

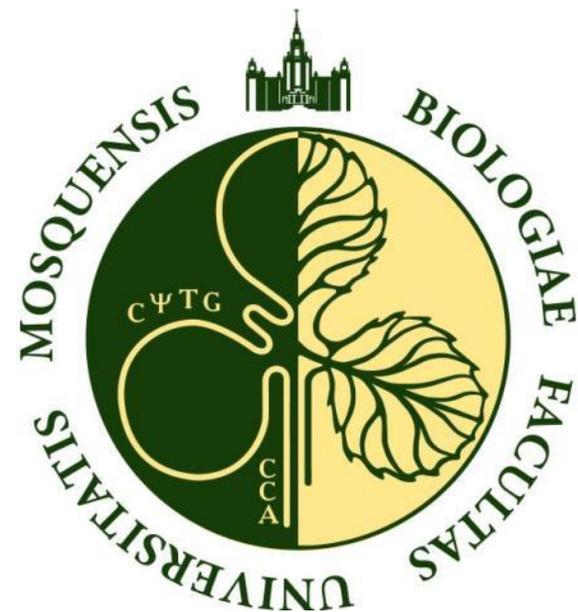
# Создание биосенсоров на основе бактерий методами синтетической биологии

Выполнил ученик 10 Н класса СУНЦ МГУ Винников Р.С.

Научные руководители:

к.ф.м.н. Шайтан А.К., кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ

к.б.н. Глухов Г.С., кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ



# Введение

В настоящее время уделяется все больше внимания проблемам загрязнения окружающей среды.

- Одним из важных факторов загрязнения является загрязнение тяжелыми металлами (ТМ)
- Для уменьшения вреда здоровью необходимо точно детектировать наличие ТМ в среде.
- Для этого мы разрабатываем биосенсор на основе бактерии, синтезирующий флуоресцентный белок при наличии ТМ в среде.
- Для создания биосенсора мы используем методы сравнительно нового направления в биологии – синтетической биологии.

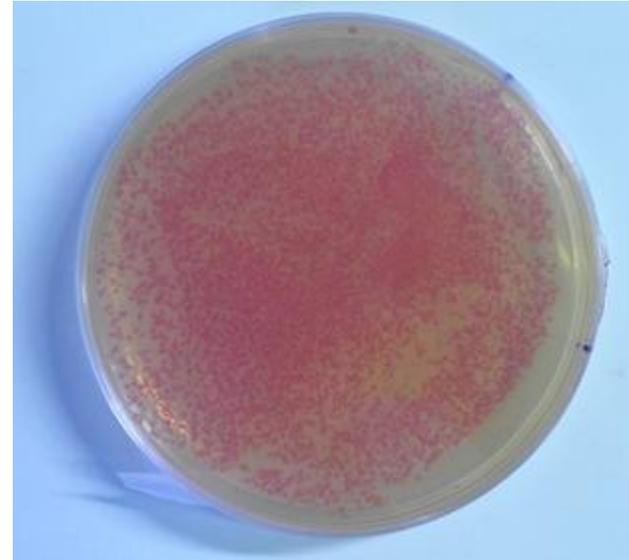
## Влияние некоторых ТМ на организм

Металл	Эффекты
1. Zn	Анемия, бессонница, ухудшение слуха
2. Pb	Двигательные расстройства, поражение анализаторов
3. Co	Поражение сердца, ухудшение слуха
4. Cu	Нарушение функций печени и почек, язва желудка
5. Hg	Апатия, раздражимость, ослабление памяти
6. Cd	Ухудшение обоняния, снижение аппетита, белок в моче, итай-итай

# Цели

Конечная общая цель проекта – создать биосенсор на основе бактерии *E. coli*, который будет синтезировать красный флуоресцентный белок (RFP) в ответ на присутствие в среде тяжелых металлов (кадмий, ртуть и т.д.)

Цель работы автора – разработать модель экспрессии целевого белка в клетке.



Колония компетентной *E. coli*, трансформированная с помощью вектора, содержащего RFP (с сайта [parts.igem.org](http://parts.igem.org))

# Задачи

Работа состоит из двух частей: экспериментальной и создания мат. модели.

- Задача мат. моделирования: создать интерактивный график зависимости концентрации белка в клетке от времени на основании информации из базы данных [bionumbers.hms.harvard.edu](http://bionumbers.hms.harvard.edu).
- Задача экспериментальной части: оценить рост экспрессии белка в клетке путём количественной оценки экспрессии белка в бактерии спектрофотометрическим методом.

$$\begin{cases} \frac{d[\text{protein}]}{dt} = k_t[mRNA][\text{ribosomes}] - k_{dp}[\text{protein}] \\ \frac{d[mRNA]}{dt} = k_{oc} N_p \frac{[RNAP]}{K_p + [RNAP]} - k_{dm}[mRNA] \end{cases}$$

$k_{oc}$  - фактор формирования открытого комплекса

$N_p$  – число копий плазмиды

$K_p$  – константа диссоциации для связывания РНК-полимеразы с ДНК

$k_t$  – фактор инициации трансляции

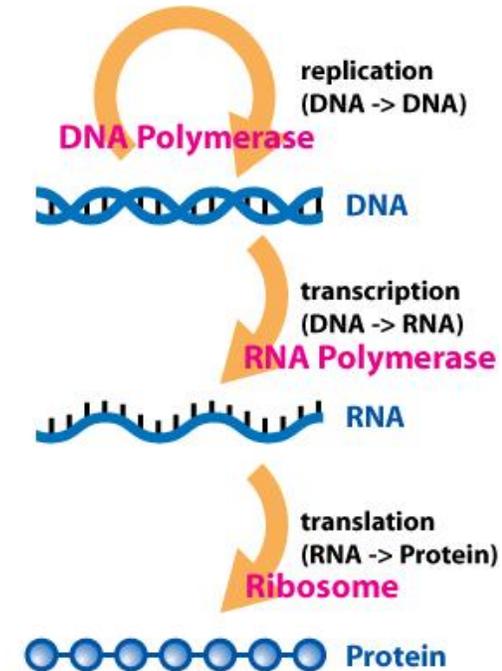
$k_{dm}$ ,  $k_{dp}$  – факторы деградации мРНК и белка

# Методы

Для создания мат. модели (интерактивного графика) используется язык программирования Python 3 с такими библиотеками, как matplotlib, numpy и т.д. Для лучшей визуализации, модель перенесена в программу Jupyter Notebook.

Некоторые методы экспериментальной части:

- Трансформация
- Спектрофотометрия



№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Время инкубирования (ч)	19	18,5	18	17,5	17	16,5	16	15,5	15

Jupyter MyProj Last Checkpoint: 17.02.2019 (autosaved) Logout

File Edit View Insert Cell Kernel Widgets Help Trusted Python 3

```

{
  if (i == 0)
  {
    Ccrna = Ccrna0
    Cprot = Cprot0
  }
  Ccrna = Ccrna*(1 - kdm*dt1[i]) + koc*Np0*(CRNAP/(CRNAP + Kp))*dt1[i]
  Cprot = Cprot*(1-kdp0*dt1[i]) + kt0*Ccrna*Crribosomes*dt1[i]
  y[i] = Cprot
}
source.change.emit();
}
}

```

$$\begin{cases} \frac{d[protein]}{dt} = k_r[mRNA][ribosomes] - k_{dp}[protein] \\ \frac{d[mRNA]}{dt} = k_{tr} N_p \frac{[RNAP]}{K_p + [RNAP]} - k_{dm}[mRNA] \end{cases}$$

In [19]: show(column(row(fig, widgetbox(ICcrna0, TCcrna0, ICprot0, TCprot0, ICRNAP, TCRNAP, ICribosomes, TCribosomes, IKp, TKp, IKoc, TKoc, IKdm, TKdm)

Зависимость концентрации белка в клетке от времени

0.03322259136212624

Ccrna0

0

Cprot0

3.654465049633887

CRNAP

44.85049833887043

Crribosomes

10

Kp

0.03

koc

0.00278

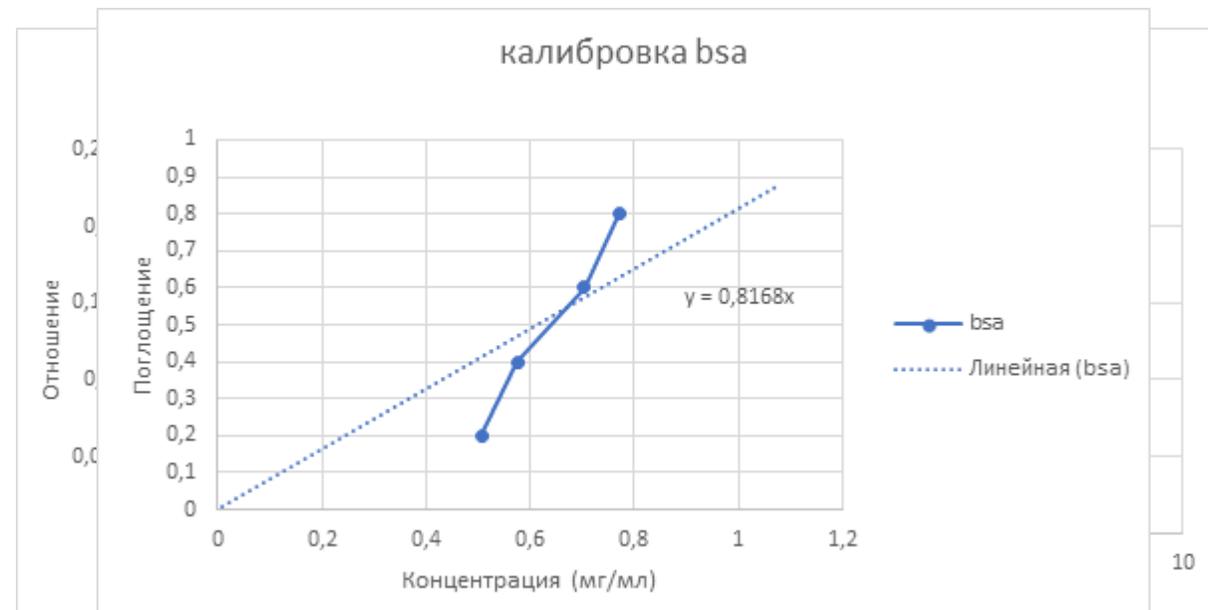
kdm

Np: 30000

kt: 0.07

kdp: 0

Reset



# Выводы

- В результате работы была создана математическая модель экспрессии белка в клетке (показывающую зависимость концентрации белка в клетке от времени).
- Модель была реализована в виде численного решения дифференциальных уравнений на языке Python 3. Для модели был создан интерактивный интерфейс, позволяющий изменять параметры системы и осуществлять визуализацию модели в виде графиков.
- Были проведены эксперименты и получена информация об экспрессии репортерного белка в реальной культуре клеток *E. coli*, модифицированных плазмидой с геном красного флуоресцентного белка, в зависимости от времени.
- Следует также отметить, что в будущем планируется уточнить модель путём учёта особенностей роста культуры клеток в ограниченном объёме.

# Источники информации

- A.D. Endy. (2005). Foundations for engineering biology. *Nature*. 438, 449-453.
- Timothy S. Gardner, Charles R. Cantor, James J. Collins. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*. 403, 339-342.
- M. B. Elowitz, S. Leibler. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*. 403, 335-338.
- Powell K. (2018). How biologists are creating life-like cells from scratch. *Nature*. 563, 172-175.
- D. G. Gibson, G. A. Benders, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, H. Baden-Tillson, et. al. (2008). Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome. *Science*. 319, 1215-1220.
- Lim J.W., Ha D., Lee J., Lee S.K. and Kim T. (2015) Review of Micro/Nanotechnologies for Microbial Biosensors. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3:61. doi: 10.3389/fbioe.2015.00061.
- D'Souza S. F. (2001). Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 16, 337–353.
- Lei Y., Chen W., Mulchandani A. (2006). Microbial biosensors. *Anal. Chim. Acta.* 568, 200–210.
- Su L., Jia W., Hou C., Lei Y. (2011). Microbial biosensors: a review. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1788–1799.
- Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W. et al. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Nature*. 356, 438–442.
- Христофорова Н.К. (1985) Биоиндикация загрязнения морских вод тяжелыми металлами (докторская диссертация).

# Спасибо за внимание!

- Винников Ренат Сергеевич
- [renatvinnikov@gmail.com](mailto:renatvinnikov@gmail.com)