

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА
БЕЛКА YRDF *BACILLUS PUMILUS*

Обучающийся 2 курса
группы 01-240-2



Лугинская С.А.

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



Ульянова В.В.

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Ингибиторы прокариотических рибонуклеаз.....	7
1.1.1 Бактериальные рибонуклеазы	7
1.1.2 Механизмы регуляции активности рибонуклеаз бактерий.....	8
1.1.3 Бактериальные ингибиторы рибонуклеаз.....	9
1.2 Ингибиторы эукариотических рибонуклеаз	11
1.2.1 Рибонуклеазы эукариот	11
1.2.2 Ингибиторы рибонуклеаз эукариот	12
1.2.3 Применение рибонуклеазных ингибиторов млекопитающих.....	14
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	16
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	16
2.1 Бактериальные штаммы, плазмиды и белковые препараты.....	16
2.2 Питательные среды	17
2.3 Условия культивирования бактерий.....	17
2.4 Выделение геномной ДНК.....	17
2.5 Выделение плазмидной ДНК	18
2.6 Полимеразная цепная реакция	18
2.7 Гель-электрофорез	19
2.8 ТА-клонирование ПЦР-фрагментов	20
2.9 Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции	20
2.10 Лигирование.....	21
2.11 Трансформация <i>Escherichia coli</i>	21
2.12 Индукция экспрессии рекомбинантного белка	21
2.13 Выделение белка.....	22
2.14 Обессоливание белка.....	23
2.15 Электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ДСН-ПААГ)	24

2.16 Вестерн-блот	25
2.17 Электрофорез белков в нативных условиях.....	26
2.18 Определение ингибиторной активности с помощью метода Анфинсена.....	27
2.19 Круговой диохроизм	29
2.20 Биоинформатический анализ	30
2.21 Статистическая обработка данных	30
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	31
3.1 Клонирование гена <i>urdF</i> в экспрессионный штамм <i>Escherichia coli</i> ..	31
3.2 Выделение и очистка рекомбинантного белка YrdF	33
3.3 Оценка физико-химических свойств рекомбинантного ингибитора YrdF <i>Bacillus pumilus</i>	36
3.4 Характеристика ингибиторной активности рекомбинантного белка YrdF по отношению к РНКазам различного происхождения.....	40
ВЫВОДЫ.....	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	47

ВВЕДЕНИЕ

Рибонуклеазы представляют собой важную группу ферментов, которая гидролизует фосфодиэфирные связи в РНК-субстратах. Эти ферменты встречаются в организмах всех известных форм жизни — от бактерий и архей до человека. Особый интерес среди ученых сыскали бациллярные рибонуклеазы. В настоящее время существует множество доказательств их возможного практического применения в противоопухолевой и противовирусной терапии [Dudkina *et al.*, 2020]. И хотя прикладные исследования находятся на пике, фундаментальные аспекты все еще требуют дополнительных исследований. Одним из таких направлений является изучение механизмов регуляции рибонуклеазной активности.

Еще в 1967 году был открыт специфичный ингибитор рибонуклеазы *Bacillus amyloliquefaciens* – барназы, известный как барстар [Hartley, 1989]. Было показано, что этот ингибитор способен образовывать нековалентный комплекс с барназой, закрывая ее активный центр, это делает фермент неактивным и, как следствие, неспособным расщеплять РНК [Guillet *et al.*, 1993]. Данный комплекс был досконально изучен во множестве исследований: от таргетной терапии рака до сборки супрамолекулярных комплексов. Сравнительный анализ бациллярных геномов показал, что *Bacillus pumilus* имеет ген-ортолог барстара, обозначенный *yrdF* [Ulyanova *et al.*, 2011]. Было выдвинуто предположение, что продукт этого гена является ингибитором секретлируемой рибонуклеазы *B. pumilus* – биназы, однако, достоверных сведений о структуре, роли и функциях этого белка нет.

Целью настоящей работы стало получение препарата белка YrdF *Bacillus pumilus* для подтверждения его ингибиторной активности в отношении рибонуклеаз и изучения его физико-химических свойств.

В соответствии с поставленной целью, в работе решались следующие экспериментальные задачи:

- 1) Клонировать ген предполагаемого ингибитора РНКаз *yrdF Bacillus pumilus* в экспрессионный штамм *Escherichia coli*.
- 2) Выделить и очистить рекомбинантный белок YrdF из клеток *Escherichia coli*.
- 3) Изучить физико-химические свойства рекомбинантного ингибитора YrdF *Bacillus pumilus*.
- 4) Подтвердить ингибиторную способность рекомбинантного белка YrdF по отношению к РНКазам различного происхождения.

ВЫВОДЫ

1) Ген *yrdF* *Bacillus pumilus* был клонирован на плазмиде pET15b в штамме *Escherichia coli* BL21(λ DE3), позволяющем проводить индуцируемую экспрессию целевого белка, меченного полигистидиновой меткой.

2) Рекомбинантный белок YrdF был выделен в гомогенном виде из клеток *Escherichia coli* BL21(λ DE3) pET15b-YrdF-Bpu и очищен от низкомолекулярных примесей. Выход белка составил 47 мг.

3) Было показано, что YrdF является отрицательно заряженным гидрофильным белком, вторичная структура которого представлена на 57% неупорядоченными структурами, на 35% – β -листами и на 8% – α -спиралями. Моделирование третичной структуры выявило наличие трех β -листов и четырех α -спиралей.

4) Было установлено, что белок YrdF обладает ингибиторной активностью в отношении биназы, подавляя ее РНКазную активность на 50 % в эквимольном количестве и на 90 % при 10-кратном избытке, при этом не оказывая влияния на каталитическую активность РНКазы А.