

Министерство образования и науки РФ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

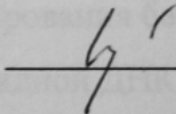
Бакалаврская работа

ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ

БЕЛКА GlnR ИЗ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 8 PA-3

Работа завершена:

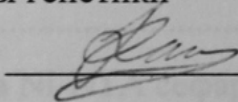
Группа 01-301

« 1 » 06 2017 г.  (О.А. Неустроева)

Работа допущена к защите:

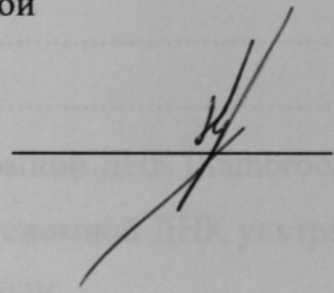
Научный руководитель:

к.б.н., доцент кафедры генетики

« 1 » 06 2017 г.  (А.Р. Каюмов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

« » 2017 г.  (В.М. Чернов)

Казань – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 <i>Lactobacillus</i> – общая характеристика рода	8
1.2 Ассимиляция азота бактериями	10
1.3 Глутаминсинтетаза (GS)	12
1.4 Пути образования глутамата	14
1.5 Фактор транскрипции GlnR.....	16
1.6 Методы детекции и анализа ДНК-белкового взаимодействия.....	17
Заключение	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	21
2.1 Штаммы и плазмиды	21
2.2 Питательные среды	21
2.3 Условия культивирования бактерий.....	21
2.4 Выделение плазмидной ДНК [Sambrook <i>et al.</i> , 1989].....	22
2.5 Трансформация клеток <i>E. coli</i>	22
2.6 Скрининг трансформантов на гиперпродукцию белков	23
2.7 Электрофорез белков в денатурирующих условиях.....	23
2.8 Гиперпродукция белков в клетках <i>E. coli</i> и получение клеточных экстрактов.....	24
2.9 Очистка белков на Ni-NTA сефарозе	24
2.10 Определение количества белка по методу Мэрион Брэдфорд (Bradford, 1976).....	25
2.11 Диализ белков	25
2.12 Выделение геномной ДНК [Sambrook <i>et al.</i> , 1989]	25
2.13 Фрагментация геномной ДНК ультразвуком	26
2.14 Электрофорез ДНК.....	26

2.15 Очистка ДНК из агарозного геля.....	27
2.16 Получение библиотеки ДНК с потенциальным сайтом связывания с белком GlnR	27
2.18 ПЦР (Полимеразная цепная реакция).....	28
2.19 Оценка изменения электрофоретической подвижности ДНК (EMSA) ...	29
2.20 Биоинформатика	30
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	31
3.1 Получение штаммов-продуцентов рекомбинантного белка LpGlnR и очистка белка на Ni-NTA сефарозе	31
3.2 Оценка взаимодействия белка LpGlnR с ДНК методом задержки в геле (EMSA).....	33
3.3 Поиск генов-мишеней фактора транскрипции LpGlnR в клетках <i>Lactobacillus plantarum</i>	40
ВЫВОДЫ	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	44

ADP	Аденозиндифосфат
ATP	Аденозинтрифосфат
DTT	Дитиотрейтол
EMSA	сдвиг электрофоретической подвижности
EPSs	экзополисахариды
Gln	глютамин
GDH	глютамацдегидрогеназа
GOGAT	глютаминсинтаза
GS	глютаминсинтаза
Ni-NTA	никель-нитратная последовательность из 6 гистидинов
IPTG	изопропанол β-D-1-тиогалактозил

ВВЕДЕНИЕ

Азот – один из необходимых макроэлементов всех живых организмов, который входит в состав белков, нуклеиновых кислот и компонентов клеточной стенки. Бактерии имеют способность к усвоению различных азот содержащих веществ, различающихся по его концентрации, а также по доступности для усвоения. Предпочтительными источниками являются те, которые требуют минимальных энергетических затрат, т.е. содержащие азот в восстановленной форме [Gunka & Commichau, 2012]. Для подавляющего числа бактерий - это глутамин и ионы аммония. Поэтому в клетках бактерий азотный метаболизм подвержен строгому контролю в зависимости от доступности источника азота [Leigh, Dodsworth, 2007].

Лактобациллы относятся к группе микроорганизмов, которые широко используются в биотехнологических процессах [Georgieva *et al.*, 2015; Gemechu, 2015]. Но, не смотря на их широкое применение и распространение в природе, азотный метаболизм этих микроорганизмов по сей день остается слабо изученным.

В большинстве бактерий основным фактором транскрипции, контролирующим активность генов азотного метаболизма, является белок GlnR [Kormelink *et al.*, 2012]. Данный ген входит в состав оперона *glnRA*, вместе с геном глутаминсинтетазы, как и у многих других бактерий [Gunka & Commichau, 2012]. В клетках бацилл также имеется ортолог GlnR – фактор транскрипции TnrA, который взаимодействует с тем же сайтом связывания, что и GlnR и осуществляет контроль активности генов азотного обмена [Fernandes *et al.*, 2017]. В клетках *Streptococcus mutans* Is тот же сайт распознается белком PmrA [Chen *et al.*, 2016]. В этих организмах под контролем GlnR находится достаточно большой регулон. Эти данные позволяют предположить участие фактора транскрипции GlnR *Lactobacillus plantarum* в контроле активности генов азотного метаболизма.

Целью работы являлось охарактеризовать ДНК-связывающую активность белка GlnR из *Lactobacillus plantarum* 8 PA-3 и идентифицировать гены мишени этого фактора транскрипции.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Получить штамм-продуцент рекомбинантного белка LpGlnR и очистить белок методом аффинной хроматографии на Ni-NTA сефарозе
- 2) Провести оценку взаимодействия белка LpGlnR с ДНК методом задержки в геле (EMSA)
- 3) Провести поиск генов-мишеней фактора транскрипции LpGlnR в клетках *Lactobacillus plantarum* 8PA-3.

Лактобациллы широко распространены в природе. Места обитания молочнокислых бактерий определяются их потребностью в питательных веществах и одним способом получения энергии – брожением. С наибольшей вероятностью их можно обнаружить в почве, в водоемах. Естественными условиями обитания лактобацилл являются: молоко, включая места его переработки, молочные продукты; растения и разлагающиеся растительные остатки; кишечник, урогенитальный тракт и слизистые оболочки человека и животных [Шлегель, 1987]. Например, естественными обитателями влагалища человека являются *Lactobacillus gairdneri*, *L. gasseri*, *L. iners* и *L. jensenii*, которые в норме содержатся там в большом количестве, но при этом отсутствуют в других местах обитания [Mendes-Scares et al., 2014].

В ходе метаболизма лактобациллы продуцируют органические кислоты (в основном, молочную), перекиси, антибиотики и бактериоцины. Образование этих веществ является критерием антиагонистической активности лактобацилл, что определяет их антибактериальный эффект в отношении представителей патогенной и условно-патогенной флоры [Шендеров, 2001]. Соответственно, колонии лактобацилл пробиотическими