

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»  
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ  
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01 – биология

Профиль « Зоология и общая биология »

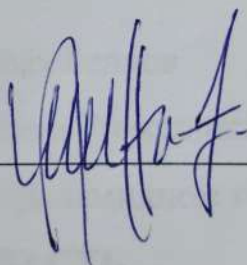
ВЫПУСКАЯ КВАЛИФИЦИОННАЯ РАБОТА

Генетический и биохимический анализ почвенных бактерий *Novosphingobium*  
*sp. P6W* способных деструкции абсцизовой кислоты

Студентка IV курса

Группа 01-604

«06» 05 2020г.

  
\_\_\_\_\_ ( Н. А. А. Октавиа)

Научный руководитель:

с.н.с к.б.н


«06» 05 2020г.

  
\_\_\_\_\_ ( Н. Е. Гоголева)

И.о.Заведующего кафедрой

к.б.н., доцент

«06» 05 2020г.

  
\_\_\_\_\_ (А. Р. Каюмов)

Казань-2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>5</b>
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>7</b>
1.1. Фитогормон абсцизовая кислота (АБК) в растений	7
1.2. Биосинтетические пути и связанные с ними ферменты АБК	9
1.3. Бактерий <i>Novosphingobium sp</i> P6W реагирует АБК	12
1.3.1. Классификация и геном <i>Novosphingobium sp.</i> P6W	12
1.3.2. Эксперименты фитогормонов в периодических культурах бактериями	13
1.4. Гидроксилирование ароматического кольца	17
1.5. Структура RO	18
1.6. Терминальный оксигеназный участок	19
1.7. Перенос электрона в оксигеназах Риске	21
1.8. Каталитический механизм	25
1.9. Рекомбинантная ДНК	27
1.10. Клонирование ДНК	30
1.11. Очистка рекомбинантных белков	31
1.12. Осаждение белков (Protein Precipitation)	33
1.13. Электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE)	33
<b>2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	<b>37</b>
2.1. Штаммы и векторы, использованные для молекулярного Клонирования	37
2.2. Методы исследования	38
2.2.1. Среды для культивирования бактерий	38
2.2.2. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток	39
2.2.3. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле	39

2.2.4. Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)	40
2.2.5. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> (Гловер, 1988)	40
2.2.6. Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	41
2.2.7. Хранение штаммов бактерий (Гловер, 1988)	42
2.2.8. Экспрессия целевого белка в клетках <i>E. coli</i>	42
2.2.9. Очистка целевого белка с помощью аффинной хроматографии на Bio-Scale Mini Profinity GST колонке	43
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>45</b>
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>53</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ</b>	<b>54</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>55</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Засуха, засоление почв, низкие температуры и атака фитопатогенов являются главными стрессовыми факторами, ингибирующими рост растений и не позволяющими реализовать их генетический потенциал. Адаптация растений к абиотическим факторам регулируется главным образом фитогормоном абсцизовой кислотой (АБК). Хотя в настоящее время наибольшее внимание сфокусировано на регуляции накопления АБК в растениях под действием абиотического стресса, ее снижение так же критично для развития растений и стрессового ответа.

Рост-стимулирующие ризосферные бактерии (plant-growth-promoting rhizobacteria, PGPR) могут усиливать рост растений благодаря продукции фитогормонов ауксинов и цитокининов или утилизации ингибиторов роста. В настоящее время хорошо изучена утилизация бактериями предшественников этилена. В то же время, мало что известно о микробной деградации других фитогормонов. Штамм В1 бактерии *Serratia proteamaculans* метаболизировал синтетический цитокинин N6-бензиладенин в качестве источника углерода *in vitro* с помощью фермента ксантидегидрогеназы [Frame, *et al.*, 2006].

Значительные количества АБК постоянно вносятся в почву посредством экссудации корней, оборота корней и включения тканей отмерших побегов. Предполагается, что растения не регулируют концентрации АБК в почвенном растворе и ее концентрация может постепенно увеличиваться в течение вегетационного периода, что может привести к ингибированию прорастания семян. Накопление АБК во время нехватки воды может способствовать поддержанию роста корней в высыхающей почве. И наоборот, экзогенная АБК может действовать как ингибитор роста корней у хорошо поливаемых растений. Более того, способность синтезировать и секретировать АБК может быть

связана с вирулентностью грибковых патогенов. В связи с этим информация об использовании PGPR с использованием АВА представляет особый интерес.

Недавно с использованием селективной среды с добавлением АВА был выделен бактериальный штамм *Novosphingobium sp.* P6W. Анализ транскриптома этого штамма в условиях роста на АБК как единственном источнике углерода показал, что происходит значительное увеличение экспрессии генов диоксигеназ. Гидроксилирование является одним из наиболее распространенных начальных этапов каталитической деградации различных соединений бактериальной природы. Во многих случаях гидроксилирование катализируется оксигеназой, относящейся к риске диоксигеназам (RO). Хотя RO известны своей ролью в биodeградации ароматических углеводородов, эти ферменты имеют широкий спектр субстратов, включая терпеноиды к которым относится и АБК. В связи с этим целью данной работы стало выявление роли диоксигеназы при утилизации абсцизовой кислоты штаммом ризосферных бактерий *Novosphingobium sp.* P6W.

Для достижения указанной цели в рамках данной работы были поставлены следующие задачи:

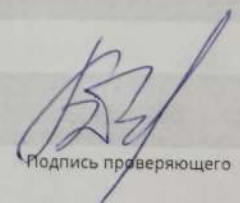
1. Разработка плазмидной конструкции для гетерологичной экспрессии гена TQ38\_015200 аннотированного как альфа субъединица диоксигеназы, участвующей в гидроксилировании ароматического кольца.
2. Клонирование открытой рамки считывания гена TQ38\_015200 белка альфа субъединицы диоксигеназы, участвующая в гидроксилировании ароматического кольца (AXB77682) в векторе для экспрессии.
3. Получение препарата рекомбинантного белка TQ38\_015200 *Escherichia coli* BL21.



## СПРАВКА

### о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Октавиа Нур Атиках Азайяти
Подразделение	Генетика
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	Антиплагиат Октавиа Нур
Название файла	Антиплагиат Октавиа нур.docx
Процент заимствования	7.12 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.32 %
Процент оригинальности	92.56 %
Дата проверки	18:56:22 23 мая 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по eLibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по Wiley (RuEn); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов; Коллекция Wiley
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	23.05.20  Подпись проверяющего

