

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 (ОКСО 020400.62) – Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
Дипломная работа

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РН ПОДОБНОГО БЕЛКА PotN С  
ДЕГИДРОЕНАЗОЙ КЕТОКИСЛОТ АсоВ  
ИЗ LACTOBACILLUS BREVIS**

Работа завершена:

"23" мая 2019 г.

(А.В. Лобанова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель  
к.б.н., доцент кафедры генетики

"30" мая 20\_\_ г.

(А.Р. Каюмов)

м.н.с.

"30" мая 20\_\_ г.

(З.И. Исхакова)

Заведующий кафедрой  
д.б.н., профессор

"05" июня 20\_\_ г.

(В.М. Чернов)

Казань - 2019

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	7
1.1 Азотный обмен в клетках бактерий .....	7
1.2 Роль GlnK в бактериальной ассимиляции азота .....	8
1.3 Семейство РII белков.....	11
1.4 Семейство ДНК-связывающих белков MerR.....	15
1.5 Pot-белки в <i>Escherichia coli</i> .....	17
<b>Заключение.....</b>	20
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....</b>	21
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	21
2.1 Штаммы и плазмиды .....	21
2.2 Питательные среды и условия культивирования .....	21
2.3 Выделение геномной ДНК .....	22
2.4 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	22
2.5 Электрофорез ДНК .....	23
2.6 Очистка ДНК из агарозного геля.....	24
2.7 Выделение плазмидной ДНК .....	24
2.8 Трансформация клеток <i>E.coli</i> плазмидными ДНК.....	25
2.9 Рестрикция ДНК.....	25
2.10 Реакция Гибсона.....	25
2.11 Гиперпродукция белков в клетках <i>E.coli</i> и получение клеточных экстрактов .....	26
2.12 Очистка белка на Strep-tactin сефарозе .....	26

2.13 Очистка белков на Ni-NTA сепарозе.....	27
2.14 Диализ белков.....	27
2.15 Определение количества белка по методу Мэрион Брэдфорд.....	28
2.16 Электрофорез белков в денатурирующих условиях .....	28
2.17 Окрашивание белковых гелей Coomassie brilliant blue R250 .....	29
2.18 Окрашивание белковых гелей нитратом серебра .....	29
2.19 Метод ко-элюции с очищенными белками .....	29
2.20 Осаждение белков с помощью трихлоруксусной кислоты .....	30
2.21 Иммуноблотинг .....	30
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>32</b>
3.1 Подбор условий экспрессии белка PotN в клетках <i>Lactobacillus brevis</i> <i>subsp. gravesensis</i> .....	32
3.2 Клонирование гена <i>acoB</i> в экспрессионный вектор pET15b .....	33
3.3 Очистка белка AcoB-His <sub>6</sub> методом аффинной хроматографии на Ni-NTA сепарозе, и белков PotN и PotN91 – на Strep-tactin сепарозе.....	35
3.4 Оценка взаимодействия белков PotN и PotN91 с белком AcoB <i>in vitro</i>	38
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>40</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>41</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Азот является одним из макроэлементов, необходимых для жизни, поскольку он входит в состав аминокислот, нуклеотидов, аминосахаров (требуемых для синтеза липополисахаридов и пептидогликана), кофакторов и п-аминобензоата (предшественника в биосинтезе фолата). Бактерии в ходе эволюции приобрели механизмы для ассимиляции азота из различных источников – от органических веществ и ионов аммония до атмосферного азота ( $N_2$ ). Ионы аммония являются предпочтительным источником азота, поскольку азот может быть включен непосредственно в глутамин и глутаминовую кислоту (основные доноры азота в биосинтетических реакциях) и является наименее энергетически дорогим субстратом для переработки. Напротив, органические источники, такие как аминокислоты, должны быть сначала переведены в ионы аммония, либо в неорганические соединения  $NO_3$ ,  $NO_2$  [Reitzer *et al.*, 1996]. При этом для ассимиляции нитратного азота расходуется 4 молекулы НАДН, что определяет высокую энергозатратность этого процесса. Поэтому процесс ассимиляции различных источников азота подвержен строгому контролю.

В большинстве бактерий основным регулятором азотного метаболизма выступают РII белки сигнальной трансдукции. Впервые идентифицированные в 1969 году как компонент регуляторного аппарата для глутаминсинтетазы, РII белки в настоящее время охарактеризованы как белки, играющие ключевую роль в контроле метаболизма азота прокариотической клетки и пластид растений [Ninfa *et al.*, 2005]. РII белки осуществляют регуляцию транскрипции генов, модулируя активность других регуляторных белков и каталитическую активность ферментов, участвующих в метаболизме азота [Huergo *et al.*, 2012]. Также они могут регулировать активность белков, необходимых для транспорта азотистых соединений в клетку [Arcondeguy *et al.*, 2001].

Бактерии рода *Lactobacillus* широко представлены в окружающей среде и широко применяются в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Однако молекулярные механизмы регуляции их азотного метаболизма остаются на сегодняшний день практически не изученными. Анализ геномов бактерий рода *Lactobacillus* показал, что только у 4 представителей данного рода встречается ген PII-подобного белка. В отличие от близкородственных бактерий рода *Bacillus*, в геноме *Lactobacillus* ген PII белка располагается в опероне PotABCD, на основе чего белок был обозначен как PotN.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что белок PotN взаимодействует с рядом различных белков: с фактором транскрипции GlnR и с АТФазной субъединицей PotA ABC-транспортера полиаминов PotABCD. Кроме этого, в экспериментах по ко-элюции и ко-иммунопреципитации белка PotN из клеток лактобацилл в качестве белка партнера был также обнаружен белок, имеющий высокую степень гомологии с дегидрогеназой кетокислот AcoB.

**Целью** работы являлось доказать возможность взаимодействия PII подобного белка PotN с дегидрогеназой кетокислот AcoB из *Lactobacillus brevis* subsp. *gravesensis*.

В работе решались следующие задачи:

- 1) Подобрать условия экспрессии белка PotN в клетках *Lactobacillus brevis* subsp. *gravesensis*.
- 2) Клонировать ген *acoB* в экспрессионный вектор pET15b.
- 3) Провести очистку белка AcoB-His<sub>6</sub> методом аффинной хроматографии на Ni-NTA сепарозе, белков PotN и PotN91 – на Strep-tactin сепарозе.
- 4) Оценить взаимодействие белков PotN с белком AcoB *in vitro* методом ко-элюции.



## СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
**Антиплагиат.ВУЗ**

Автор работы                           Лобанова Ангелина Викторовна  
Подразделение                         ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ  
Тип работы                             Выпускная квалификационная работа  
Название работы                     ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РII ПОДОБНОГО БЕЛКА PotN С ДЕГИДРОГЕНАЗОЙ КЕТОКИСЛОТ  
AcoB ИЗ LACTOBACILLUS BREVIS

Название файла                     Диплом Анг ап.docx

Процент заимствования           16,82%

Процент цитирования              0,50%

Процент оригинальности        82,68%

Дата проверки                     15:58:19 29 мая 2019г.

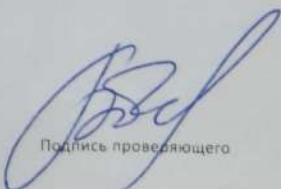
Модули поиска                     Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных  
заимствований; Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска  
Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска  
перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет;  
Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов

Работу проверил                     Бабынин Эдуард Викторович

ФИО проверяющего

Дата подписи

29.05.19

  
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.