

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01 - Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Бакалаврская работа

**ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ
ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ GLNR**

Работа завершена:

«31» 05 2021 г.




(Л.Л.Ядыкова)

Работа допущена к защите:

Научные руководители:

д.б.н., доцент кафедры генетики


«01» 06 2021 г.



(А. Р. Каюмов)

м.н.с.

«01» 06 2021 г.

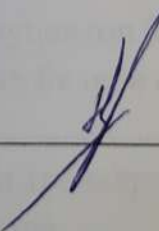


(Д. Э. Журавлева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«02» 06 2021 г.



(В. М. Чернов)

Казань – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Бактерии рода <i>Lactobacillus</i>	7
1.2 Регуляция транскрипции у бактерий.....	7
1.3. Азотный обмен в клетках бактерий.....	11
1.3.1 Глутаминсинтетаза	12
1.3.2 Регуляция азотного метаболизма в клетках бактерий.....	14
1.4. Семейство транскрипционных факторов MerR.....	16
1.4.1 Фактор транскрипции GlnR	17
1.5. РII белки	19
Заключение	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	24
2.1 Штаммы и плазмиды	24
2.2 Питательные среды.....	24
2.3 Условия культивирования бактерий.....	25
2.4 Выделение плазмидной ДНК.....	25
2.5 Электрофорез ДНК	26
2.6 Трансформация клеток <i>E. coli</i>	26
2.7 Скрининг трансформантов на гиперпродукцию белка.....	26
2.8 Гиперпродукция белков в клетках <i>E. coli</i> и получение клеточных экстрактов.....	27
2.9 Очистка белков на Ni-NTA сефарозе	27
2.10 Очистка белков на Strep-tactin сефарозе.....	28
2.11 Электрофорез белков в денатурирующих условиях [Laemmli, 1970]....	29
2.12 Окрашивание белковых гелей Coomassie brilliant blue R250	29
2.13 Диализ белков.....	29
2.14 Метод задержки в геле	29
2.15 Вычисление константы диссоциации.....	31
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1 Получение штаммов-гиперпродуцентов белков GlnR-his6, GlnR-ST, PotN-ST, и очистка рекомбинантных белков с помощью аффинной хроматографии.....	33
3.2 Оценка взаимодействия фактора транскрипции GlnR с промоторами генов предполагаемого GlnR-регулона	36

3.3 Оценка влияния РИ-подобного белка PotN на ДНК-связывающую	
активность белка GlnR	40
ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	42

AA	Глутаминовая кислота
ADP	Аденозиндифосфат (с аденозин-5-трифосфатом)
ADP	Инфузионный аденозиндифосфат (с аденозин-5-трифосфатом)
ADM	Полимеризация аденина
AK	Рибонуклеотидная кислота
APTA	Синтетическая полиакриловая кислота
AA	Азид-анион
ATP	Аденозинтрифосфат
CHN	Гидрокарбонат натрия
CHNAT	Гидрокарбонат натрия (с аденозин-5-трифосфатом)
CPD	Цитидиндифосфат (с аденозин-5-трифосфатом)
EV	Гидрокарбонат натрия (с аденозин-5-трифосфатом)
PSA	Ионообменная смола
SA	Буферная емкость
SDS	Детергентный сульфат натрия
TGSD	Тетрагидрофурановый растворитель

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Lactobacillus* практически повсеместно распространены в природе, широко используются человеком в пищевой промышленности, в производстве пробиотиков, силосовании кормов для животных и проч. Несмотря на это, азотный метаболизм этих бактерий остается слабоизученным.

У большинства бактерий экспрессия генов азотного метаболизма находится под контролем фактора транскрипции GlnR, относящемуся к семейству MerR факторов транскрипции. Белки MerR семейства – ДНК-связывающие регуляторы транскрипции – состоят из N-концевого участка связывания ДНК (спираль-поворот-спираль), С-концевой области сигнальной трансдукции, которая специфична для распознаваемого эффектора, а также двойной антипараллельной спирали, необходимой для димеризации [Brown, 2003]. В клетках *B. subtilis* GlnR принимает участие в регуляции метаболизма азота в условиях избытка азотного питания. Ген белка GlnR (*glnR*) находится в опероне *glnRA* вместе с геном глутаминсинтетазы (*glnA*) и является его ауторепрессором. В условиях, когда в клетке возникает избыток глутамина, глутаминсинтетаза ингибируется по типу обратной связи продуктом реакции – глутамином, и такая ингибированная глутаминсинтетаза способна связываться с белком GlnR, стабилизируя его ДНК-связывающую активность, с образованием комплекса ГС-GlnR-ДНК. Известно, что в клетках *B. subtilis* GlnR регулирует экспрессию генов *glnRA*, *trnA*, и оперона ассимиляции мочевины *ureABC* [Fisher, 2002]. Экспрессию каких генов способен регулировать GlnR *Lentilactobacillus hilgardii* пока остается неясным.

Проведенное ранее полногеномное секвенирование *Lentilactobacillus hilgardii* позволило аннотировать геном и идентифицировать *in silico* 13 генов потенциального GlnR-регулона, содержащих гипотетический сайт для связывания с GlnR.

Целью работы являлось охарактеризовать взаимодействие белка GlnR с промоторами генов потенциального GlnR-регулона.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Получить штаммы-гиперпродуценты белков GlnR-his₆, GlnR-ST, PotN-ST, и очистить белки с помощью аффинной хроматографии.
- 2) Оценить взаимодействие белков GlnR-his₆ и GlnR-ST с промоторами генов потенциального GlnR-регулона.
- 3) Оценить влияние PII-подобного белка PotN на ДНК-связывающую активность белка GlnR как возможный механизм регуляции экспрессии GlnR-регулона.

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

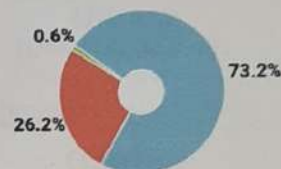
ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Ядыкова Людмила Леонидовна
Самоцитирование
рассчитано для: Ядыкова Людмила Леонидовна
Название работы: Ядыкова антиплагиат
Тип работы: Не указано
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

ЗАИМСТВОВАНИЯ		26.2%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		73.2%
ЦИТИРОВАНИЯ		0.6%
САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%

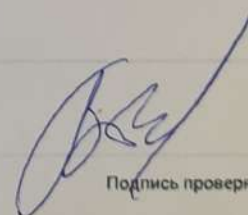
ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 24.05.2021



Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирование по eLIBRARY.RU; Перефразирование по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Переводные заимствования

Работу проверил: Бабынин Эдуард Викторович
ФИО проверяющего

Дата подписи:



Подпись проверяющего



Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.