

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

Специальность: 06-03-01 – биология

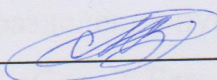
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

ГИДРОПЕРОКСИДЛИАЗА NtHPL ТАБАКА ОБЫКНОВЕННОГО  
(*NICOTIANA TABACUM*): ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО  
ФЕРМЕНТА И АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ЕГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО  
ДЕЙСТВИЯ

Работа завершена:

"21" мая 2020г.



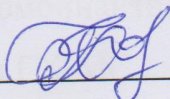
(М.Е. Воробьева)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

К.б.н., с.н.с.

"21" мая 2020г.

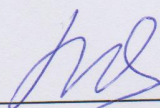


(Я.Ю. Топоркова)

Заведующий кафедрой,

Д.б.н. (профессор)

"27" мая 2020г.



(О.А. Тимофеева)

Казань–2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	6
1.1 Оксипипины	6
1.2 Характеристика суперсемейства цитохромов P450	9
1.3 Семейство CYP74 цитохромов P450	14
1.3.1 Алленоксидсинтазы	17
1.3.2 Гидропероксидлиазы	19
1.3.3 Дивинилэфирсинтазы	22
1.3.4 Эпоксиспиритсинтазы	24
1.4 Табак как объект исследования	25
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	28
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	28
2.1 Методы биоинформатики	28
2.2 Выделение тотальной РНК из растений табака	28
2.3 Реакция обратной транскрипции и получение дц-кДНК	29
2.4 Молекулярное клонирование	29
2.4.1 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	29
2.4.2 Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот	30
2.4.3 Клонирование в вектор pGem-T Easy	30
2.4.4 Определение нуклеотидной последовательности ДНК	32
2.4.5 Клонирование в векторе pET-32Ek/LIC	33
2.5 Получение и очистка рекомбинантного белка	36
2.6. Подготовка образцов для ГХ-МС	37
2.7. Анализ продуктов инкубации	38
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	39
3.1 Биоинформационный анализ ферментов CYP74 табака <i>Nicotiana tabacum</i>	39
3.2 Получение очищенного препарата рекомбинантного белка NtHPL	41

3.3 Анализ продуктов каталитического действия рекомбинантного фермента NtHPL	46
<b>ВЫВОДЫ</b>	51
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	52

1. ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
2. ДНА – дезоксирибонуклеиновая кислота
3. ДР – дезоксирибонуклеиновая кислота
4. ДС – дезоксирибонуклеиновая кислота
5. ДТ – дезоксирибонуклеиновая кислота
6. ДФ – дезоксирибонуклеиновая кислота
7. ДХ – дезоксирибонуклеиновая кислота
8. ДЦ – дезоксирибонуклеиновая кислота
9. ДЧ – дезоксирибонуклеиновая кислота
10. ДШ – дезоксирибонуклеиновая кислота
11. ДЩ – дезоксирибонуклеиновая кислота
12. ДЪ – дезоксирибонуклеиновая кислота
13. ДЫ – дезоксирибонуклеиновая кислота
14. ДЭ – дезоксирибонуклеиновая кислота
15. ДЮ – дезоксирибонуклеиновая кислота
16. ДЯ – дезоксирибонуклеиновая кислота
17. ДЧД – дезоксирибонуклеиновая кислота
18. ДЧД – дезоксирибонуклеиновая кислота
19. ДЧД – дезоксирибонуклеиновая кислота
20. ДЧД – дезоксирибонуклеиновая кислота
21. ДЧД – дезоксирибонуклеиновая кислота
22. ДЧД – дезоксирибонуклеиновая кислота
23. ДЧД – дезоксирибонуклеиновая кислота
24. ДЧД – дезоксирибонуклеиновая кислота
25. ДЧД – дезоксирибонуклеиновая кислота

## ВЫВОДЫ

1. Выделена тотальная РНК из листьев табака, на основе которой была получена двуцепочечная кДНК.
2. Клонирована открытая рамка считывания гена *NtHPL* в векторе системы pET.
3. Получен рекомбинантный фермент табака в клетках *Escherichia coli*.
4. Проведена очистка рекомбинантного фермента табака методом металлоаффинной хроматографии.
5. Проведён анализ продуктов каталитического действия рекомбинантного фермента табака. Исследуемый фермент является гидропероксидлиазой с дополнительной ЭАС активностью. Ферменту присвоено тривиальное название NtHPL/EAS.