

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

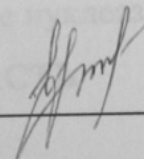
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

ВЛИЯНИЕ ГИДРОКСИЛАМИНА НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ
АКТИВНОСТИ МУТАНТНОГО ВАРИАНТА ЭНДОНУКЛЕАЗЫ
SERRATIA MARCESCENS HIS89GLY

Работа завершена:

" 6 " июня 2018г.




(И.И. Фазлеева)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., доцент кафедры генетики

" 6 " июня 2018 г.

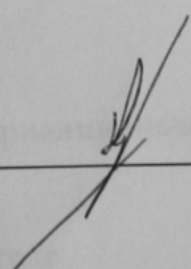


(О.А. Гимадутдинов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

" 7 " июня 2018г.



(В.М. Чернов)

Казань – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Нуклеазы	8
1.2 Внеклеточная эндонуклеаза <i>Serratia marcescens</i>	9
1.2.1 Строение нуклеазы <i>Serratia marcescens</i>	10
1.2.2 Механизм действия нуклеазы	16
1.2.3 Биосинтез и секреция фермента	18
1.2.4 Влияние различных факторов на активность нуклеазы	21
1.3 Химическое восстановление ферментов низкомолекулярными соединениями	23
1.3.1 Механизм эффекта химического восстановления	24
1.3.2 Химическое восстановление нуклеаз	24
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	26
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	26
2.1 Объект исследования	26
2.2 Питательные среды	26
2.3 Определение ингибирующей концентрации гидроксиламина	27
2.4 Построение кривых роста	27
2.5 Определение активности неспецифических нуклеаз с помощью индикаторного агара	27
2.6 Очистка фермента	28
2.7 SDS-электрофорез в полиакриламидном геле	29
2.8 Гидролиз плазмидной ДНК	31
2.9 Электрофорез в агарозном геле	31
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1 Изучение влияния гидроксиламина на выживаемость	

рекомбинантного штамма <i>E.coli</i> TGE900 <i>pHisNucSma(wt)</i>	33
3.2 Определение ингибирующей концентрации гидроксиламина	34
3.3 Динамика роста рекомбинантных штаммов <i>E.coli</i> TGE900 <i>pHisNucSma(H89G)</i> и <i>E.coli</i> TGE900 <i>pHisNucSma(wt)</i> в присутствии гидроксиламина	34
3.4 Определение активности неспецифических нуклеаз с помощью индикаторного агара	36
3.5 Определение влияния гидроксиламина на восстановление активности мутантного варианта эндонуклеазы <i>NucSma(H89G)</i>	38
3.6 Кинетика расщепления плазмидной ДНК очищенными ферментами	42
ВЫВОДЫ	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	46

ВВЕДЕНИЕ

Эндонуклеаза *Serratia marcescens* в последние годы находит широкое применение в молекулярно-биологических, биохимических исследованиях, а также в медицине и в сельском хозяйстве. К настоящему времени она является одной из наиболее изученных внеклеточных бактериальных эндонуклеаз. В литературе накоплен существенный объем информации о её физико-химических свойствах, структуре, механизме действия, а также о строении активного центра [Friedhoff *et al.*, 1994a, b; Pingoud *et al.*, 1999, Gimadutdinow *et al.*, 2018].

Фермент под промышленным названием Benzonase применяют при очистке фармацевтических и биохимических препаратов от нежелательных примесей нуклеиновых кислот [Pingoud *et al.*, 1999,]. Наличие у фермента противовирусного действия, а также отсутствие мутагенного действия делают возможным использование данной эндонуклеазы в ветеринарии, а именно, при защите пчел от вирусного паралича [Лещинская и др., 1991]. Но для того, чтобы использовать эндонуклеазу *Serratia marcescens* в терапии заболеваний человека, необходимо получение высокоочищенного препарата [Банникова и др., 1999; Burrit *et al.*, 2016, Moon *et al.*, 2017].

Возрастающие потребности в данном ферменте вызывают необходимость в получении сверхпродуктов эндонуклеазы *Serratia marcescens*, а также изучении ее свойств. Для решения таких задач, на основе технологии рекомбинантной ДНК были созданы штаммы *E.coli*, которые способны синтезировать в больших количествах эндонуклеазу *Serratia marcescens* [Friedhoff *et al.*, 1994a; Rai *et al.*, 2016].

В настоящее время большое распространение получил метод химического восстановления инактивированных ферментов. Данный метод заключается в том, что при добавлении в среду с неактивным мутантным ферментом низкомолекулярных соединений, сходных по химическим свойствам с утерянными аминокислотными остатками, происходит восстановление активности данного фермента. Эффект восстановления связан

с тем, что в результате мутаций исходные аминокислоты заменяются на более низкомолекулярные. В результате чего в активном центре могут образоваться своеобразные "карманы", в которые могут попасть экзогенные молекулы, содержащие реакционные группы, утраченные вследствие мутагенеза, что может привести к восстановлению активности мутантного фермента [Pecacchi, 2008]. Было предположено, что такими веществами могут служить предшественники аминокислот, а также низкомолекулярные амины [Midon *et al.*, 2012]. Также было показано, что с увеличением размера молекулы экзогенного вещества в реакционной смеси уменьшается степень восстановления активности фермента [Chen *et al.*, 2007].

Ранее было показано, что при базальном уровне экспрессии в рекомбинантных штаммах *E.coli*, некоторое количество внеклеточной нуклеазы *Serratia marcescens* может активироваться также внутри клетки. Это может вызвать неспецифический гидролиз ДНК/РНК, что, в свою очередь, может привести к подавлению роста культуры. Исходя из этого, было выдвинуто предположение, что добавление в среду вещества, сходного по свойствам с замененными аминокислотными остатками в активном центре, может активировать мутантный фермент и вызвать замедление роста культуры [Ball *et al.*, 1992; Midon *et al.*, 2012].

Целью данной работы было определение влияния гидроксиламина на восстановление активности мутантного варианта эндонуклеазы *Serratia marcescens* NucSma(H89G).

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить динамику роста рекомбинантных штаммов *E.coli* TGE900 pHisNucSma(wt) и pHisNucSma(H89G) в присутствии и отсутствии гидроксиламина.
2. Выявить восстановление активности мутантного варианта эндонуклеазы *Serratia marcescens* в лизате рекомбинантного штамма *E.coli* с помощью индикаторного агара.

3. Получить очищенные ферменты дикого *NucSma*(wt) и мутантного *NucSma*(H89G) вариантов.
4. Установить влияние гидроксилamina на восстановление активности очищенного мутантного варианта эндонуклеазы *NucSma*(H89G).
5. Определить уровень восстановления активности мутантного *NucSma*(H89G) с помощью гидроксилamina по сравнению с исходным ферментом *NucSma* wt.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Фазлеева Ильмира Ильдаровна
Факультет, кафедра, номер группы	ИФМиБ, генетика, 01-640-1
Тип работы	Не указано
Название работы	Фазлеева Ильмира Ильдаровна Фазлеева И..docx
Название файла	Фазлеева И..docx
Процент заимствования	15,85%
Процент цитирования	0,80%
Процент оригинальности	83,34%
Дата проверки	22:42:50 05 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска "КПФУ"; Модуль поиска Интернет; Коллекция ГЭОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Коллекция eLIBRARY.RU; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	Подпись проверяющего

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.