

Министерство образования и науки РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ  
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01(ОКСО 020400.62) -биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

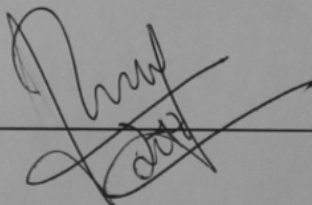
Магистерская диссертация

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *rimM*  
КОДИРУЮЩЕГО ФАКТОР СОЗРЕВАНИЯ СВОБОДНОЙ  
МАЛОЙ РИБОСОМАЛЬНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ 30S У

*Staphylococcus aureus*

Работа завершена:

" \_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2017 г.



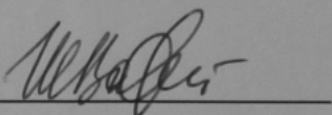
Ж. Ндабахагамийе

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

PhD

" \_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2017 г.

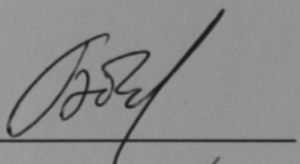


Ш.З. Валидов

Научный руководитель

к.б.н., доцент

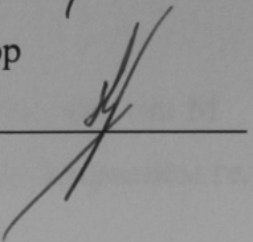
" \_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2017 г.



Э.В. Бабынин

Заведующий кафедрой д.н., профессор

" \_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2017 г.



В.М. Чернов

Казань 2017

<b>СОДЕРЖАНИЕ</b>	
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	
1.1 Регуляция трансляции у прокариот	6
1.1.1 Роль факторов инициации	7
1.1.1.1 Фактор инициации IF1	7
1.1.1.2 Фактор инициации IF2	8
1.1.1.3 Фактор инициации IF3	8
1.2 Инициация трансляции у прокариот	8
1.2.1 Инициация трансляции: многостадийный путь	10
1.2.2 Основные компоненты инициационного комплекса	11
1.2.2.1 Структура 30S-рибосомной субъединицы	11
1.2.2.2.Связывание и адаптация мРНК к 30S-субъединице	12
1.3 Биогенез и кофакторы 30S комплекса рибосомы	16
1.3.1 Кооперативное связывание белков и РНК	16
1.3.2 Кинетический путь 30S комплекса	17
1.4 Rim M в инициации трансляции	19
1.4.1 Rim M и процессинг 16S рРНК	19
1.5 Rim M и грамположительные организмы	21
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	
2.1 Оборудование	25
2.2 Объекты исследования	25
2.2.1 Штаммы и плазмиды	25
2.2.2 Питательные среды	26
2.3 Амплификация последовательности гена rim M	26
2.4 Электрофорез ПЦР продуктов в 1% агарозном геле	27
2.4.1 Очистка ПЦР продуктов из геля	28
2.5 Получение конструкции гена rimM в вектор pAL2-T	28

2.6 Трансформация в клонирующем штамме <i>E. coli</i> XL10	29
2.6.1 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> XL10	29
2.7 Получение конструкции на основе pET28a со вставкой гена rim M	31
2.8 Трансформация в клонирующем штамме <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	32
2.9 ПЦР – скрининга клонов и трансформация в <i>E. coli</i> BL21(DE3)	32
2.10 Экспрессия гена rim M	33
2.10.1 Получение клеточного лизата N-RIM M	34
2.10.2 Очистка белка: аффинная хроматография (Ni-NTA-2ml)	34
2.10.3 Диск-электрофорез белка	35
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ</b>	
3.1 Схема клонирования N домена белка Rim M	40
3.2 Амплификация структурного гена rim	41
3.3 Клонирование ПЦР-фрагмента в составе pAL2-T	42
3.4 Рестрикция вставки с pAL2-T	43
3.5 Экспрессия и очистка $\sigma$ N- rim –his	47
3.6 Экспрессия полноразмерного белка RIMM	48
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	49
<b>ВЫВОД</b>	50
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	51

## ВВЕДЕНИЕ

Рибосомальный синтез белка является абсолютно необходимым процессом в жизнедеятельности любой клетки, поэтому клеткам приходится которые постоянно производить новые рибосомы для того, однако биогенез рибосом предъявляет высокие требования к метаболическим ресурсам клетки (Warner JR. *et al.*,1999). Кроме того, готовые субъединицы рибосом должны работать безукоризненно, чтобы избежать ошибок при синтезе белка. Учитывая такие жесткие требования к эффективности и качеству, неудивительно, что биогенез рибосом жестко контролируется. Самый простой рибосомальный комплекс, бактериальная 30s субъединица, содержит рибосомальную 16S рРНК размером 1540 нуклеотидов и 20 белков, при этом суммарная масса малой субъединицы рибосомы приближается к 1 MDa (Ramakrishnan V, *et al.*,2001). Понимание того, как компоненты этих крупных комплексов организовываются, по-прежнему является острой проблемой, решение которой помогло бы в понимании бактериального патогенеза, процессов старения и ряда других заболеваний (Moss T, *et al.*,1968). Первые данные о механизме сборки 30S рибосомы были получены путем выделения активных субъединиц из рРНК и белковых компонентов в экспериментах Traub and Nomura ( Traub P, *et al.*,1973). Они показали, что шесть основных белков связываются с 16S рРНК, в то время как белки вторичной структуры связываются с одним или несколькими первичными белками комплекса, и белки третичной структуры связываются через температурно-зависимые конформационные шаги (Traub P, *et al.*,1973; Held WA, *et al.*,2003). Иерархия связывания с белками приводит к кооперативной сборке, которая обеспечивает формирование каждого комплекса. Эта кооперативность в основном возникает за счет структурных изменений в 16S рРНК, вызванных постепенным увеличением количества белков (Culver GM, Williamson JR, 2003). Хотя для 30S субъединиц *in vitro* показана возможность самосборки, остается много вопросов, например, как связывание с белками приводит к фолдингу рРНК, является ли наличие некоторых интермедиатов

обязательным, и как достигается точность сборки с учетом структурной сложности рибосомы. Кроме того, при восстановлении зрелых рРНК невозможно охарактеризовать связь между структурой комплекса, транскрипцией и процессингом пре- рРНК, которые существуют в клетке и что делает сборку комплекса еще более тесно связанной (Kaczanowska M, *et al.*, 2007).

Целью настоящей работы явилось клонирование и экспрессия гена *rimM* и очистка белка RIMM для его структурного исследования.