

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ЗООЛОГИИ И ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль «Зоология беспозвоночных и функциональная гистология»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

ЗАВГАРОВОЙ АЙГУЛЬ УСМАНОВНЫ

**КЛОНИРОВАНИЕ СПЛАЙС-ФОРМ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ
ЛИЧИНКИ КОМАРА *POLYPEDILUM VANDERPLANKI***

Работа завершена:

«31» мая 2018 г.  А.У. Завгарова

Работа допущена к защите:

Научные руководители:

Ведущий научный сотрудник

Кандидат биологических наук

«1» июня 2018 г.  (О. А. Гусев)

Кандидат биологических наук

«1» июня 2018 г.  (А. А. Несмелов)

Заведующий кафедрой

Кандидат биологических наук, доцент

«01» 06 2018 г.  (Р. М. Сабиров)

Казань – 2018

Реферат

Ключевые слова: *Polypedilum vanderplanki*, ангидробиоз, антиоксидант, глутатионпероксидаза, ПЦР, плазмида Pa17, клонирование.

Изоформы глутатионпероксидазы *P. vanderplanki* представляют особый интерес в биотехнологии в контексте изучения механизмов защиты биоматериалов от окислительного стресса при недостатке воды.

При переходе в ангидробиотическое состояние антиоксидантная система личинки *P. vanderplanki* позволяет ей справиться с высоким уровнем окислительного стресса. При этом личинка насекомого экспрессирует большое число защитных белков, в том числе – ферменты антиоксидантной защиты. У данного организма, при переходе в ангидробиотическое состояние, GPx является одним из наиболее высоко экспрессируемых антиоксидантных белков.

Из сухих личинок *P. vanderplanki* была выделена РНК, переведена в кДНК. С помощью ПЦР, после проведения ряда оптимизаций удалось получить фрагменты ДНК, совпадающие по своей длине с длинами всех предсказанных изоформ GPx. После очистки продуктов ПЦР, было успешно проведено клонирование изоформ GPx. Последующее секвенирование рекомбинантных плазмид продемонстрировало наличие всех целевых изоформ GPx и отсутствие мутаций.

Таким образом, все 8 изоформ GPx *P. vanderplanki*, известных по данным секвенирования РНК, были успешно клонированы в плазмиду Pa17 и подготовлены для получения и очистки соответствующих белков.

Выпускная квалификационная работа состоит из 71 страницы, включает 34 рисунка и 11 таблиц. Список литературы включает 45 иностранных источников.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. Обзор литературы.....	7
1.1 Характеристика ангидробиоза	7
1.2 Окислительный стресс и ангидробиоз.....	10
1.3 Общая характеристика глутатионпероксидаз	13
1.4 Субстраты глутатионпероксидаз	15
1.5 Изоформы глутатионпероксидаз, их функциональная специализация	
19	
1.6 Сплайсинг как способ образования изоформ ферментов	23
1.7 Альтернативный сплайсинг	25
1.8 Технология рекомбинантной ДНК	28
2. Материалы и методы	34
2.1 Объект исследования	34
2.2 Выделение РНК из личинок <i>P. vanderplanki</i> , синтез кДНК	35
2.3 Синтез кДНК	35
2.4 ПЦР	36
2.5 Очистка ДНК	39
2.6 Рестрикция	39
2.7 Лигирование	40
2.8 Клонирование.....	41
2.9 ПЦР-скрининг колоний	41
2.10 Выделение плазмида PaI7 с целевой вставкой.	42
2.11 Секвенирование плазмид PaI7 с целевой вставкой.....	43
3. Результаты.....	44
3.1 Нуклеотидные последовательности изоформ Gpx <i>P. vanderplanki</i> ..	44
3.2 Определение условий проведения ПЦР	45
3.3 ПЦР	46
3.4 Очистка изоформ GPx для клонирования, рестрикция	48

4. Обсуждение результатов.....	64
ВЫВОДЫ.....	66
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	67

АМК – Академия менеджмента
 АИМ – Академия информационных технологий
 АИИ – Академия инженерного и информационного образования
 ВУЗ – высшее учебное заведение
 ВИУ – вузовский информационный центр
 СОУ – среднее профессиональное образование
 ЗПЧ – земельно-поместный чин
 АДМК – Ассоциация для развития менеджментологии и менеджмента
 АМР – Ассоциация менеджеров
 АС – автоматизированная система
 ВЭТ – вузовский научный труд, издаваемый в электронной форме
 МАДС – методика адекватного документирования
 РПД – реальная практика документоведения
 СМИ – массмедиа
 СКА – Страна кибернетики
 ДКА – Дипломатический корпус при бывшем борисовском президентстве
 РПД – реальная практика документоведения
 ОФР – открытые форматы файлов
 РС – российский стандарт
 ТРН – технология реальной практики
 АИИАиС – Академия ИИА и Академия ИИС
 АИИАиС – Академия информационных технологий, изданная в электронном виде