

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

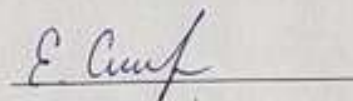
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ПЛАЗМОДИОФОРЫ А: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ
АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ

Обучающийся 4 курса
группы 01-903
"13" июня 2023 г.



Гараева Д.И.

Научные руководители
канд. биол. наук, н.с.
"13" июня 2023 г.



Смирнова Е.О.

канд. биол. наук, доцент
"13" июня 2023 г.



Зеленихин П.В.

Заведующий кафедрой
микробиологии
д-р биол. наук, профессор
"13" июня 2023 г.



Ильинская О.Н.

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 3 |
| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 6 |
| 1.1 Оксипирины — продукты липоксигеназного каскада | 6 |
| 1.2 Ферменты CYP74 цитохромов P450 | 9 |
| 1.3 Плазмодиофорол А как объект исследования | 16 |
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 22 |
| 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 22 |
| 2.1 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) | 22 |
| 2.2 Электрофоретическое разделение аминокислот в агарозном геле..... | 22 |
| 2.3 Клонирование в вектор pET-32 Ek/LIC..... | 23 |
| 2.4 Определение нуклеотидной последовательности ДНК | 23 |
| 2.5 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> | 24 |
| 2.6 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> | 25 |
| 2.7 Получение и очистка рекомбинантного белка CYP50918A1 | 26 |
| 2.8 Определение кинетической активности фермента CYP50918A1..... | 27 |
| 2.9 Идентификация продукта каталитического действия рекомбинантного фермента CYP50918A1 | 28 |
| 2.10 Определение антибактериальной активности плазмодиофорола А | 28 |
| 2.11 Среды для культивирования бактерий..... | 29 |
| 2.12 Статистическая обработка данных..... | 29 |
| 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ | 30 |
| 3.1 Получение очищенного препарата рекомбинантного белка CYP50918A1. | 30 |
| 3.2 Получение плазмодиофорола А | 32 |
| 3.3 Исследование биологической активности плазмодиофорола А..... | 33 |
| ВЫВОДЫ | 37 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 38 |

ВВЕДЕНИЕ

Оксилипины образуются в ходе перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, и данный процесс является общим для всех аэробных организмов [Grechkin, 1998]. В живых организмах оксилипины участвуют в процессах роста и развития, являются компонентами сигнальных систем, вовлечены в процессы формирования ответов на стрессовые факторы. Одним из способов образования оксилипинов является липоксигеназный каскад, основными компонентами которого являются липоксигеназы и ферменты CYP74 суперсемейства цитохромов P450.

В расшифрованном геноме слизевика *Plasmodiophora brassicae* были обнаружены гены, которые кодируют белки, похожие на ферменты семейства CYP74. Данные белки представляют новое семейство CYP50918 цитохромов P450. Ген CYP50918A1 был клонирован; соответствующий белок был получен и охарактеризован как гидропероксидбициклаза, катализирующая образование бициклических оксилипинов, основным из которых является плазмодиофорол А [Grechkin, 2021].

Ранее было показано, что некоторые бактерии подавляют рост слизевика *P. brassicae* [Lahlali *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2019]. Вероятно, что слизевик также образует метаболиты для борьбы с такими бактериями. Одними из таких метаболитов могут являться оксилипины, поскольку ранее было показано, что некоторые оксилипины, в частности (ω 5Z)-этеролоновая кислота, обладают ярко выраженным антимикробным эффектом [Торонкова *et al.*, 2018].

В связи со всем вышесказанным цель настоящего исследования — определение антибактериальной активности плазмодиофорола А.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) Получить рекомбинантный белок CYP50918A1.
- 2) Получить плазмодиофорол А.

3) Охарактеризовать биологическую активность плазмодиофора А по отношению к *Bacillus subtilis* spp, *B. altitudinis* S388 и *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043.

ВЫВОДЫ

1) Получен очищенный препарат рекомбинантного фермента СУР50918А1 *Plasmodiophora brassicae*, пригодный для получения плазмодиофорола А.

2) Получен плазмодиофорол А – основной продукт превращения 13-гидроперекиси α -леноленовой кислоты при участии фермента СУР50918А1.

3) Установлено, что плазмодиофорол А сдерживает рост *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 в течение первых 24 часов, далее рост бактерии восстанавливается. Бактерии *Bacillus subtilis* spp и *Bacillus altitudinis* S388 являются более восприимчивыми к действию плазмодиофорола А. В данном случае бактериостатическое действие сохраняется в течение 48 часов.