

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

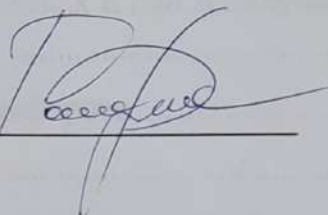
Направление: 06.03.01 – Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
Дипломная работа

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *АСОВ* В КЛЕТКАХ
*LENTILACTOBACILLUS HILGARDII***

Работа завершена:

"__" ____ 2022 г.



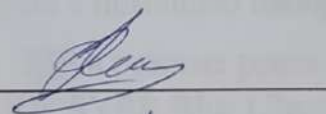
(В.А. Матигорова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

д.б.н., доцент

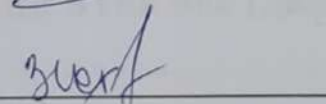
"__" ____ 20__ г.



(А.Р. Каюмов)

М.Н.С.

"__" ____ 20__ г.

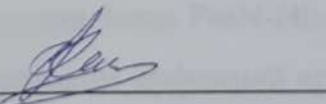


(З.И. Исхакова)

И.о. заведующего кафедрой

д.б.н., доцент

"__" ____ 20__ г.



(А.Р. Каюмов)

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 РН-подобные белки бактерий, структура, свойства, функции	7
1.2 Источники энергетического и азотного питания лактобацилл	11
1.3 Использование полиаминов бактериями	15
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	21
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1 Штаммы и плазмиды.....	23
2.2 Питательные среды и условия культивирования.....	23
2.3 Выделение плазмидной ДНК	24
2.4 Трансформация клеток <i>E. coli</i> плазмидными ДНК.....	24
2.5 Гиперпродукция белков в клетках <i>E. coli</i> и получение клеточных экстрактов.....	25
2.6 Очистка белков на Ni-NTA сефарозе	25
2.7 Диализ белков	26
2.9 Электрофорез белков в денатурирующих условиях.....	27
2.10 Окрашивание белковых гелей Coomassie brilliant blue R250.....	27
2.11 Выделение РНК из бактерий с помощью набора diaGene (Диаэм).....	27
2.12 Обратная транскрипция и ПЦР в режиме реального времени одношаговым методом qOT-ПЦР SYBR Blue (Диаэм)	28
2.13 Электрофорез ДНК.....	29
2.14 Иммуноблотинг	29
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1 Получение штамма продуцента белка PotN-His ₈	31
3.2 Очистка белка PotN-His ₈ методом аффинной хроматографии на Ni-NTA сефарозе	32
3.3 Оценка влияния доступности источников энергетического и азотного питания на экспрессию гена <i>potN</i> в клетках <i>L. hilgardii</i>	33

3.3.1 Оценка влияния доступности азота на экспрессию гена <i>potN</i> в клетках <i>L. hilgardii</i>	35
3.3.2 Оценка влияния доступности глюкозы на экспрессию гена <i>potN</i> в клетках <i>L. hilgardii</i>	36
3.4 Оценка влияния доступности источников энергии и азота на накопление белка PotN в клетках <i>L. hilgardii</i>	37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	40

- ЭНК – фермент, участвующий в синтезе нуклеиновых кислот
- АКТ – актин, белок цитоскелета
- МДП – метилдигидро-β-галактозилтрансфераза
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид
- ЦК – циклическая система
- ГДН-ИДР – гидроксиацетил-CoA-лиаза, фермент цикла трикарбоновых кислот
- ПДР – полидигидроксиацетил-CoA-лиаза
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- АССаде – ацетил-CoA-синтетаза
- ВНИ – окислительный цикл жирных кислот
- DEFC (от англ. D – дезоксирибоза, F – фермент, E – электрофорез, C – цвет) – дезоксирибозо-фермент-электрофорез
- SD – область Шейна-Джасгарова

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2-ОГ – 2-оксоглутарат

АА – акриламид

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИПТГ – изопропил-бета-галактопиранозид

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НК – нуклеиновая кислота

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ACCase – ацетил-КоА-карбоксилаза

BSh – гидролазы солей желчных кислот

DEPC (от англ. *Diethyl pyrocarbonate*) – диэтилпирокарбонат

SD – область Шайна-Дальгарно

ВВЕДЕНИЕ

Способность адаптироваться к постоянно меняющимся условиям окружающей среды является ключевой для успешного размножения и развития, а также для поддержания фундаментальных процессов жизнедеятельности живой клетки. Такие адаптации затрагивают все признаки организма от физиологии до морфологии и этиологии, касаясь в том числе изменения метаболизма путем регуляции экспрессии генов. Для поддержания оптимального роста и развития клетке необходимо строго контролировать метаболизм углерода и азота, в связи с чем организмы должны быть способны воспринимать метаболические сигналы о своем энергетическом состоянии и оценивать доступность и соотношение углерода и азота в среде.

Решающую роль в регуляции этих процессов играют РII белки, являющиеся наиболее широко распространенным семейством белков трансдукции сигналов в природе. РII белки являются основными регулирующими центрами клеточного метаболизма и управляют ключевыми этапами метаболизма азота и углерода, чтобы обеспечить сбалансированный поток метаболитов для роста клеток. Основной механизм работы этих белков заключается в восприятии сигнала за счет связывания аденилнуклеотидов и 2-оксоглутарата (2-ОГ), последующих за этим конформационных изменений и передаче полученного сигнала своим мишеням посредством белок-белковых взаимодействий [Forchhammer, 2015]. РII белки связываются с широким спектром белков клетки, среди которых можно выделить транспортеры азота, ключевые метаболические ферменты и факторы транскрипции, в связи с чем спектр выполняемых РII белками функций также очень широк.

Белок PotN, являющийся единственным РII-подобным белком в геноме *Lentilactobacillus hilgardii*, находится в составе оперона *potABCD*, кодирующего ABC-транспортер полиаминов спермидина/путресцина в клетку. Эксперименты в *Escherichia coli* продемонстрировали, что транспортер PotABCD представляет собой систему поглощения спермидина и

путресцина, предпочтительную для спермидина, в то время как путресцин транспортируется через нее с более низким сродством. Обе молекулы полиаминов могут связывать нуклеиновые кислоты и белки для стабилизации их взаимодействия, модулировать скорость транскрипции и стимулировать рост [Bontemps-Gallo *et al.*, 2018]. Расположение сигнального белка PotN в *potABCD* опероне может указывать на то, что он способен регулировать активность транспортера полиаминов в ответ на доступность энергии для клетки [Zhuravleva *et al.*, 2020].

Целью работы было оценить экспрессию гена *potN* в условиях различной доступности азотного и энергетического питания в клетках *L. hilgardii*.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Очистить белок PotN до электрофоретически гомогенного состояния для получения поликлональных антител.
- 2) Оценить влияние источников энергии и азота на экспрессию гена *potN* в клетках *L. hilgardii*.
- 3) Оценить влияние источников энергии и азота на накопление белка PotN в клетках *L. hilgardii* методом иммуноблоттинга.



СПРАВКА

Казанский (Приволжский) федеральный университет

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Матигорова В. А.
Самоцитирование
рассчитано для: Матигорова В. А.
Название работы: Экспрессия гена асоВ в клетках *Lentilactobacillus hilgardii*
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

ЗАИМСТВОВАНИЯ	3.28%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	3.28%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	95.73%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	95.73%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.99%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.99%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 02.06.2022

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 02.06.2022 17:17

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.