

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БОТАНИКИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Направление 06.03.01 биология

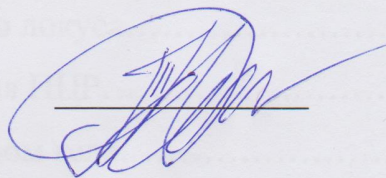
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**БЕЛОК SVX *PECTOBACTERIUM ATROSEPTICUM* КАК ФАКТОР
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПЕКТОБАКТЕРИЙ И РАСТЕНИЙ**

Работа завершена:

"21" 05 2020 г.



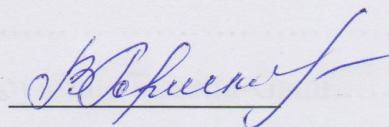
(Тендюк Н. В.)

Работа допущена к защите:

Научные руководители

к.б.н., с.н.с., доцент

"21" 05 2020 г.



(Горшков В. Ю.)

к.б.н., с.н.с.

"21" 05 2020 г.

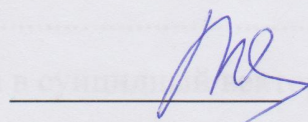


(Гоголева Н. Е.)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

"27" 05 2020 г.



(Тимофеева О. А.)

Казань – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Характеристика бактерий рода <i>Pectobacterium</i>	9
1.2 Факторы вирулентности пектобактерий.....	10
1.3 Системы секреции бактерий рода <i>Pectobacterium</i>	13
1.4 Svx белок – фактор вирулентности <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	19
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1 Объекты исследования и их культивирование.....	25
2.2 Построение филогенетических деревьев.....	26
2.3 Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности Svx белка.....	26
2.4 Конструирование мутантного локуса.....	27
2.5 Полимеразная цепная реакция ПЦР.....	27
2.6 Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	28
2.7 Лигирование целевых участков ДНК с векторами	28
2.8 Получение химически компетентных клеток <i>E.coli</i> NovaBlue/Rosetta Gami.....	29
2.9 Трансформация клеток <i>E.coli</i> NovaBlue/Rosetta-Gami.....	29
2.10 Отбор клонов после трансформации.....	29
2.11 Выделение плазмидной ДНК.....	30
2.12 Замена целевого локуса ECA0931 (ген <i>svx</i>) на канамициновую кассету.....	30
2.13 Помещение мутантного локуса в суицидный вектор pKNG101.....	31
2.14 Определение нуклеотидной последовательности ДНК.....	31
2.15 Трансформация клеток <i>E.coli</i> CC118 с помощью электропорации.....	32

2.16	Трехродительское скрещивание и отбор мутантных клонов.....	32
2.17	Построение кривых роста дикого типа и нокаут-мутанта <i>P. atrosepticum</i>	33
2.18	Индукция экспрессии гена Svх белка в штамме <i>E. coli</i> Rosetta-Gami.....	34
2.19	Приготовление образцов для электрофореза белков в ПААГ в денатурирующих условиях.....	34
2.20	Лизис клеток в малых объемах.....	34
2.21	Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях.....	35
2.22	Очистка телец включения.....	36
2.23	Рефолдинг белка.....	36
2.24	Очистка рекомбинантного Svх белка методом аффинной хроматографии.....	37
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	38
3.1	Филогенетический анализ Svх-подобных белков.....	38
3.2	Функциональные домены Svх подобных белков.....	46
3.3	Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности Svх белка <i>P. atrosepticum</i>	48
3.4	Получение нокаут-мутанта <i>Pectobacterium atrosepticum</i> по гену Svх белка.....	50
3.4.1	Создание модели мутантного локуса <i>in silico</i> для направленного мутагенеза гена <i>svх P. atrosepticum</i>	50
3.4.2	Конструирование мутантного локуса <i>in vitro</i> для направленного мутагенеза гена <i>svх P. atrosepticum</i>	51
3.4.3	Получение мутанта <i>Pectobacterium atrosepticum</i> по гену, кодирующему белок Svх.....	56
3.4.4	Сравнение кривых роста дикого штамма <i>P. atrosepticum</i> и его мутантной по гену белка Svх формы.....	57
3.5	Получение очищенного препарата Svх белка.....	59
3.5.1	Создание конструкции для клонирования гена Svх белка <i>P. atrosepticum</i>	

in silico.....	59
3.5.2 Создание конструкции для клонирования in vitro.....	60
3.5.3 Индукция гетерологичной экспрессии гена белка Svx в штамме E. coli Rosetta-Gami.....	62
3.5.4 Выделение телец включения, рефолдинг и очистка рекомбинантного белка.....	63
4. ВЫВОДЫ	66
5. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	67
6. ПРИЛОЖЕНИЯ.....	78

- CC1T – система секреции первого типа
- CC2T – система секреции второго типа
- CC3T – система секреции третьего типа
- CC5T – система секреции пятого типа
- CC6T – система секреции шестого типа
- ПААГ – полиакриламидный гель
- BLAST- Basic Local Alignment Search Tool
- Col – коллоид
- CPDC – cistral polymerase extension cloning
- DIGE – двумерный гель-электрофорез
- DMSO – диметилсульфоксид
- dsp – disease specific proteins
- E. coli – *Escherichia coli*
- EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота
- GSH – глутатион восстановленный
- GSSG – глутатион окисленный
- HABA – 4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid
- I-TASSER - Iterative Threading Assembly Refinement
- LB – среда Luria-Bertani
- MUSCLE - Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation
- NCBI – National Center of Biotechnology Information

ВЫВОДЫ:

1. С помощью филогенетического анализа было выявлено, что Svx-подобные белки представителей класса *Gamma*proteobacteria делятся на две группы – характерные для фитопатогенов и свободноживущих бактерий. Для Svx-подобных белков фитопатогенов характерна консервативная область на С-конце, ассоциированная с ацилтрансферазным доменом.

2. Получена мутантная форма *Pectobacterium atrosepticum* по гену, кодирующему белок Svx, для дальнейшего сравнения стратегий взаимодействия с растениями дикой и мутантной форм микроорганизма.

3. Получен очищенный препарат рекомбинантного Svx белка *P. atrosepticum*, действие которого в отношении растения-хозяина будет проверено в ходе дальнейшего исследования.