

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 (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОДУКТА ГЕНА *YRDF BACILLUS*
LICHENIFORMIS

Обучающийся 2 курса
группы 01-240-2



Али Сафана Таха Ахмед

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



В.В. Ульянова

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Общая характеристика бактерий рода <i>Bacillus</i>	7
1.1.1 Разнообразие, распространение и свойства бацилл	7
1.1.2 Вещества, продуцируемые бактериями рода <i>Bacillus</i>	8
1.1.3 Практическое применение <i>Bacillus licheniformis</i>	10
1.2 Бациллярные рибонуклеазы и их ингибиторы	12
1.2.1 Физико-химические и каталитические свойства бациллярных рибонуклеаз	12
1.2.2 Функции рибонуклеаз	13
1.2.3 Ингибиторы бактериальных РНКаз	14
1.2.4 Применение ингибиторов РНКаз	15
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	16
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	16
2.1 Штаммы бактерий	16
2.2 Питательные среды	16
2.3 Буферы и растворы	16
2.4 Культивирование микроорганизмов	16
2.5 Индукция экспрессии рекомбинантного белка	17
2.6 Выделение и очистка белка	17
2.7 Электрофорез белков	17
2.8 Диализ	18
2.9 Определение концентрации белка	18

2.10 Круговой дихроизм	19
2.11 Измерение РНКазной активности по модифицированному методу Апфинсена	19
2.12 Биоинформатический анализ.....	20
2.13 Статистическая обработка.....	20
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	21
3.1 Индукция экспрессии гена <i>yrdF Bacillus licheniformis</i> в рекомбинантном штамме <i>Escherichia coli</i> BL21(λ DE3) pET15b-yrdF-Bli	21
3.2 Выделение и очистка рекомбинантного белка YrdF <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> из клеток <i>Escherichia coli</i> BL21(λ DE3) pET15b-yrdF-Bli ...	24
3.3 Анализ физико-химических свойств и ингибиторной активности белка YrdF <i>Bacillus licheniformis</i> в отношении секретируемых рибонуклеаз бацилл	26
ВЫВОДЫ.....	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	33

ВЕДЕНИЕ

Рибонуклеазы (РНКазаы) — важные ферменты, которые регулируют обмен, процессинг и деградацию РНК в клетках, тем самым играя важную роль в различных биологических процессах. Однако точный контроль активности РНКазы имеет решающее значение для поддержания гомеостаза РНК и предотвращения aberrантной деградации РНК. Ключевую роль в нем играют ингибиторы рибонуклеаз, обеспечивающие точный баланс путем модуляции активности РНКаз.

В последние годы ингибиторы рибонуклеаз привлекли значительное внимание благодаря своим универсальным функциям и значимости в клеточной физиологии. Понимание взаимодействия между ингибиторами рибонуклеаз и РНКазами стало центром внимания, особенно в молекулярной биологии, биохимии и биомедицинских исследованиях. Ингибиторы РНКаз служат незаменимыми инструментами, облегчающими изучение биологии РНК, регуляции экспрессии генов и механизмов развития отдельных заболеваний. Разнообразна роль ингибиторов рибонуклеаз в путях процессинга РНК и клеточных реакциях на стресс. Кроме того, исследуются потенциальные терапевтические эффекты воздействия ингибиторов рибонуклеаз в контексте заболеваний человека, включая рак, нейродегенеративные расстройства и вирусные инфекции.

Ингибиторы рибонуклеаз можно использовать в качестве средств, предотвращающих нежелательную активность рибонуклеаз. Ингибиторы рибонуклеаз способны регулировать стабильность РНК и, тем самым, влиять на различные клеточные процессы. Это может быть особенно актуально при заболеваниях, связанных с нарушением метаболизма РНК, таких как рак и вирусные инфекции. Кроме того, ингибиторы рибонуклеаз сами по себе могут служить мишенями для лекарственных средств, что позволяет разработать ингибиторы, избирательно воздействующие на определенные рибонуклеазы, участвующие в различных заболеваниях.

В связи с этим, целью данной работы стали выделение и очистка предполагаемого ингибитора рибонуклеаз – продукта гена *urdF Bacillus licheniformis*.

Для достижения поставленной цели решали следующие экспериментальные задачи:

- 1) Провести индукцию экспрессии гена *urdF Bacillus licheniformis* в рекомбинантном штамме *Escherichia coli* BL21(λ DE3) pET15b-urdF-Bli.
- 2) Выделить и очистить рекомбинантный белок YrdF *Bacillus licheniformis* из клеток *Escherichia coli*.
- 3) Проанализировать физико-химические свойства и ингибиторную активность белка YrdF в отношении секретируемых рибонуклеаз бацилл.

ВЫВОДЫ

1) Была проведена индукция экспрессии гена *yrdF* *Bacillus licheniformis* в штамме *Escherichia coli* BL21(λDE3) pET15b-yrdF-Bli с помощью 0.4 мМ ИПТГ в течение 4 часов, позволившая наработать в клетках рекомбинантный белок YrdF, меченный полигистидиновой меткой.

2) Был выделен рекомбинантный белок YrdF *Bacillus licheniformis* в количестве 5 мг из клеток *Escherichia coli* методом аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами никеля и очищен от низкомолекулярных примесей с помощью диализа.

3) Было установлено, что продукт гена *yrdF* *Bacillus licheniformis* является кислым гидрофильным белком, во вторичной структуре которого преобладают альфа-спирали. По своему функциональному назначению белок YrdF является ингибитором секретлируемых рибонуклеаз бацилл.