

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ**

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01 - Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Бакалаврская работа

**In vitro характеристика взаимодействия белков теплового шока БТШ20, БТШ70 и БТШ100 из *Acholeplasma laidlawii***

Работа завершена:

«31» 05 2021 г.

(С.В. Кольшикина)

Работа допущена к защите:

Научные руководители:

д.б.н., доцент кафедры генетики

«02» 06 2021 г.

(А. Р. Каюмов)

м.н.с.

«02» 06 2021 г.

(Л.С. Чернова)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«03» 06 2021 г.

(В. М. Чернов)

Казань – 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	7
1.1 Характеристика и молекулярные особенности белков теплового шока .....	7
1.2 Характеристика и молекулярные особенности БТШ20 .....	10
1.3 Характеристика и молекулярные особенности БТШ70 .....	13
1.4 Характеристика и молекулярные особенности БТШ100 .....	17
1.5 Механизм и роль взаимодействия БТШ20, БТШ70 и БТШ100 у разных организмов.....	19
1.6 Характеристика микоплазменных БТШ20, БТШ70 и БТШ100.....	22
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	27
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	27
2.1 Штаммы и плазмиды .....	27
2.2 Питательные среды и условия культивирования бактерий .....	27
2.3 Трансформация клеток <i>E. coli</i> .....	28
2.4 Гиперпродукция белков в клетках <i>E. coli</i> и получение клеточных экстрактов .....	28
2.5 Очистка белков на Ni-NTA сефарозе .....	29
2.6 Очистка белков на Strep-tactin сефарозе .....	29
2.7 Диализ белков .....	30
2.8 Электрофорез белков в денатурирующих условиях .....	30
2.9 Окрашивание белковых гелей кумасси синим .....	31
2.10 Оценка степени денатурации белков красителем SYPRO Orange.....	31

2.11 Биоинформатика.....	31
2.12 Статистический .....	32
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>33</b>
3.1 Получение рекомбинантных белков с делециями N- и C- концов белка IbpA <i>A. laidlawii</i> .....	33
3.2 Получение рекомбинантных белков DnaK и ClpB .....	35
3.3 Оптимизация генетического кода.....	38
3.4 Функциональная роль взаимодействия БТШ20 (IbpA) с БТШ100/ClpB <i>in</i> <i>vitro</i> .....	46
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>49</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>50</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Клетки различных организмов реагируют на стрессовые состояния по-разному, но преимущественно они повышают экспрессию группы белков, называемых белками теплового шока (БТШ). По различной молекулярной массе белки теплового шока разделяют на 6 семейств: БТШ100, БТШ90, БТШ70, БТШ60, БТШ40 и малые белки теплового шока мБТШ20 [Bakthisaran *et al.*, 2015]. IbpA (inclusion body-associated protein A) относится к семейству мБТШ  $\alpha$ -кристаллического типа ( $\alpha$ -мБТШ), имеют низкую молекулярную массу (17 кДа) и консервативный С-концевой  $\alpha$ -кристаллический домен. Такие белки обладают высокой шаперонной активностью [Борхсениус *et al.*, 2016]. Наличие гена, кодирующего мБТШ IbpA у микоплазмы *A. laidlawii*, которая является единственной микоплазмой способной жить вне организма хозяина и также является патогеном для растений, может объяснять её высокие адаптационные способности. Также известно, что клетками *A. laidlawii* синтезируется полипептид с молекулярной массой 72 кДа, идентифицируется он как АТФ-зависимый шаперон DnaK (бактериальный аналог БТШ70 человека) и полипептид молекулярной массой 100 кДа АТФ-зависимый шаперон ClpB [Вонский и др., 1993]. Данные исследований указывают на то, что ClpB (БТШ100) облегчает солюбилизацию белковых агрегатов с участием других шаперонов, в том числе DnaK (БТШ70) и БТШ20. Эта особенная функция, возможно и объясняет ее важность для выживания и восстановления организма после теплового стресса [Zolkiewski, 1999; Motohashi, 1999; Glover 1998; Parsell, 1994]. Тем не менее, остаётся ещё много вопросов о механизме работы шаперонных комплексов с участием белков теплового шока.

**Цель работы** охарактеризовать *in vitro* роль взаимодействия белков БТШ20, БТШ70 и БТШ100 микоплазмы *Acholeplasma laidlawii* в процессе предотвращения тепловой денатурации белков.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Очистить рекомбинантные белки ІврА с делециями N- и C- концевых мотивов методом аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе.
- 2) Очистить белок DnaK (БТШ70) и ClpB (БТШ100) методом аффинной хроматографии на Strep-tactin сефарозе.
- 3) Оценить роль взаимодействия белков БТШ20 и БТШ100 микоплазмы *Acholeplasma laidlawii* в процессе предотвращения тепловой денатурации белков.



## СПРАВКА

Казанский (Приволжский) федеральный  
университет

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

### ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Колышкина Софья Валентиновна

Самоцитирование

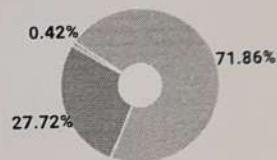
рассчитано для: Колышкина Софья Валентиновна

Название работы: In vitro характеристика взаимодействия белков теплового шока БТШ20, БТШ70 и БТШ100 из Acholeplasma laidlawii

Тип работы: Выпускная квалификационная работа

Подразделение:

### РЕЗУЛЬТАТЫ



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 25.05.2021

Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Переводные заимствования

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.