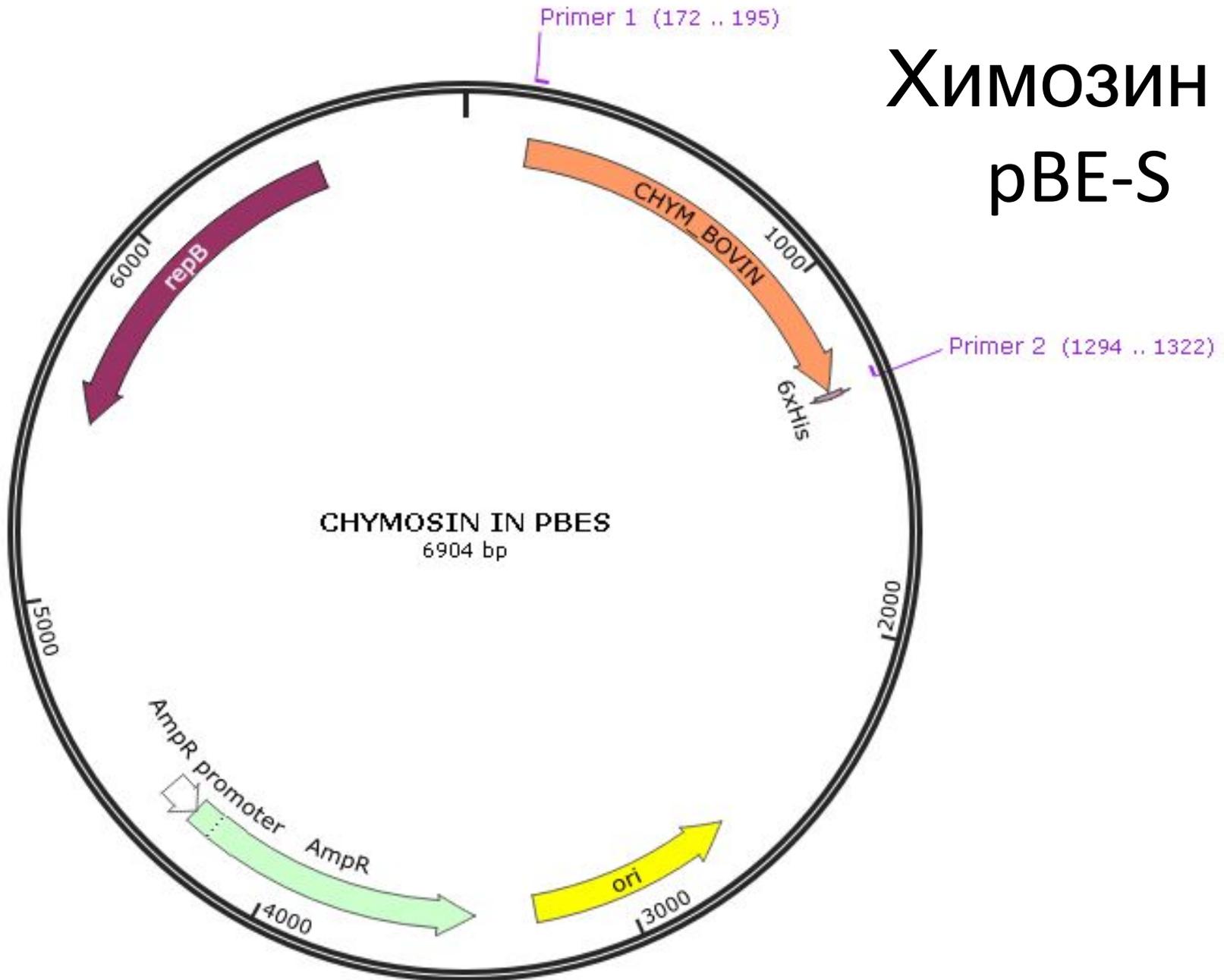
---

Product Manual

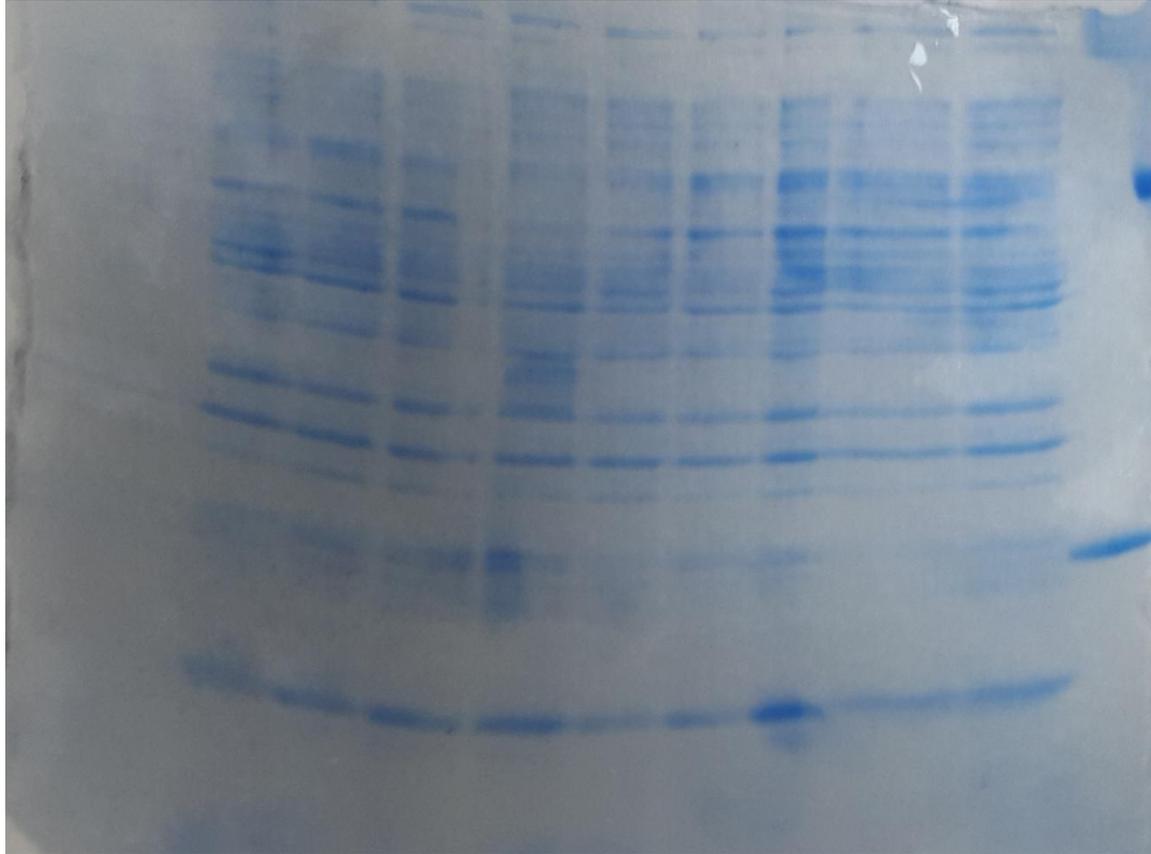
# ХИМОЗИН В pBE-S



# ХИМОЗИН В pBE-S

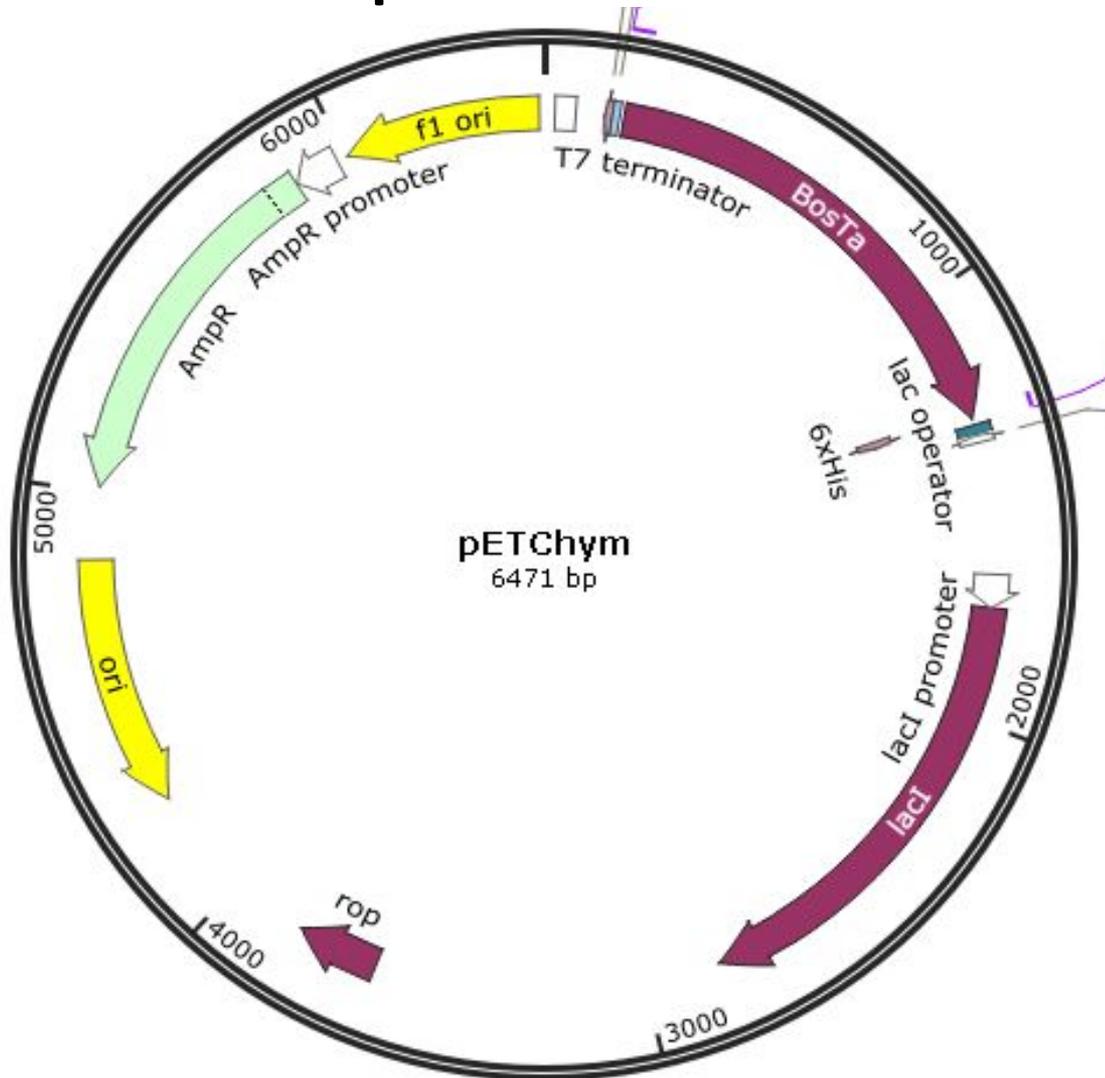


# Белковый электрофорез биомассы *B.subtilis*

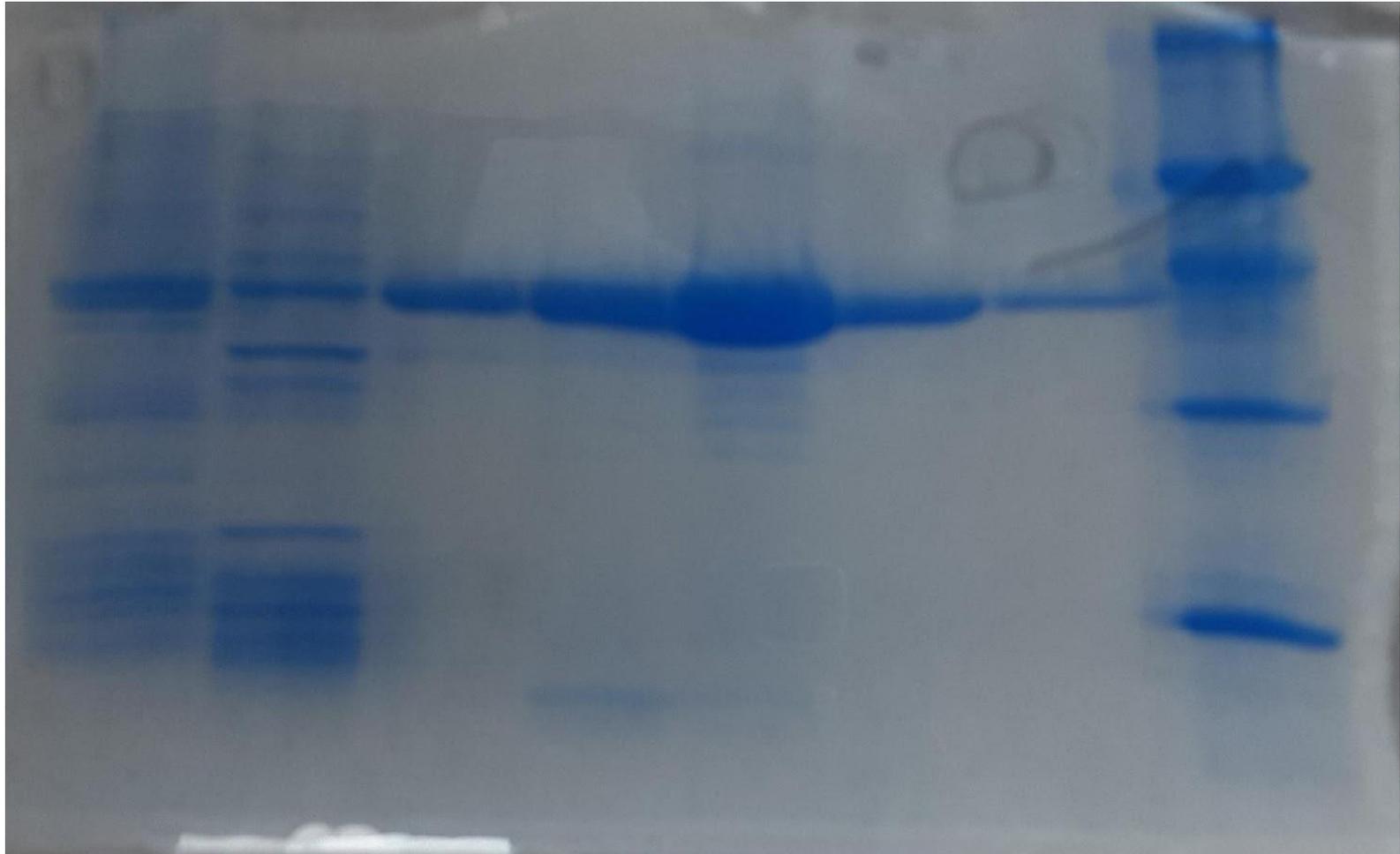


Не знаем как устроен промотер

# Переклонирование в векторе pET21a



# Белковый электрофорез биомассы *E.coli*



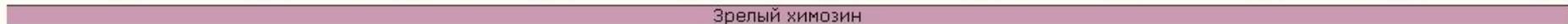
# Молокосвертывающая активность

# ХИМОЗИН

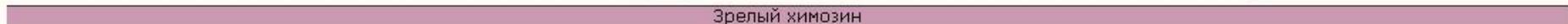
mrclvllavfalsqgaeitriplykgkslrkalkehgllledflqkqqygisskysgfgevasvpltnyldsqqyfkgiylgtppqeftvlfdtgssdfwvpsiycksnac  
1| 10| 20| 30| 40| 50| 60| 70| 80| 90| 100| 110|



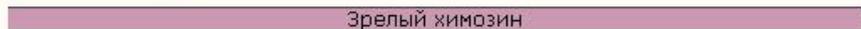
knhrfdprkssstfnlgkplsihygtgsmqgilgydvtvsnivdiqqtvglstqepgdvftyae fdgilgmaypslaseysipvfdnmnrhlvaqdlfsvymdrngq  
120| 130| 140| 150| 160| 170| 180| 190| 200| 210| 220|



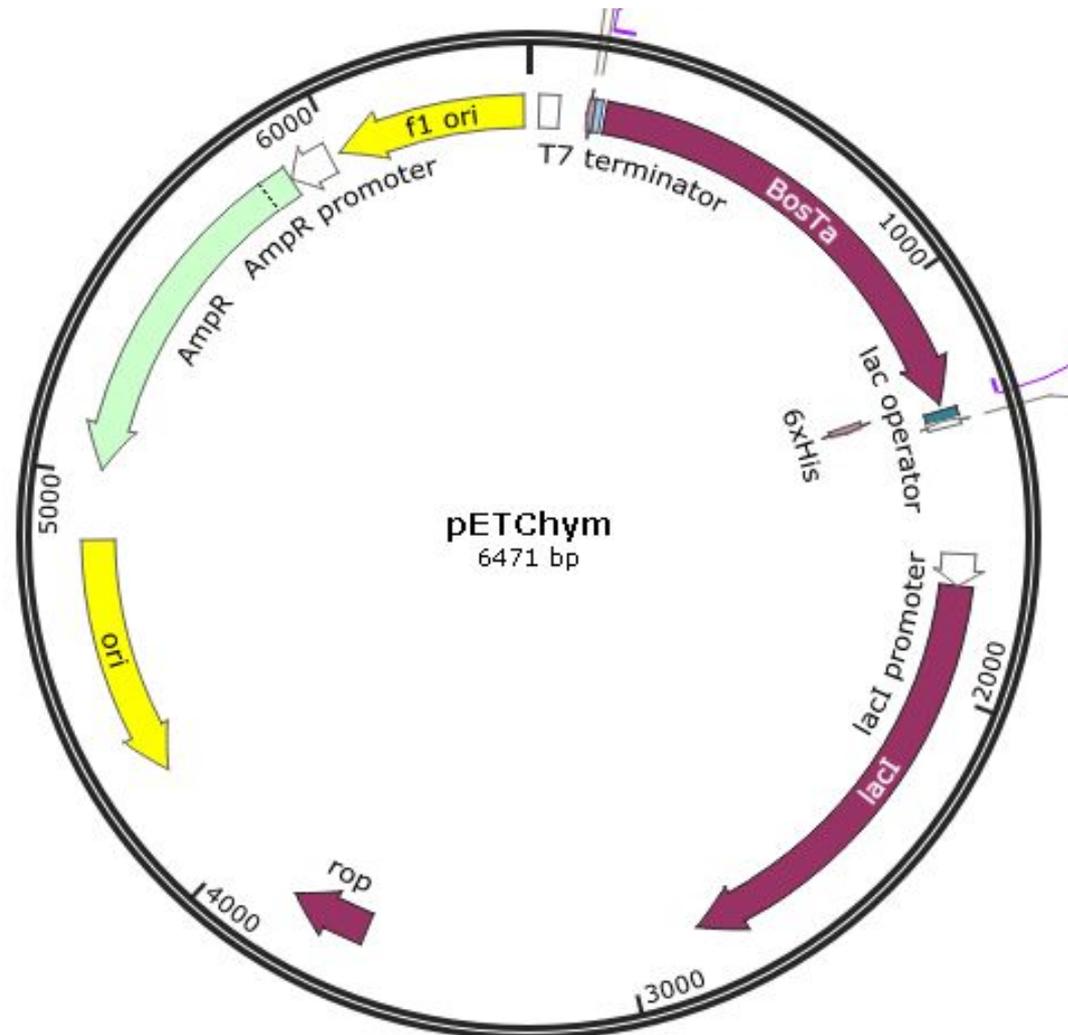
esmltlgaidpsyytgs lhwvpvtvqqywf tvdsvtisgvvvaceggcqaieldtgtsklvgpssdilniqqaigatqnqygef didcdnlsymp tvvfeingkmypltp  
230| 240| 250| 260| 270| 280| 290| 300| 310| 320| 330|



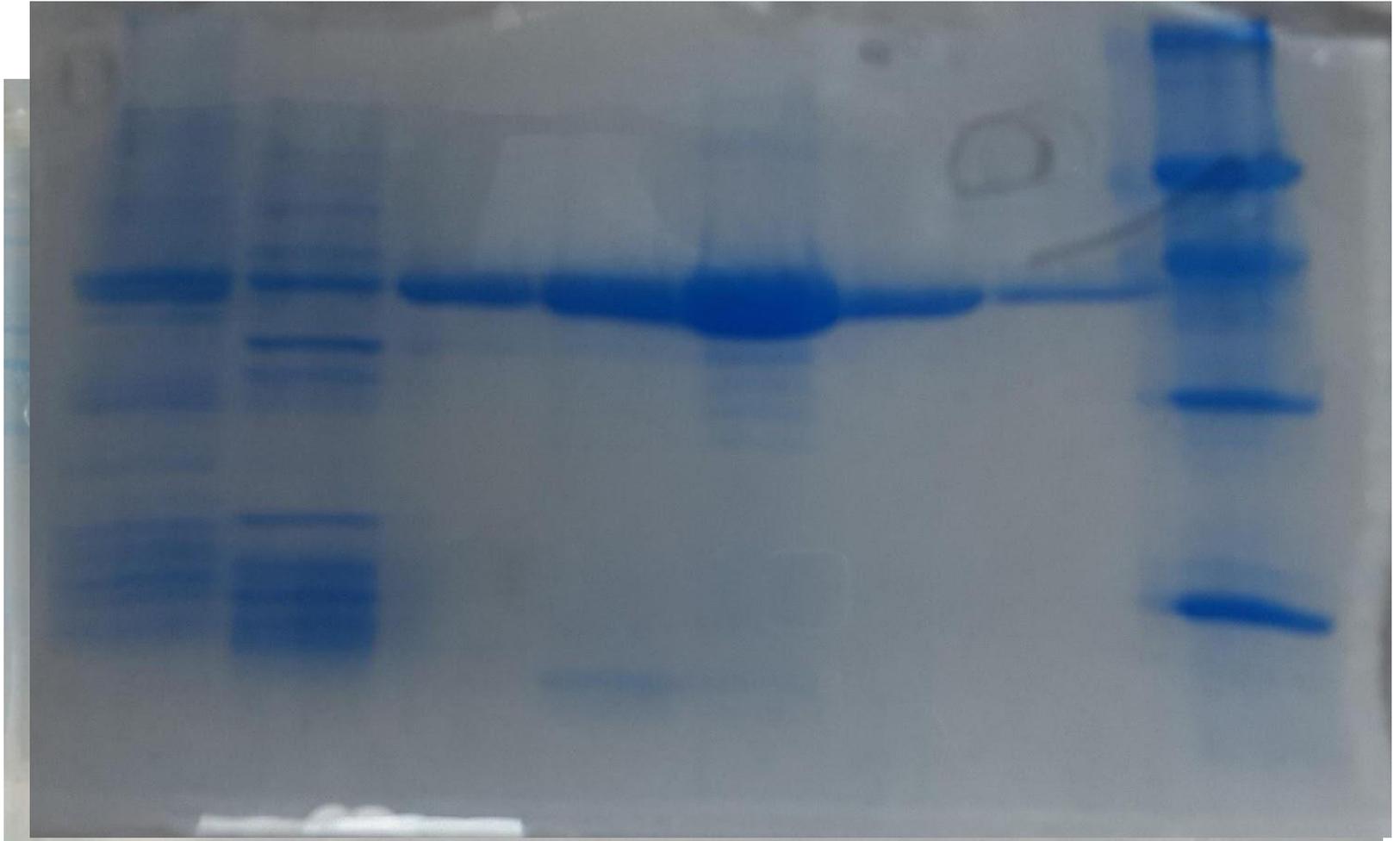
saytsqdqgfgctsgfqsenhsqkwilgdvfireyyvfd rannlvglakai  
340| 350| 360| 370| 380| 381|



# Встройка пропептида

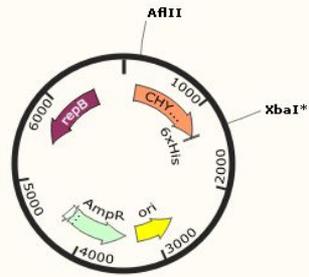


# Белковый электрофорез биомассы *E.coli*

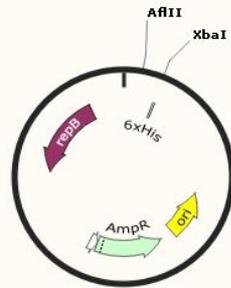


# Молокосвертывающая активность

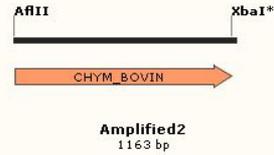
500 IU



**CHYMOSIN IN PBES**  
6904 bp

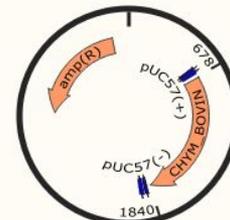


**pBE-S DNA**  
5938 bp



**Amplified2**  
1163 bp

PCR  
↑ Amplify 678 .. 1840 using:  
Primer 1  
Primer 2



**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