

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
Дипломная работа
КОНСТРУИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ С
КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
БЕЛКОВ

Работа завершена:

" 4 " 06 2022 г.




(А.А. Ляховец)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
д.б.н., доцент

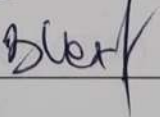
" 4 " 06 2022 г.



(А.Р. Каюмов)

м.н.с.

" 4 " 06 2022 г.



(З.И. Исхакова)

И.о. заведующего кафедрой

д.б.н., доцент

" 5 " 06 2022 г.



(А.Р. Каюмов)

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 СМЕШАННЫЕ КУЛЬТУРЫ.....	6
1.1.1 ПОЛИМИКРОБНЫЕ БИОПЛЕНКИ.....	6
1.2 НОЗОКОМИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ.....	10
1.2.1 СУПЕРПАТОГЕНЫ ESKAPE.....	11
1.2.1.1 <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i>	12
1.2.1.2 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	13
1.2.1.3 <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	14
1.2.1.4 <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	15
1.2.1.5 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	16
1.2.1.6 <i>ENTEROBACTER SPP</i>	18
1.3 ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ В ИЗУЧЕНИИ ПАТОГЕНОВ.....	19
1.3.1 GFP И ЕГО СВОЙСТВА.....	20
1.3.2 РАЗНООБРАЗИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ.....	21
Заключение	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1 ШТАММЫ И ПЛАЗМИДЫ.....	24
2.2 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....	24
2.3 ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР).....	25
2.4 ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК.....	26
2.5 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК.....	26
2.6 ОЧИСТКА ДНК ИЗ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ.....	27
2.7 РЕАКЦИЯ ГИБСОНА.....	27
2.8 ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК <i>E. COLI</i> ПЛАЗМИДНЫМИ ДНК МЕТОДОМ ТЕПЛОВОГО ШОКА.....	28

2.9	ТРАНСФОРМАЦИЯ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ КЛЕТОК <i>S. AUREUS</i> ПЛАЗМИДНЫМИ ДНК.....	28
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		30
3.1	КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЛАЗМИДЫ pJEM-YFP, pJEM-TURQUOISE.....	30
3.2	ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ <i>E. COLI</i> NISSLE pJEM-TURQUOISE И <i>S. AUREUS</i> pCTUF-GFP	33
3.3	ОЦЕНКА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ШТАММОВ <i>S. AUREUS</i> pCTUF-GFP И <i>E. COLI</i> NISSLE pJEM2-TURQ В СМЕШАННОЙ БИОПЛЕНКЕ	35
ВЫВОДЫ		37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....		38

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЛРС	Бета-лактамазы расширенного спектра действия
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ИВЛ	Искусственная вентиляция легких
ИСМП	Инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи
anm2CP	Нефлуоресцентный малиновый белок
anm1GFP1	Зелёный флуоресцентный белок 1
anm1GFP2	Зелёный флуоресцентный белок 2
BSI	Внутрибольничные инфекции кровотока
ESKAPE	<i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacter spp.</i>
GFP	Зелёный флуоресцентный белок
FP	Флуоресцентный белок
iRFP	Флуоресцирующий в инфракрасной области спектра белок
LA	Питательная среда Лурия-Бертани агаризованная
LB	Питательная среда Лурия-Бертани
MRSA	Метициллин-резистентный <i>Staphylococcus aureus</i>
Tur	Turquoise, бирюзовый флуоресцентный белок
VRE	Ванкомицин-резистентные энтерококки
YFP	Желтый флуоресцентный белок
DiOC ₆	3,3'-дигексилосакарбоцианин йодидом

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что 65–80% всех инфекций человека связаны с образованием биопленки, это представляет серьезную проблему для современной медицины в связи с высокой резистентностью бактерий к антимикробным препаратам в составе таких сообществ. Поэтому моделирование моно- и полимикробных биопленок необходимы для лучшего понимания механизмов, участвующих в формировании биопленок и резистентности [Coenye, Nelis, 2010]. Необходимо знать о трехмерной структуре биопленок, так как внеклеточные полимерные вещества вносят свой вклад в антимикробные резистентные свойства биопленок, препятствуя транспорту некоторых антибиотиков. Разрушение архитектуры биопленки для воздействия на клетки бактерий и повышения эффективности противомикробных препаратов является потенциальным подходом к борьбе с инфекциями [Mountcastle *et al.*, 2021].

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) выделенный медузы *Aequorea victoria* широко используется для исследований экспрессии генов. Поскольку для обнаружения GFP требуется только облучение ближним УФ или синим светом, он не ограничен доступностью субстрата и, таким образом, обеспечивает превосходную систему маркеров для изучения сложных экосистем [Fu *et al.*, 2015]

Целью работы являлось получение бактериальных штаммов *E. coli* с конститутивной экспрессией флуоресцентных белков YFP и Turquoise для изучения смешанных бактериальных культур.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Конструирование плазмид pJem-YFP, pJem-Turquoise.
- 2) Получение штаммов *S. aureus* pCTuf-GFP и *E. coli* pJem-Turquoise.
- 3) Оценка флуоресценции трансформированных штаммов в смешанной биопленке.



СПРАВКА

Казанский (Приволжский) федеральный университет

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Ляховец А. А.
 Самоцитирование рассчитано для: Ляховец А. А.
 Название работы: Конструирование бактериальных штаммов с конститутивной экспрессией флуоресцентных белков
 Тип работы: Выпускная квалификационная работа
 Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	6.81%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	6.81%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	92.85%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	92.85%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.34%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.34%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 02.06.2022

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 02.06.2022 12:39

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); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Патенты СССР, РФ, СНГ; СМИ России и СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Каюмов Айрат Рашитович

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.