

Optimization of transglucosylation reactions of native yeast invertase for the fusel oils biotransformation

*Dekhkonoov D.B., Mirzarakhmetova D.T.
aspirant, cand. tech. sci*

*National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek, Tashkent, Uzbekistan
E-mail: davron-b@rambler.ru, divya_shakti@hotmail.com*

Yeast invertase is applied many fields of food technology, such as bakery, confectionery and beverage industry. It's known, invertase transformates fusel oils into alkylfructosides in organic (alcoholic) media. This property of the enzyme can be used in beverage technology for the purification of alcoholic drinks from toxic fusel oils which decrease quality of beverages, exactly cause cough and give unpleasant odor. It's important to note that toxicity of fusel oils increases by increasing molecular weight. For example isoamyl alcohol is 10 times toxic than ethanol [1].

Aim of the current study is investigation of optimal conditions of native invertase (from *Saccharomyces cerevisiae* *Rkaciteli-6 strain*) in transglucosylation reactions. During the work thin layer chromatography [2] used to define transferase activity of enzyme. Synthetic activity of invertase carried out following criteria: choice of organic solvent and its concentration, pH optimum, optimal time of incubation and optimal concentration of substrate.

As above mentioned transglucosylation reactions occur in organic media and therefore choice of organic solvent and their optimal concentration were explored at firstly. Acetonitrile and ethanol used as a solvent. Due to obtained results invertase presented its maximal transferase activity in ethanol condition. Optimal concentration of solvent performed between 10-50% (with 10% intervals) and the optimal concentration found in 30%.

pH optimum of the enzyme carried out 4,0-7,0 pH intervals containing reaction media 30% ethanol, 10% sucrose and 5% isobutyl alcohol used as the second substrate. It was defined that pH optimum of invertase observed in pH 6,0.

Determination of optimal time of incubation conducted between 1-8 hours intervals. According to achieved results invertase showed its transferase activity after 5 hours and activity attained to maximum after 6 hours.

Investigation of optimal concentration of substrate (sucrose) performed from 4 to 50 mg/ml concentration of sucrose in incubation media. It was determined that enzyme showed maximal activity in 15 mg/ml concentration of sucrose.

Due to literature reviews temperature optimum of invertase observed at 25⁰C [3]. Because of that all optimization reactions conducted at 25⁰C.

After completion of optimization reactions it was explored specificity of invertase with different alcohols. Enzyme showed transferase activity to ethanol, propanol, butanol, isobutyl alcohol and isoamyl alcohol and invertase presented high specificity to isobutyl alcohol.

This work shows that obtained native invertase possesses transferase activity and the preparation can be applied in beverage technology to purify the drinks from toxic fusel oils.

Cited literatures

1. Нефедов М.Н. Исследование летучих компонентов виноматериалов на качество коньячных спиртов. Автореф. дисс. д-ра техн. наук. 1975. с. 31
2. Опарин А.И. К вопросу энзиматического синтеза β -фруктозоды (β -алкилфруктозидов). ДАН СССР. 1953. 83. №3. с. 531-534
3. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М., Абдуразакова С.Х. Ферментативная конверсия субстратов инвертазы в водно-органической среде. Прикладная Биохимия и Микробиология. 2006. 42. №2. с. 169-174

Регуляция экспрессии провоспалительного гена COX-2 при сочетаном применении синтетических агонистов ядерных рецепторов (PPAR)

Алешин Степан Евгеньевич¹, Грабеклис Севиль Альбертовна²

¹аспирант, ²сотрудник

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики,

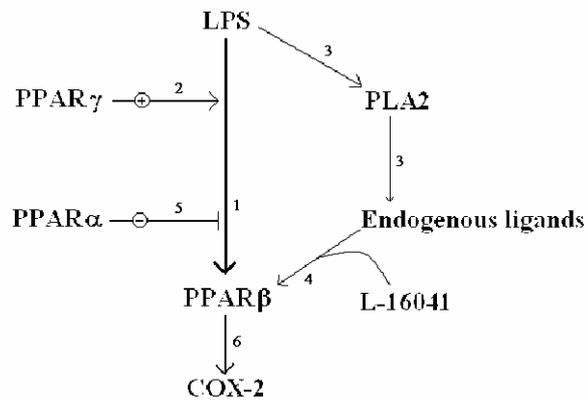
² Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: aleshins@gmail.com

Рецепторы пролифераторов пероксисом (PPAR) относятся к классу ядерных рецепторов, регулирующих транскрипцию. Известно три изоформы PPAR, обозначаемые α , β/δ и γ . Агонисты для PPAR α и PPAR γ используются для лечения дислипидемии и диабета 2 типа, а также участвуют в регуляции воспалительных процессов. Эндогенными агонистами PPAR являются полиненасыщенные жирные кислоты и их производные, появляющиеся при активации фосфолипазы A2 (ФЛА2). Взаимодействие между синтетическими и эндогенными агонистами различных изоформ PPAR малоизученно. В данной работе исследована связь между изоформами PPAR при активации транскрипции циклооксигеназы-2 (COX-2). Объект исследования - астроциты крыс, стимулированные липополисахаридом (LPS). Исследована экспрессия COX-2 и количество простагландина E2, как показателя активности данного фермента.

Полученные данные позволяют предложить следующую схему:



Стимуляция астроцитов LPS приводила к значительному (в 4 раза) увеличению экспрессии COX-2. Активация PPAR γ его агонистом росиглитазоном приводила к значительному потенцированию экспрессии COX-2 в LPS-стимулированных астроцитах. Это потенцирование снималось при ингибировании ФЛА2 (3), однако агонист PPAR β L-16041 снимал этот ингибирующий эффект, приводя к еще большей экспрессии COX-2 (4). Таким образом, для проявления потенцирующего эффекта росиглитазона необходимы синтетические, или эндогенные агонисты PPAR β . Тем не менее, сам L-16041 не оказывал никакого эффекта на уровень COX-2 в контрольных, необработанных росиглитазоном клетках. Это отличие можно объяснить довольно малым количеством PPAR β в контрольных клетках, в то время как, одновременная LPS стимуляция и обработка астроцитов росиглитазоном значительно увеличивали уровень PPAR β (1,2). Интересно, что активация PPAR α приводила к снижению уровня PPAR β , соответственно уменьшая экспрессию COX-2(5). Таким образом, мы предполагаем, что уровень COX-2 регулируется непосредственно PPAR β , а сочетанные эффекты агонистов других изоформ заключаются в регулировании доступности рецептора для лигандов, через изменение уровня его экспрессии. Исследования проводились совместно с проф. Г. Райзером (университет Отто-фон Герике г. Магдебурга, Германия).

Работа выполнена при поддержке РФФИ (07-04-01160).

Изучение возможности влияния IL-6 на дифференцировку нейтральных опухолевых клеток

¹Антонова Галина Александровна, ²Павлова Галина Валериевна,

³Копылов Алексей Михайлович

¹аспирант, ²сотрудник, к.б.н., ³сотрудник, д.х.н.

¹Факультет Биоинженерии и Биоинформатики, ³НИИ физико-химической биологии им.
А.Н. Белозерского Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия; ²Институт биологии гена Российской Академии наук, Москва, Россия

E-mail: galati@yandex.ru

Известно, что интерлейкин-6 (IL-6) относится к многофункциональным цитокинам и стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов, макрофагов, эндотелиальных клеток. Помимо этого он может выступать как фактор роста и дифференцировки В-лимфоцитов, гепатоцитов и клеток нейронального ряда.

Действие IL-6 на клетки опосредовано рецептором gp80, который расположен на внешней мембране. Сначала IL-6 связывается с gp80, затем комплекс взаимодействует с рецептором gp130. Триммер IL-6/gp80/gp130 не является функциональным. Ключевой стадией передачи сигнала является димеризация триммера, что определяет сближение цитоплазматических доменов gp130 и активацию ассоциированных с ними протеин-фосфокиназ.

В исследовании используются клеточные линии и первичные культуры клеток мыши, крысы, свиньи и человека. В связи с этим возникает необходимость сравнительного структурного анализа IL-6 и его рецепторов данных организмов.

Трёхмерная структура комплекса IL-6 с рецепторами gp80 и gp130 разрешена рентгеноструктурным анализом. Используя файл PDB 1p9m, мы аннотировали контакты IL-6 с его рецептором gp80. Для IL-6 и gp80 проведено выравнивание первичных структур в ряду мышь/крыса/свинья/человек. Кроме нейтральных замен по консервативным участкам, наиболее интересными оказались полярные замены с изменением знака заряда в зоне контакта: положительно-заряженных аминокислот на отрицательные, например, для указанного ряда организмов для IL-6: D/D/K/K и для gp80: H/Q/E/Q в одном положении. На основании аннотации мы предполагаем наличие ошибки (H) в опубликованной последовательности gp80 мыши.

Для нейтральных опухолевых клетках исследовали возможность индукции экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), который является маркерным белком астроцитов. Использовали три линии клеток – нейробластома человека IMR32, нейробластома человека BE(2)-C, глиома крысы C6, гибрид C6 и нейробластомы мыши. Экспрессию GFAP детектировали иммуноцитохимически, и с помощью Вертерн-блот-анализа.

Работа поддержана грантом РФФИ 07-04-01-034, 07-04-12120-ОФИ

Исследование внутриклеточной локализации делеционного мутанта белка Nt-4/1

Артёмов Артём Владимирович

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

E-mail: limefire@gmail.com

Белки, относящиеся к семейству 4/1-белков, обнаружены только у растений. Первый представитель этого семейства, At-4/1 *Arabidopsis thaliana*, был выявлен при скрининге библиотеки кДНК как один из белков, способных взаимодействовать с транспортным белком вируса пятнистой вялости томатов. Позднее было показано, что At-4/1 локализуется в клетках растений полярно и способен к межклеточному транспорту через плазмодесмы. С другой стороны, At-4/1 локализуется не только в клеточной стенке в районах плазмодесм, но и в популяции подвижных везикулярных структур в цитоплазме.

Для всех представителей семейства 4/1-белков показано наличие консервативного С-концевого района, который имеет высокую степень сходства с последовательностью ряда белков, называемой MADS-box. MADS-box-белки представляют собой обширное семейство транскрипционных факторов растений, многие из которых связаны с развитием цветочной меристемы и определением идентичности органов цветка.

Целью настоящей работы является изучение роли консервативной MADS-box-подобной последовательности Nt-4/1, относящегося к семейству 4/1-белков белка *Nicotiana tabacum*. Для этого был получен делеционный мутант Nt-4/1, не содержащий MADS-box-подобного мотива. Внутриклеточная локализация делеционного мутанта, слитого с зеленым флуоресцирующим белком (GFP), изучалась при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Влияние отходов белкового происхождения на микробиологическую активность различных типов почв

Аршакян Астхик Давидовна

студентка

Курский государственный университет, естественно-географический факультет, Курск, Россия

E-mail: Astkhik_star@inbox.ru

Проблема белкового загрязнения почвы по актуальности и опасности последствий такая же, как и загрязнение, тяжелыми металлами. Одним из источников белкового загрязнения являются птицеводческие фермы, которые богаты отходами из пуха и пера, имеющими белковое происхождение и состоящие в основном из кератина, белка трудно подвергающегося гидролизу. Для утилизации отходы часто просто закапывают, однако разложение их протекает очень медленно и долго, в связи с изменением pH среды в месте

захоронения, что в свою очередь влечет за собой смещение аэробно-анаэробных процессов протекающих в почве и как результат ее загрязнение. Минерализация данных отходов протекает под воздействием микроорганизмов для жизнедеятельности, которых необходимы определенные условия (рН, температура, влажность, концентрация веществ - поллютантов).

С целью выбора оптимальных условий для микробиологической деградации пуха и пера нами рассматривалась серия проб с учетом следующих параметров: почвенный состав, модуляторы кислотности, искусственно созданные и поддерживаемые условия (температура, высокая влажность, парниковый эффект), в сравнении с контрольными пробами, не загрязненными отходами белкового происхождения. Мониторинг микробиологической активности проб проводился систематический в течение 28 дней: определением протеазной активности почвы по методу Е.Н. Мишустина и И.С. Вострова, определением активности нитратредуктазы при помощи реактива Грисса, определением активности уреазы при помощи реактива Несслера, определением интенсивности выделения углекислого газа почвой как биотест на плотность её заселения микроорганизмами.

Проведённое исследование показало, что протеазная активность и интенсивность выделения углекислого газа увеличиваются с течением времени и достигают максимума в подщелоченных почвенных смесях на основе глины, находящихся в условиях парникового эффекта при температуре 33-35°C, что подтверждает факт максимума микробиологической активности при температуре ближе к 35⁰С в слабощелочной среде. При мониторинге активности ферментов было выявлено, что для почвенных смесей на основе чернозёма создание таких условий, как парниковый эффект (температура 33-35⁰С) и щелочная среда приводит к интенсификации биохимических механизмов аммонифицирующих микроорганизмов, в то время как кислая среда и повышенная влажность ведут к усилению активности нитрифицирующих микроорганизмов. Однако в подщелоченных глинистых почвенных смесях, находящихся в условиях парникового эффекта при температуре 33-35°C с повышением активности уреазы наблюдается интенсификация действия нитратредуктазы, следовательно является целесообразным поиск корреляции в динамике активности этих ферментов.

Литература

- 1.Аринушкина Е.В.(1962) Руководство по химическому анализу почв. М.
- 2.Александрова Л.Н., Найдёнова О.А. (1986) Лабораторно-практические занятия по почвоведению.Л.: Агропромиздат.
- 3.Мишустин Е.Н., Востров И.С. (1971) Аппликационные методы в почвенной микробиологии. Микробиологические и биохимические исследования почв. Киев.

Влияние фактора транскрипции CodY на экспрессию гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в рекомбинантных штаммах *B.subtilis*

Ахметова Алина Ильдусовна, Каюмов А.Р., Шарипова М.Р.
студент, м.н.с., профессор

Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова – Ленина,
биолого-почвенный факультет, г.Казань, Россия

E-mail: akhmetova1987@rambler.ru

Эффективность метаболизма бактериальной клетки определяется балансом процессов анаболизма и катаболизма. На их активацию и репрессию влияют факторы окружающей среды. У бактерий выработались механизмы, позволяющие координировать метаболизм в зависимости от доступности и разнообразия питательных веществ. В период стационарной фазы активируются различные сигнально-сенсорные системы, запускающие транскрипцию специфических генов с целью преодоления стрессовых условий. При переходе в фазу замедления роста бациллы секретируют в среду множество различных ферментов деградации, среди которых значительная доля принадлежит протеиназам. В общем пуле протеиназ, секретируемых *B.intermedius*, 10% принадлежит глутамилэндопептидазе, ферменту, осуществляющему гидролиз пептидов строго специфично по глутаминовой и аспарагиновой кислотам. Назначение данного фермента в настоящее время вызывает бурную дискуссию в научном обществе, и доминирующий механизм контроля экспрессии гена фермента остается неизвестным. Целью данной работы было установить, влияет ли фактор транскрипции CodY, регулирующий общий ответ клетки на голодание, на биосинтез глутамилэндопептидазы *B.intermedius*.

Анализ регулирующей области фермента позволил выявить потенциальный сайт взаимодействия с фактором транскрипции CodY с гомологией 75% к предполагаемой консенсусной последовательности. Этот факт позволил нам предположить участие белка CodY в регуляции экспрессии гена.

Штамм *B.subtilis*, дефектный по гену *codY*, был трансформирован плазмидой pΔ58, несущей ген фермента, которая была любезно предоставлена профессором С.В.Костровым (ИМГ РАН, Москва). Изучение динамики роста культуры и накопления фермента показало, что в рекомбинантном штамме *B.subtilis*, дефектном по белку CodY, при росте на богатой среде продуктивность глутамилэндопептидазы выше по сравнению с контрольным штаммом *B.subtilis* 168. По всей видимости, ген глутамилэндопептидазы негативно регулируется данным фактором и биосинтез фермента подавлен при росте на богатой среде.

На основании полученных данных можно сделать заключение, что биосинтез глутамилэндопептидазы *B.intermedius* вероятно находится под контролем глобального регулятора метаболизма CodY в клетках бацилл.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 08-04-00789-а.

Применение препаратов растительного происхождения для защиты растений

Безгина Юлия Александровна

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

Ставропольский государственный аграрный университет, г. Ставрополь, Россия

E-mail: unil-sgau@yandex.ru

Наряду с традиционными химическими пестицидами на современном этапе развития сельского хозяйства нашли применение препараты растительного происхождения. Их использование позволяет уменьшить количество вредных частиц, поступающих в окружающую среду; они безвредны для человека и животных, быстро разлагаются в почве, по токсичности не уступают синтетическим и не вызывают резистентности у патогенов.

Преимущество биометода заключается в избирательности его действия: поражаются лишь те вредителей, против которых он направлен. Биопрепараты безвредны для человека, животных, они в природных условиях не накапливаются. В то же время биопрепараты имеют широкий спектр действия.

В соответствии с этим актуальным является разработка технологии получения фитопрепаратов с фунгицидными свойствами, стандартизованных по составу и стабильных в хранении, а также проведение производственной апробации в технологиях возделывания зерновых культур.

На протяжении ряда лет в хозяйствах Ставропольского края ведутся опытные исследования по применению фитопрепаратов в технологиях возделывания зерновых культур. Препараты растительного происхождения используются как для предпосевной обработки семян, так и для обработки посевов в период вегетации по мере развития патогенных микроорганизмов. При этом проводится изучение комплексного действия биологически активных фитопрепаратов на рост и урожайность пшеницы и ячменя, оценка их ростостимулирующей активности, проявление фунгицидных свойств. В целом проводился расчет экономической и биоэнергетической эффективности.

На зерновых культурах нами проводятся наблюдения за действием фитопрепаратов на рост и развитие вегетирующих растений по сравнению с контролем, а также на устойчивость растений к поражению инфекционными

заболеваниями, которые развиваются на растениях в течение всего вегетационного периода.

Влияние фитопрепаратов на посевные качества зерновых культур отразилось на величинах высоты растения и длины колоса. По сравнению с контролем эти показатели были выше при обработке фитопрепаратами. Предпосевная обработка семян выявила лучшие показатели по сравнению с опрыскиванием на стадиях вегетации, что объясняется присутствием и активным развитием патогенных микроорганизмов на растениях до обработки фитопрепаратами.

Следует отметить, что применение биопрепаратов растительного происхождения также способствовало улучшению качества зерна: стекловидности, натуре, количества и качества клейковины. Проведенными исследованиями по фитоэкспертизе семян зерновых культур установлено оздоравливающее действие биофунгицидов, проявляющееся в снижении зараженности патогенной микрофлорой.

Наиболее важным является установление экономического эффекта, который заключается в окупаемости затрат на производство препаратов и проведении защитных мероприятий.

Таким образом, применение фитопрепаратов способствует стабилизации эколого-генетических основ экосистемы. Кроме того, применение фитопрепаратов обеспечивает получение экологически чистой продукции, снижение затрат на применение дорогостоящих фунгицидов.

Наноструктурированный пористый диоксид титана – матрица для иммобилизации гидрогеназы

*Бухарина Н.С.¹, Карлова М.Г.², Перменова Е.П.³, Никандров В.В.²,
Надточенко В.А.³, Саркисов О.М.³*

¹студентка

*¹Московский физико-технический институт (ГУ), факультет молекулярной и биологической физики, Долгопрудный, Россия, ²Институт Биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, Россия, ³Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, Москва, Россия
E-mail: natalie_buharina@list.ru*

С целью получения наноструктурированных носителей для иммобилизации ферментов и разработки фотобиокаталитических систем получения водорода, изучены условия иммобилизации гидрогеназы на пористых пленках, полученных из наночастиц TiO_2 , и исследовано фотообразование H_2 при сопряженном действии полупроводниковых наночастиц TiO_2 и гидрогеназы из бактерий *Thiocapsa roseopersicina*. Получены твердые пленки TiO_2 толщиной 10 мкм, содержащие до 0,2 мг фермента/см². Адсорбция гидрогеназы на плёнках описывается изотермой Ленгмюра с константой адсорбционного

равновесия $1,4 \cdot 10^{-5} \text{M}^{-1}$. Влияние рН среды на адсорбцию указывает на роль электростатического взаимодействия белка с поверхностью TiO_2 .

Гидрогеназа, сорбированная на пленках TiO_2 , проявляет каталитическую активность в реакции образования H_2 при использовании в качестве субстрата – донора электрона восстановленного метилвиологена, а также в обратной реакции окисления молекулярного водорода метилвиологеном. В реакции образования H_2 удельная активность гидрогеназы, сорбированной на пленке, уменьшается по сравнению с активностью фермента в растворе в 2-4 раза. В реакции окисления H_2 удельная активность фермента при сорбции падает на порядок. Сорбированный фермент сохраняет активность длительное время (до полугода) при хранении в аэробных условиях при комнатной температуре, а также при высушивании пленки.

При облучении пленок TiO_2 , содержащих гидрогеназу, светом с длиной волны 365 нм в водных растворах трис-(оксиметил)-аминометана, дитиотриетолола, этанола, глюкозы, глицерина в анаэробных условиях наблюдается выделение водорода, достигающее $11,5 \text{ мкл H}_2/(\text{мг фермента} \cdot \text{мин} \cdot \text{см}^2)$. Фотообразование водорода происходит в результате сопряженных реакций: фотосенсибилизированного наночастицами TiO_2 окисления донора электрона и катализируемого гидрогеназой восстановления протонов при использовании фотогенерированных в наночастицах полупроводника электронов. Удельная активность сорбированной на пленке гидрогеназы в фотореакции уменьшается по сравнению с активностью сорбированного фермента в темновой реакции в 1,5-2 раза. Скорость фотообразования водорода зависит от количества сорбированного на пленке фермента и интенсивности света.

Таким образом, наноструктурированные пористые пленки TiO_2 обеспечивают эффективную иммобилизацию гидрогеназы и обмен электронами между ферментом и полупроводниковой матрицей. Наноструктурированная пленка TiO_2 , содержащая гидрогеназу, может быть основой для создания стабильных фотокаталитических систем получения H_2 , топливных элементов и биосенсоров водорода.

Литература

1. Заявка на патент РФ № 2006134486/13 Никандров В.В., Надточенко В.А., Карлова М.Г., Саркисов О.М, «Фотобиокатализатор образования водорода, способ его приготовления и фотохимический способ получения водорода», Решение о выдаче патента от 26.09.07.
2. Заявка на патент РФ № 2006134485 Надточенко В.А., Никандров В.В., Карлова М.Г., Саркисов О.М. Семенов А.Ю., Бухарина Н.С., Перменова Е.П., Козлов Ю.Н, «Способ получения мезопористых наноструктурированных пленок диоксида титана и способ иммобилизации на них ферментов», Решение о выдаче патента от 27.10.07.

Исследование биологических свойств гуминовых кислот различного происхождения

*Быстрова Галина Игоревна, Прутенская Екатерина Анатольевна
студент, ст.преподаватель*

Тверской государственный технический университет, г.Тверь, Россия

E-mail: prutenskaya@mail.ru

Исследования в области химии гуминовых кислот ведутся на протяжении многих лет, однако вопросы, связанные с определением их биологической активностью, остаются еще не решенными. Гуминовые кислоты увеличивают степень прорастания семян и увеличивают содержание витаминов в растениях [1-4].

Известно, что гуминовые кислоты оказывают прямое физиологическое влияние на растения, микроорганизмы и животных [1,4]. Прямым эффектом от действия гуминовых кислот является то, что под влиянием их солей повышается проницаемость клеточных мембран, увеличивается активность ферментов дыхания и синтез белков и углеводов, активизируются обменные процессы, увеличивается проникновение питательных веществ (в том числе и минеральных) через поры растений, что приводит к лучшей усвояемости.

Свойства и состав гуминовых кислот зависят от химического состава растений-торфообразователей, прежде всего от содержания в них лигнина, поскольку он является главным источником ароматических фрагментов торфяных гуминовых кислот. Чем больше лигнина содержится в торфообразователях, тем больше ароматических фрагментов в составе ГК торфа. Соответственно ГК разных торфов будут различаться и по биологическим свойствам. Поэтому исследования гуминовых кислот торфов и их биологической активности, предусматривают задачу огромной фундаментальной и практической значимости.

Целью работы явилось изучение влияния гуминовых кислот различного происхождения на физиологическую активность семян льна.

Для исследования брали вытяжки гуминовых кислот, полученные 0,1 н раствором гидроксида калия из низинного торфа месторождения Лихославльского, Конаковского районов Тверской области, а также гуминовые кислоты, полученные микробиологическим путем в условиях *in vitro*. Для оценки степени биологической активности были взяты масленичные сорта льна и лен долгунец. Контролем являлись растворители, на которых приготовлены растворы гуминовых кислот 0,1 н КОН, вода.

Результаты исследований показали, что стимуляторы роста и развития семян – гуматы калия оказали положительное влияние на прохождение фаз развития семян. Было выявлено, что с увеличением концентрации гуминовых кислот в растворе увеличивается количество и скорость прорастания семян.

Литература

1. Бойко В.П., Наумова Г.В., Овчинникова Т.Ф., Жмакова Н.А., Лусина Г.И. Рахтеенко Т.С. Влияние биологически активных препаратов «Гидрогумат» и «Оксигумат» на иммунитет и обменные процессы животных // Природопользование. -1998.- вып.4 - С.82-86.
2. Goecke C., Goecke T. Medical Impacts of Peat Therapy // 10th International Peat Congress.- 1996.- Volume 2. -Stuttgart. -P. 530-533.
3. Saldan V.I. (2004) Study of Huminat on the Human RH Line Cells. 12th International Peat Congress, Tampere, Finland, 2004, Abstracts, V.2, pp. 1205-1208.
4. Simone C., Piccolo A., Marco A., Ambrosio C. Antimutagenic Activity of Homic Acids of Different Origin. //Proceedings of the 8th Meeting of the International Humic Substances Society.- Wroclaw, Poland.- 1997.- pp. 945-950

Использование лектинов бобовых для повышения урожайности культурных растений

Вершинина Зилья Рифовна

аспирант

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,

Уфа, Башкортостан, Россия

E-mail: zilyaver@mail.ru

На сегодняшний день только в России каждый год в сельском хозяйстве используется более миллиона тонн азотных удобрений. Нахождение альтернативного источника азота позволило бы существенно удешевить производство сельскохозяйственной продукции и, наконец, решить экологические проблемы, связанные с применением азотных удобрений. Интересным решением этой задачи является создание небобовых трансгенных растений, вступающих в азотфиксирующий симбиоз с ризобиями.

Одним из критических факторов на пути формирования бобово-ризобиального симбиоза являются лектины, которые обеспечивают узнавание растением-хозяином специфической для него бактерии. Эксперименты с трансгенными растениями, несущими различные гены лектинов бобовых, позволяют расширять круг микросимбионтов растения и являются важным этапом для достижения цели, которая заключается в переносе способности к азотфиксирующему симбиозу с ризобиями на небобовые растения.

В качестве объектов исследования были выбраны люцерна, облепиха и рапс. Выбор люцерны посевной обусловлен высокой клубенкообразующей активностью этого растения. Удачными в качестве модельных небобовых растений могут выступить уже фиксирующие атмосферный азот растения, делающие это в симбиозе с актиномицетами рода *Frankia*, как, например, облепиха. Таким образом, в этом случае, задача сводится лишь к замене для актиноризного растения микросимбионта. Рапс – интересная масличная культура. В ряде статей описывается образование ризобиями клубеньков, обладающих

незначительной нитрогеназной активностью, на обработанных целлюлазой и пектолиазой корневых волосках проростков рапса.

Гибридные и полноразмерные гены лектинов бобовых были клонированы в составе Т-ДНК вектора для трансформации растений pCAMBIA1305-1 под управлением 35S-промотора. Полученные конструкции были введены в клетки *Agrobacterium rhizogenes*, содержащие Ri плазмиду дикого типа, который вызывает образование опухоли, называемой «бородатым корнем», на двудольных растениях. Симбиотические реакции на обработку ризобиями на первом этапе рассматриваются на трансгенных «бородатых корнях», так как получение истинных трансгенных растений сопряжено с рядом трудностей. Как показано рядом авторов, такие трансгенные корни способны к нормальному клубенкообразованию с ризобиями.

Через 3-5 недель после введения суспензии *Agrobacterium rhizogenes* в гипокотили четырехнедельных проростков на месте ранения у 55% растений появлялся каллус, из которого начинали расти корни. Трансгенная природа корней была подтверждена активностью содержащего интрон гена β -D-глюкоуридазы, а также ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих участок гена лектина. Экспрессия чужеродных белков была подтверждена на уровне мРНК.

Затем настоящие корни удалялись и растения, состоящие из трансгенного корня и нетрансгенной надземной части пересаживались в стерильный вермикулит и обрабатывались различными микросимбионтами для исследования влияния экспрессии чужеродных белков на симбиотические реакции. Положено начало экспериментам по получению полностью трансгенных по гену лектина растений, выбранных из тех, которые дали положительные результаты в экспериментах с «бородатыми корнями».

Стимуляция биодegradации нефти плазмидосодержащими микроорганизмами рода *Pseudomonas*¹

Ветрова Анна Андреевна, Овчинникова Анастасия Алексеевна²
аспирант, магистр биологии

Пуцинский государственный университет, Пушкино, Московская область, Россия
E-mail: vetrova123@rambler.ru

В настоящее время нефть и нефтепродукты признаны главными загрязнителями биосферы. Даже при современных достижениях по охране окружающей среды загрязнение почвогрунтов нефтью в процессе ее добычи, транспортировки и хранения остается проблемой не решенной. Естественное восстановление плодородия почв и водных акваторий после воздействия на них сырой нефти растягивается на десятки лет.

Способность микроорганизмов к деградации ароматических углеводов является

предметом особого внимания исследователей, прежде всего, с точки зрения использования микроорганизмов-деструкторов для очистки загрязненной окружающей среды. Интродукция микроорганизмов – потенциальных доноров плазмид биodeградации, может интенсифицировать процессы очистки и, кроме того, повысить биodeградативный потенциал микробных популяций загрязненных сайтов путем передачи плазмид и генов биodeградации в эндогенные микроорганизмы. Горизонтальный перенос плазмид может ускорить появление новых катаболических путей, необходимых для разрушения углеводов. В загрязненных почвах сильное селективное давление благоприятствует конъюгационному переносу соответствующих плазмид. Возникновение в результате горизонтального переноса новых комбинаций плазмиды – бактерия может приводить к появлению более эффективных и конкурентоспособных штаммов-деструкторов, которые могут быть использованы для успешной биоремедиации загрязненных территорий.

Было установлено, что продуцируемые исследуемыми бактериями биоэмульгаторы связаны с клеточной стенкой. Таким образом, при росте на нефти исследуемые штаммы выделяют поверхностно-активные вещества, которые изменяют поверхностное натяжение среды и повышают биодоступность нефти.

Присутствие катаболических плазмид в ризосферных штаммах-деструкторах не только влияет на физиологические характеристики плазмидосодержащих штаммов рода *Pseudomonas* (обеспечивает большой прирост биомассы), но и увеличивает степень деградации нефти.

В результате проведенных нами модельных почвенных экспериментов установлено, что при интродукции штаммов рода *Pseudomonas*, содержащих плазмиды биodeградации, степень деструкции нефти увеличивалась в 2 – 3 раза, по сравнению с интродукцией бесплазмидных штаммов. Полученные результаты являются следствием сочетания двух факторов: наличием в плазмидосодержащих штаммах нафталин диоксигеназы, обладающей широкой субстратной специфичностью, и распространением конъюгативных плазмид в популяциях микроорганизмов. Обладающая катаболическими генами клетка-хозяин имеет очевидное преимущество перед остальными микроорганизмами, поскольку способность расщеплять поллютант выполняет роль защитного механизма и обеспечивает микроорганизм дополнительным источником углерода и энергии. Это демонстрирует перспективность использования плазмидосодержащих штаммов в экобиотехнологиях для повышения эффективности биodeградации нефти.

¹Тезисы доклада основана на материалах исследований, проведенных в рамках грантов – Международного научно-технического центра (проект МНТЦ 2366), гос. контракта Тема РНП 2.1.1.7789, CRDF RUB2-010001-PU-05, РНП 2.1.1.9290 и РФФИ 08-04-99019-р_офи.

²Авторы выражают признательность доценту, к.б.н. Филонову А.Е. за помощь в подготовке тезисов.

Модификация агробактериальной трансформации томатов

Воронцова Екатерина Викторовна, Степанова Анна Юрьевна
Студентка, научный сотрудник ИФР РАН, к.б.н.
Московский Государственный Университет Инженерной Экологии,
Москва, Россия
E-mail: evoronzova@yandex.ru

В последнее время изменение климата на планете сопровождается усиливающейся нестабильностью, выражающейся, в том числе, и в резких перепадах температуры. В связи с этим возрастает актуальность проблемы устойчивости растений к гипотермии, поскольку продуктивность многих сельскохозяйственных культур связана с формированием этого свойства. Томат занимает первое место в мире среди овощных культур по возделываемым площадям в открытом и защищенном грунте, поскольку имеет важное значение как культура для функционального и лечебного питания. Холод является одним из главных стрессорных факторов, экономически ограничивающий урожайность томатов в мире, так как оптимальная температура для роста и развития томата составляет 20-25°C, минимальная критическая температура для роста 12-14°C, максимальная - 30°C и выше, при температуре 0-1°C растения погибают. Обработка экзогенными цитокининами, используемая при предпосевном закаливании семян, является одним из способов повышения устойчивости растений к различным стресса, в том числе и к низким температурам.

Перспективным способом получения устойчивых форм для двудольных растений является агробактериальная трансформация, но, несмотря на достаточно широкое применение, в большинстве случаев необходима ее оптимизация. В нашей работе для трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens*, который содержит вектор pGV3850 с *ipt* геном (изопентениладенин трансфераза – ключевой фермент биосинтеза цитокинина) под конститутивным 35S промотором вируса мозаики цветной капусты, а также селективный маркерный ген *npt II* для селекции растительных клеток под промотором нопалинсинтетазы.

Семена сорта «Медный всадник» фирмы «Биотехника» стерилизовали коммерческим отбеливателем «Белизна», который разбавляли водой в соотношении 1/2 в

течение 10 минут. Предварительно пораненные семена томатов инкубировали в суточной агробактериальной культуре с добавлением экстракта из листьев табака в условиях вакуумной инфльтрации в течение 40 мин при -0,8 атм. Обработанные семена помещали на качалку на 24 часа, затем высаживали на твердую питательную среду, содержащую половинную норму солей по Мурасиге-Скугу, 10 г/л сахарозы, на которой их проращивали в течение 2-х дней, после чего проростки помещали на среду с антибиотиками: канамицином - 200 мг/л, и цефотаксимом – 500 мг/л, где их выдерживали не менее 10-14 дней. Использование большой дозы канамицина способствовало быстрому элиминированию чувствительных к канамицину растений. Полностью сформированные растения высаживали в почву. Из 100 семян, использованных в опыте, было получено 14 канамицинустойчивых растений. Для подтверждения встраивания чужеродного гена проводили ПЦР анализ ДНК, выделенной из листьев канамицин - устойчивых растений с праймерами к промотору 35S и к целевому гену, 8 из 14 растений показали наличие и промотора, и гена. Процент трансформации составил 8%. Как видно из приведенных данных, благодаря отсутствию в составе среды дорогостоящих компонентов, таких как гормоны, витамины, и простоте процедуры трансформации метод является недорогим и привлекательным для дальнейшего использования.

Получение полых полиэлектролитных микрокапсул на основе латексных микрочастиц, проблема их агрегации

Гужвина Д.В.^{1,2}, Шабарчина Л.И.², Сухоруков Б.И.²
Студент

- 1) *Пуцинский государственный университет, Московская обл., г. Пуцино*
- 2) *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Московская обл., г. Пуцино
E-mail: Mail.dafa@rambler.ru*

Полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК), изготавливаемые методом поочередного наслаивания противоположно заряженных полиэлектролитов на дисперсные частицы микроразмеров с последующим их разрушением, служат объектами новой, быстро развивающейся отрасли полимерной нанотехнологии. Сочетание уникальных свойств и сравнительно простая технология получения широкого спектра полиэлектролитных микрокапсул с наперед заданными параметрами (структурными, механическими, функциональными), а также возможностью управления проницаемости полиэлектролитных микрокапсул делает перспективным их дальнейшее использование.

Полученные к настоящему времени результаты демонстрируют широкие возможности использования таких капсул при разработке нового класса химических и

биохимических реакторов - известны примеры синтеза металлических структурированных наноразмерных частиц внутри такой капсулы. Создаются нового типа зонды и высокочувствительных сенсоры (создание люминофорного материала), разрабатываются оригинальные методы разделения смесей различных органических и неорганических веществ, в частности, выделения из среды ионов тяжелых металлов

Цель работы - разработка методов получения ПМК с регулируемыми параметрами (диаметр, толщина оболочки, состав и проницаемость капсулы); изучение физико-химических свойств микрокапсул для последующего применения их в качестве образцов для исследования физико-химических свойств пространственно организованных полимерных структур.

Результатом данной работы является создание полых полиэлектролитных капсул, с использованием в качестве коровой частицы латексные микросферолитов. Получены ПМК, отличающиеся между собою составом и структурой оболочки. Оболочка микрокапсул формируется из полиэлектролитной пары полиаллиламин (ПАА) и полистиролсульфонат (ПСС). Полученные микрокапсулы имеют архитектуру (ПАА/ПСС) $_n$, где n -число полиэлектролитных бислоев.

При получении полых ПМК существует проблема их агрегации, что неблагоприятно сказывается на их дальнейшем использовании. Нами рассмотрено влияние рН, растворителя, солевого состава среды, гидродинамических характеристик и заряда «коровой» частицы на этот процесса и подобраны такие условия, при которых он значительно подавляется. Путем варьирования полиэлектролитов при нанесении первого слоя разработана методика получения полых полиэлектролитных микрокапсул. Ведется поисковая работа по применению полученных ПМК, в частности, для их дальнейшего использования в качестве биохимического реактора.

Рекомбинантные вирусоподобные частицы, содержащие эпитоп M2 белка вируса гриппа, как основа новых противогриппозных вакцин

*Гумеров В.М.
студент*

Центр «Биоинженерия» Российской Академии Наук, Москва, Россия

E-mail: Netuns@gmail.com

Грипп является одним из наиболее опасных инфекционных заболеваний человека и животных. Ситуация обострилась в связи со вспышкой «птичьего» гриппа сначала в Гонконге в 1997 году, а потом и во всем мире. Современные противогриппозные вакцины создаются против двух высокоиммуногенных поверхностных белков (нейраминидазы и гемагглютинина), характеризующихся высокой изменчивостью, что определяет необходимость практически ежегодного создания вакцины против нового штамма вируса гриппа. Одним из путей создания более "универсальной" вакцины, направленной против различных штаммов вируса, является использование в качестве мишени мембранного M2 белка вируса гриппа, являющегося высококонсервативным, но представленного на поверхности вириона в небольшом количестве по сравнению с нейраминидазой и гемагглютинином. Для достижения этой цели необходимо получить M2 белок в иммуногенной форме, поскольку нативный белок слабо иммуногенен. С этой целью может быть использовано свойство биологических полимеров к самоорганизации с образованием наноконструкций с заданными свойствами. Таким удобным носителем для M2 белка, который может организовываться в высокоиммуногенные наноструктуры, содержащие на поверхности целевые пептиды, является кор-антиген вируса гепатита В (НВсАg). НВсАg может спонтанно собираться в мультисубъединичные вирусоподобные частицы размером около 30 нм, причем имеется две точки (N-конец и участок иммунодоминантной петли в районе 75-85 а.к. от N-конца), вставка в которые позволяет экспонировать чужеродный пептид на поверхности НВс-частицы.

Мы сконструировали рекомбинантные вирусоподобные частицы на основе кор-антигена вируса гепатита В, экспонирующие на своей поверхности внеклеточный домен M2 белка вируса гриппа птиц. Для этого была создана система продукции в клетках *E. coli* рекомбинантных НВс-частиц, представляющих на своей поверхности M2E (внешний домен M2 белка) пептид вируса гриппа птиц штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). Мы синтезировали химерный ген M2EНВс, кодирующий НВсАg и M2E белок на его N-конце. Этим геном в составе экспрессионного вектора pQE60 были трансформированы клетки *E. coli*. Для получения иммуногенных вирусоподобных частиц были разработаны методы выделения и очистки рекомбинантных M2Eк-НВс частиц. Образование

вирусоподобных частиц из мономеров M2Eк-НВс в процессе их самосборки в специальных условиях подтверждено с помощью электронной микроскопии. Также был сконструирован экспрессионный вектор, обеспечивающий продукцию НВс-антигена, содержащего M2E пептид из другого штамма вируса гриппа птиц, A/Duck/ Potsdam1402-6/1986 (H5N2) на N-конце, и M2E пептид штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в районе иммунодоминантной петли. Проведенные в ГУ НИИ Гриппа РАМН эксперименты на лабораторных животных показали, что M2Eк-НВс частицы являются высокоиммуногенными, а образующиеся при иммунизации антитела подавляют репродукцию вируса гриппа *in vivo* и *in vitro*.

Роль пищеварительных пептидаз *Tenebrio molitor* в гидролизе глиадинов

Даниленко Светлана Александровна, Гонтарь Ирина Александровна
студент, младший научный сотрудник

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: hikari-san@mail.ru

Основным пищевым субстратом вредителя запасов большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* являются семена злаковых культур, в частности пшеницы. Эти продукты являются важной пищей, как для людей, так и для ряда млекопитающих. Особенностью семян пшеницы является высокое содержание в них запасных белков глиадинов, в которых доля глутамина может достигать 50% , что предполагает наличие в кишечнике личинок *T. molitor* пищеварительных ферментов с высокой постглутаминрасщепляющей активностью. В нашей лаборатории было показано, что цистеиновые пептидазы способны гидролизовать пептидный субстрат *n*-нитроанилид бензилоксикарбонил-L-аланил-L-аланил-L-глутамина по карбоксильной группе глутамина.

Целью данного исследования является определение роли пищеварительных ферментов *T. molitor* в гидролизе глиадинов. Для этого мы подействовали на глиадины предварительно выделенными ферментами в условиях, соответствующих физиологическим, и инкубировали реакционную смесь при 23°C в течение 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч. Так как сериновые, в том числе химотрипсиноподобные, и цистеиновые пептидазы присутствовали в одном препарате, для определения их индивидуальной активности использовали специфические ингибиторы сериновых и цистеиновых пептидаз. Для визуализации продуктов гидролиза проводили их электрофоретическое разделение по методу Лемли. Для количественной оценки начальной скорости гидролиза глиадинов нарастание продуктов определяли по реакции с нингидрином.

Электрофоретическое исследование показало, что гидролиз в присутствии ингибиторов обоих подподклассов пептидаз практически отсутствует, сериновые пептидазы слабо гидролизуют глиадины, в то время как цистеиновые пептидазы гидролизуют их через 2 ч практически полностью. Сравнение начальных скоростей гидролиза показало, что цистеиновые протеиназы гидролизуют глиадины примерно в четыре раза быстрее, чем сериновые, что согласуется с результатами электрофореза. Было также показано, что совместное действие эндо- и экзопептидаз оказывается больше суммы действий ферментов по отдельности.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что одна из важнейших ролей цистеиновых пептидаз в спектре пищеварительных ферментов личинок *T. molitor* – эффективное переваривание белков, богатых глутамином.

Работа проводилась в рамках гранта РФФИ (№ 06-04-49147-а).

Литература

1. Terra W.R., Ferreira C., Bastos F. (1985) Phylogenetic consideration of insect digestion. Disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae, *Insect Biochem.*, 15: 443-449.
2. Terra W.R., Cristofolotti P.T. (1996) Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 113: 725–730.
3. Vinokurov K.S., Elpidina E.N., Oppert B., Prabhakar S., Zhuzhikov D.P., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A. (2006) Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 126-137.
- Vinokurov K.S., Elpidina E.N., Oppert B., Prabhakar S., Zhuzhikov D.P., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A. (2006) Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae and role in protein digestion. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 145: 138-146.

Термочувствительность полиэлектролитных микрокапсул, содержащих белки

Дубровский А.В., Шабарчина Л.И., Сухоруков Б.И.

Аспирант

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., г. Пущино

E-mail: Vattghern@rambler.ru

1998 год можно рассматривать как время зарождения новой области полимерной нано- и микротехнологии, связанной с получением, изучением и практическим использованием мультислойных полиэлектролитных нано- и микрокапсул (ПНМК). Такие капсулы изготавливаются путем поочередного наслаивания противоположно заряженных полиэлектролитов на дисперсные частицы нано- и микроразмеров, так называемые коры, с последующим разрушением и удалением этих частиц. ПНМК обладают рядом интересных свойств. Из них наиболее ярким является полупроницаемость полиэлектролитной

оболочки капсул – проницаемость для низкомолекулярных соединений и их мелких агрегатов и непроницаемость для высокомолекулярных веществ и крупных частиц.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о широких возможностях использования ПНМК в ряде областей техники, химии, физики, биотехнологии и фармакологии. Показана возможность использования ПНМК для получения пролонгированных лекарственных средств. Они в данном случае используются как контейнер для транспортировки лекарственного вещества. Скорость выхода его из капсулы определяется проницаемостью, регулируемой, например, числом полиэлектролитных слоев, изменением рН и солевого состава среды и, что особенно важно, температурой.

Цель работы – изучить термочувствительность полиэлектролитных микрокапсул, содержащих белки.

В ходе работы нами были получены полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК) с включенными в них транспортными белками крови – гемоглобином и сывороточным альбумином быка. Далее методами малоуглового светорассеяния и оптической микроскопии было изучено воздействие температуры на такие микрокапсулы.

Установлено, что как для микрокапсул с гемоглобином, так и для капсул, содержащих сывороточный альбумин, их размер при нагревании уменьшается, а сам эффект возрастает с ростом температуры и длительностью теплового воздействия. Нами предложено оценивать термочувствительность микрокапсул по величине энергии активации процесса их уменьшения, так как этот параметр является более чувствительным, чем изменение их диаметра.

Термочувствительность для ПМК с включенным в них БСА определяли в зависимости от состояния белка внутри капсул. Для этого проводили исследование при значениях рН 5, 4, 3 и 2 соответственно. Было найдено, что при понижении рН в кислую область происходит уменьшение энергии активации, причем в более кислой области (рН 3 – 4) оно выражено сильнее.

Исследование термочувствительности ПМК с включенными в них БСА и гемоглобином не выявило значительных ее отличий от изученной нами ранее термочувствительности полых капсул ни по поведению кривой светорассеяния, ни по уменьшению диаметра, ни по значениям E_a . Из данного факта можно сделать вывод, что наличие внутри капсул транспортных белков крови мало влияет на сжимаемость их оболочки.

Жирнокислотные конъюгаты олигонуклеотидов для

ДНК-маркирования живых клеток

Зайцева М. А., Борисенко Г.Г., Позмогова Г. Е.

аспирант

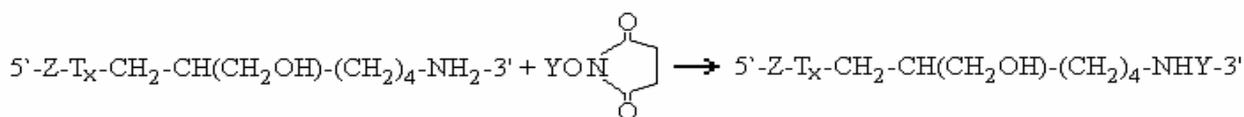
ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава, Москва, Россия

E-mail: msaitseva@gmail.com

Фиксация олигонуклеотидов на поверхности живых клеток придает им искусственную аффинность к комплементарным последовательностям ДНК, что позволяет, например, за счет гибридационных взаимодействий осуществить иммобилизацию ДНК-маркированных клеток на твердом носителе [1].

В настоящей работе предложен новый способ иммобилизации фрагментов ДНК на внешней поверхности живых клеток. Он основан на нековалентных гидрофобных взаимодействиях синтезированных нами жирнокислотных конъюгатов олигодезоксирибонуклеотидов (см. Рис.1) с липидным бислоем плазматической мембраны.

Методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии показано, что конъюгаты при внесении в бессывороточную культуральную среду эффективно удерживаются на внешней мембране клеток, не изменяя их жизнеспособности. Для завершения всех процедур по иммобилизации необходимо, в отличие от известного способа [1], не трое суток, а всего несколько минут. Предложенный метод позволяет регулировать нагрузку ДНК на клетку в широких пределах. Показано, что иммобилизованные олигонуклеотиды сохраняют природную способность к гибридизации с комплементарными полинуклеотидами. Новый метод ДНК-маркирования клеток перспективен для создания биосенсоров, разработки новых подходов в инженерии тканей, получения искусственных межклеточных ассоциатов.



$Z = H, FAM; Y = Ste, Pal; x = 18, 25$

$Z = H, \text{-флуоресцентная метка}; Y = \text{-пальмитоил, -стеароил}; x = 18, 25$

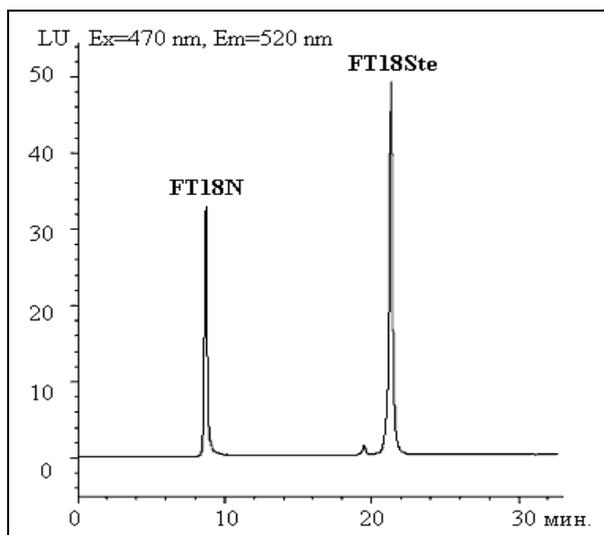


Рис. 1. Схема получения конъюгатов олигонуклеотидов с жирными кислотами и ВЭЖХ-анализ реакционной смеси конденсации флуоресцентно меченого олигомера FT18N и стеариновой кислоты (Диасорб С16, 4*250мм, градиент ацетонитрила в водном 0,1М ацетате аммония, 0,8 мл/мин, 50°C)

Литература

1. Chandra R.A. at all. //Angew Chem Int Ed Engl. 2006. V.45, №6, P.896-901.

Гидрогелевые микросферы из гиалуроновой кислоты и желатина как система доставки лекарств

Иванова Наталья Дмитриевна

Студент магистратуры

Государственный университет штата Нью-Йорк, Стони Брук, США

Факультет биомедицины и биоинженерии

Email: natalia.iva@gmail.com

Уже много лет микросферы являются популярной системой для доставки лекарств. Микросферы образуют оболочку вокруг лекарства, оберегая его от воздействия окружающей среды, а также, обладая пористой структурой и постепенно разрушаясь, обеспечивают его постоянное и длительное выделение. Представленная работа содержит результаты исследования гидрогелевых микросфер, состоящих из гиалуроновой кислоты и желатина, как системы доставки лекарств. Оба компонента биосовместимы с организмом человека и не вызывают аллергической реакции [1].

Микросферы были получены обычным О/В эмульсионным методом. Важно отметить, что формирование трехмерной структуры происходило без помощи связывающих молекул, которые при разложении микросфер часто негативно влияют на биосовместимость. В данном случае структура образовывалась в результате формирования шиффовых оснований между гиалуроновой кислотой и желатином. Снимки лиофилизированных разбухших микросфер позволяют отчетливо увидеть пористую структуру, необходимую для выделения лекарства.

Для исследования фармацевтических свойств данной системы был использован гуанидиноэтил дисульфид (ГЭД), блокирующий индуцибельную синтазу оксида азота, которая выделяется активизированными макрофагами при воспалительных процессах и

повышает концентрацию оксида азота, являющегося токсичным для тканей [2]. Важно отметить, что воспалительный процесс – необходимая часть восстановления. Однако, при определенных заболеваниях этот процесс переходит в стадию хронического, приводящего к разрушению тканей и формированию шрамов.

Метод HPLC (жидкостная хроматография под высоким давлением) показал увеличение концентрации ГЭД в аликвотах в течение недели, подтверждая его выделение при разложении микросфер. Эффективность выделяемого ГЭД была проверена на макрофагах. Наблюдения показали, что рост и развитие макрофагов сильно замедляется в присутствии микросфер, содержащих ГЭД.

Противовоспалительные свойства микросфер, содержащих ГЭД были исследованы на мышцах. Результаты гистологии показали, что в присутствии микросфер, содержащих ГЭД, процесс заживления и восстановления значительно замедляется, благодаря уменьшению количества макрофагов.

Мы полагаем, что данные микросферы, содержащие ГЭД, найдут широкое применение в медицине в случаях хронических воспалений, которые характеризуются избыточным скоплением макрофагов. Наши исследования показали, что данные микросферы минимизируют количество макрофагов и, следовательно, количество производимого оксида азота, понижая уровень воспаления до необходимого при нормальных восстановительных процессах.

Тезисы основаны на материалах исследований, проведенный в рамках гранта NIDDK (грант № DK068401).

Автор выражает признательность профессору, к. н. Вильяму Чену и к. н. Лиузэй Вэнг за помощь в подготовке тезисов.

Литература

1. Vladimir Mironov *et al.* *Biomaterials* (2005), 26/36, 7628-7635
2. W. L. Suarez-Prinzon *et al.* *J. of Autoimmunity* (2001), 16, 449-455

Взаимодействие шаперонина GroEL с двумя изоформами овечьего прионного белка VRQ и ARR

Киселёв Георгий Георгиевич

Студент 5-го курса

Факультет Биоинженерии и Биоинформатики

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: kisselev.gosha@gmail.com

В основе возникновения различных амилоидозов (прежде всего прионных заболеваний) и других «конформационных» патологий лежит агрегация белков с измененной пространственной структурой. Очевидно, что различные молекулярные шапероны, предназначенные для правильного сворачивания белков и предотвращения их агрегации, должны быть вовлечены в развитие такого рода «конформационных заболеваний». Связывание шаперонов с прионными белками может влиять на способность последних образовывать амилоидные структуры. Некоторыми авторами развиваются и экспериментально доказываются представления, согласно которым именно шапероны ответственны за переход прионных белков из нормальной конформации в патогенную [Prusiner S.B. et al. 1997]. С целью выяснения роли шаперонов в развитии заболеваний прионной природы было изучено взаимодействие шаперонина GroEL с двумя изоформами прионного белка овец VRQ и ARR.

В первой части исследования мы использовали «метод фиксированного партнера», при котором один из белков ковалентно иммобилизуется на нерастворимой матрице, а также метод дифференциальной сканирующей калориметрии. Шаперонин GroEL иммобилизовали на сефарозе 4В, активированной бромцианом, а затем инкубировали в присутствии прионов и/или денатурированной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД). Эффективность связывания определяли по убыли белков из растворимой фракции, а также с помощью анализа связавшихся белков при помощи электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. Было показано, что прионные белки конкурируют с денатурированной ГАФД за центры связывания на поверхности шаперонина GroEL, что так же подтверждается влиянием прионов на шаперонин-зависимую реактивацию ГАФД.

Во второй части, было исследовано влияние шаперонина GroEL на термоагрегацию прионных белков VRQ и ARR, а также на размер полученных агрегатов. За ходом термоагрегации наблюдали, измеряя оптическую плотность растворов прионов на длине волны 320 нм. Размер полученных агрегатов оценивали при помощи метода динамического лазерного светорассеяния. Полученные результаты показывают, что шаперонин GroEL как сам по себе, так и в присутствии кошаперонина GroES и Mg-ATP значительно усиливает агрегацию прионных белков. Шаперонин также провоцирует

дальнейшую ассоциацию уже частично агрегированных прионов, оказывая при этом значительное влияние на размер агрегатов.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли шаперонов в развитии прионных заболеваний, так как в зависимости от функционального состояния шаперонов они могут оказывать как положительное, так и отрицательное воздействие на формирование амилоидных структур.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ (№ 05-04-48955) и NATO (PDD(CP)-(CBR.NR.RIG 982779)

Автор выражает благодарность к.б.н. Налётовой И.Н. за неоценимую помощь в подготовке материалов по теме доклада.

Электронная микроскопия в нанотехнологиях производства хлебобулочных изделий с использованием продуктов переработки хмеля

*Клиндухова Юлия Олеговна; Росляков Юрий Федорович
аспирантка; доктор технических наук, профессор*

*Кубанский государственный технологический университет, Факультет инженерии,
экспертизы и компьютерного моделирования высоких технологий, г. Краснодар, Россия
E-mail: yulia14@mail.ru*

В XXI веке нанонаука и нанотехнологии являются стратегическим развитием науки и техники, что требует фундаментальной перестройки существующих технологий. Разработка и освоение производства пищевых продуктов на основе нанотехнологий позволит прогнозировать и регулировать свойства полученных объектов.

Хлебопекарная промышленность является для России стратегической отраслью, во многом определяющей уровень национальной конкурентоспособности и даже безопасности. Функционирование хлебопекарного производства имеет как экономический аспект (выражается в прибылях и убытках), так и социальный, (показатели удельного производства и потребления продукции на душу населения), от чего, в свою очередь, зависит здоровье и благосостояние нации. Именно поэтому хлебопекарная промышленность обладает безусловным приоритетом развития в большинстве стран мира.

Ключевой, нерешенной проблемой в этой области является картофельная болезнь хлеба, вызываемая спорными бактериями *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*. Пораженный хлеб теряет свой естественный вкус и аромат, мякиш становится липким, при разломе наблюдаются слизистые, тянущиеся нити. Хлеб с признаками картофельной болезни может вызвать нарушение функций желудочно-кишечного тракта, дать толчок к перерождению, мутации нормальных клеток, поэтому его уничтожают.

Цель работы – разработка технологий хлебобулочных изделий с использованием продуктов переработки хмеля и исследование формирования микро– и наноструктуры для определения механизма ингибирования микроорганизмов, вызывающих микробиологическую порчу муки и хлебобулочных изделий.

Разработаны хлебобулочные изделия с эмульсией CO₂-экстракта хмеля, гранулированным хмелем с содержанием α-кислот 3,5% («ароматный») и 15% («горький») и хмелевым шротом. Проведены комплексные исследования наноструктуры теста трансмиссионной электронной микроскопией.

По результатам исследований установлено, что внесение продуктов переработки хмеля влияет на состояние клейковины и формирование микро– и наноструктуры пшеничного теста. Изменение наноструктуры клейковины за счет внесения продуктов переработки хмеля приводит к её укреплению, а реологические свойства теста отличаются уплотнением консистенции и проявлением упругих свойств. Доказано улучшение показателей органолептики, а также торможение микробиологических и биохимических процессов порчи готовых хлебобулочных изделий.

Полученные результаты послужат теоретической базой для приготовления хлебобулочных изделий с высокими показателями качества, и позволит сократить потери хлебных ресурсов в результате довольно распространенной микробиологической порчи.

Литература

1. Смыков, И.Т. К вопросу о пищевых нанотехнологиях [Текст]/И.Т. Смыков, С.А. Гудков/ Пищевая промышленность. – 2006.- №7

2. Инструкция по предупреждению картофельной болезни хлеба [Текст] – М.: ГОСНИИХП, 1998.– 18 с.

Некодирующая РНК может подавлять экспрессию мРНК в растении

Ковров Денис Валерьевич

Студент 2-ого курса

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: KovrovDV@rambler.ru

Только 1-2% ядерной ДНК эукариот приходится на цистроны. Остальная ДНК направляет синтез некодирующих РНК, большая часть которых не попадает в цитоплазму. Возникает вопрос, что произойдет, если ядерная некодирующая РНК покинет растительное ядро, и какое она окажет влияние на экспрессию мРНК? Взяв за объект исследования *Nicotiana benthamiana*, мы поставили серию экспериментов по одновременному введению (при помощи *Agrobacterium tumefaciens*) плазмид в ядра клеток молодых листовых пластинок. Данные плазмиды направляют синтез (а) коротких некодирующих РНК (КНР) под контролем промотора РНК-полимеразы II (Пр^{Пол-II}: 35S

промотор вируса мозаики цветной капусты) или III (Pr^{Пол-III}: промотор tRNA^{Tyr}) и (б) зеленого флуоресцирующего белка (GFP, green fluorescent protein) в качестве маркера уровня экспрессии генов.

Для анализа возможной корреляции длины коротких некодирующих РНК и силы оказываемого ими эффекта была создана серия конструкций, в которых под контролем 35S промотора находились последовательности, направляющие синтез КНР длиной 8, 18, 32, 64, 128 и 256 нуклеотидов. Кроме того, был получен набор аналогичных конструкций, содержащих промотор tRNA (Pr^{Пол-III}). Соответствующие «кассеты» были перенесены в бинарный вектор pBIN19, что позволило осуществлять их доставку в клетки растения при помощи агроинъекции. Мы показали, что сила ингибирования синтеза GFP зависит от длины КНР: наибольшее негативное влияние наблюдается в случае использования КНР, длина которых находится в диапазоне 18-64 нуклеотида. Влияние КНР на экспрессию мРНК оценивалось по изменению уровня экспрессии GFP при совместной агроинъекции листьев соответствующими плазмидами. Количество GFP измерялось по его флуоресценции на 3 день после агроинъекции. Кроме того, в одной из серий экспериментов в качестве маркерного гена использовался GFP, содержащий интрон. Было произведено сравнение эффекта КНР на интронированные и неинтронированные мРНК. Оказалось, что мРНК, синтезируемые с интронированных генов, более устойчивы к негативному влиянию Pr^{Пол-II}-КНР.

Таким образом, в ходе данной работы показано, что в отличие от Pr^{Пол-III}-КНР, Pr^{Пол-II}-КНР подавляет синтез GFP. Ингибирующий эффект Pr^{Пол-II}-КНР зависит от (а) ее длины и (б) присутствия интрона в составе гена GFP.

Мы заключили, что созданная экспериментальная система может быть использована в исследовании механизмов ядерно-цитоплазматического транспорта растений.

Изучение влияния ингибиторов различного происхождения на амилазы овса

*Константинова Екатерина Юрьевна, Прутенская Екатерина Анатольевна
студент, ст. преподаватель*

Тверской государственной технической университет, г.Тверь, Россия

E-mail: Ekaterina-konsta@mail.ru

В настоящее время соединения, родственные ингибиторам ферментов нашли широкое применение в народном хозяйстве. В практической медицине ингибиторы амилаз успешно применяются в качестве препаратов для лечения заболеваний, связанных с повышенной активностью этих ферментов - диабета, кариеса, ожирения и др. В фундаментальных разработках специфические ингибиторы являются также

эффективными инструментами для изучения механизма действия ферментов, строения их активного центра.

На сегодняшний день большое внимание уделяется адаптации сельскохозяйственных растений в природе и, соответственно, их способности к выживанию для того, чтобы в конечном итоге получить хороший урожай. В процессе эволюции растения выработали защитные механизмы, которые позволяют им успешно противостоять различного рода неблагоприятным воздействиям, в том числе, вредителям и фитопатогенным микроорганизмам. В их число входят ферменты, такие как β -1,3-глюканазы, хитиназы, ингибиторы протеаз и α -амилаз, лектины, а также другие белки и пептиды, обладающие антимикробной активностью.

Изучение ингибиторов у растений приобрело в последние годы помимо большого теоретического интереса еще и важное практическое значение. Это связано, в первую очередь, с новейшими достижениями биотехнологии по созданию трансгенных растений, обладающих повышенной устойчивостью к вредителям и болезням.

Природные ингибиторы отличаются некоторыми особенностями: они действуют в чрезвычайно низких концентрациях (от 10^{-6} до 10^{-12} М), обычно являются необратимыми и т.д. В природе эти ингибиторы выполняют роль регуляторов межвидовых отношений. Так, известно, что ингибиторы амилаз из проросших зерен злаковых токсичны для насекомых и млекопитающих. Недавно ингибиторы амилаз обнаружены среди так называемых "патоген-обусловленных" белков (PR-белков), участвующих в механизме защиты растений от патогенов.

Целью данной работы является изучение свойств амилаз пророщенного зерна овса и влияния ингибиторов химического и природного происхождения на амилолитическую активность.

В процессе исследований были выбраны оптимальные условия проведения ферментативной реакции расщепления крахмала амилазами овса. Определена амилолитическая активность при различных температурах, кислотности среды и длительности проведения реакции.

Ингибирующее действие металлов на амилазы изучалось на модельных растворах. В результате экспериментов было установлено, что соли Na^+ и K^+ являются активаторами амилазы. Ингибирующее действие было выявлено у солей $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 и Cu SO_4 . По ингибирующему эффекту катионы металлов можно расположить в следующий ряд: $\text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$.

В ходе исследования также изучалось влияние солей металлов на активность амилаз в процессе прорастания зерна. Наиболее медленное прорастание наблюдалось при обработке зерен овса солями Cu SO_4 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и MgSO_4 .

Ингибиторы природного происхождения выделяли из гороха и фасоли. Определена минимальная концентрация эффектора на амилазы зерна.

Влияние митохондриально-направленных антиоксидантов на окислительный стресс и гибель клеток

*Коротецкая М.В., Мостовенко Е.В., Изюмов Д.С.
аспирант, студент, докторант*

*Научно-Исследовательский Институт Физико-Химической Биологии им.
А.Н.Белозерского, Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова
E-mail: bezhenar_masha@mail.ru*

Дыхательная цепь митохондрий является основным источником активных форм кислорода (АФК) в клетках, повышенная продукция которых может привести к развитию окислительного стресса и программированной гибели клеток (апоптозу)[1].

В наших исследованиях индукция окислительного стресса осуществлялась путем добавления в среду инкубации пероксида водорода, менадиона и параквата. В качестве объекта исследования нами были выбраны клетки карциномы человека линии HeLa и фибробласты человека.

В работе стояла задача исследовать действие антиоксидантов MitoQ, представляющего собой производное убихинона, соединенного с остатком трифенилфосфония (TRP) и его аналога SkQ, отличающегося по хиноновой группе, на окислительный стресс и гибель клеток. Нами было обнаружено, что MitoQ и SkQ эффективно подавляют продукцию АФК и гибель клеток, индуцированную H_2O_2 при длительных преинкубациях (6-8 суток) в присутствии чрезвычайно низких (20нМ) концентрациях антиоксидантов. Для исследования кинетики накопления антиоксидантов нами был использован флуоресцентный аналог SkQ, в котором TRP заменен родамином (Rh-SkQ). Нами было показано, что накопление Rh-SkQ происходило в течение 1-2 часов, независимо от концентрации. На степень накопления Rh-SkQ оказывало влияние наличие в среде ингибиторов множественной лекарственной резистентности (плюроника и веропамила), однако, на скорость выхода они влияния не оказывали. В тоже время MitoQ и SkQ при кратковременной преинкубации не защищали клетки от гибели.

В больших концентрациях до 1 мкМ MitoQ и SkQ не проявляли токсического эффекта. В присутствии пероксида водорода наблюдался токсический эффект 0,1 до 1 мкМ антиоксидантов и dTRP, что можно объяснить детергентным действием катионной, а не антиоксидантной частью данных молекул.

Таким образом, нами не было обнаружено защитного действия митохондриально-направленных антиоксидантов при кратковременных преинкубациях с MitoQ и SkQ в концентрациях 0,2-20 нМ, тогда как длительные (6-8 суток) преинкубации клеток в присутствии 20нМ MitoQ и SkQ защищали клетки от апоптоза, вызванного пероксидом водорода, менадионом и паракватом. При этом повышение концентраций антиоксидантов приводило к проявлению их токсического, прооксидантного действия. Возможно, при длительной преинкубации клеток в присутствии малых концентраций антиоксидантов происходила адаптация клеток к субтоксическому действию этих веществ, и их антиоксидантное действие проявлялось в большей степени. Нельзя исключить, также возможность индукции вторичных защитных механизмов в условиях длительного воздействия антиоксидантов.

1. Chernyak BV, Izyumov DS, Lyamzaev KG, Pashkovskaya AA, Pletjushkina OY, Antonenko YN, Sakharov DV, Wirtz KW, Skulachev VP. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1757(5-6):525-34. Epub 2006 Apr 7.

Очистка и изучение свойств дипептидилпептидазы IV из средней кишки личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*

Кулемзина Ирина Александровна, Гонтарь Ирина Александровна
Студент, младший научный сотрудник

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail:koulemzinai@mail.ru

Свойства большинства пролинспецифичных пептидаз (ПСП) подробно изучены только для млекопитающих, а их функции до сих пор не ясны. Слабо охарактеризован также комплекс пищеварительных ПСП, поэтому его изучение представляет большой интерес. Объектом наших исследований явились личинки *Tenebrio molitor* - вредителя запасов зерновых культур, и в частности, пшеницы. Главными запасными белками семян пшеницы являются богатые пролином глиадины. Поэтому поиск ПСП в пищеварительной системе личинок оказался оправданным. В нашей лаборатории в средней кишке личинок *T. molitor* была обнаружена новая ПСП, гидролизующая субстрат APpNA. Целью данной работы явилась очистка фермента, изучение его свойств и предположительная

идентификация пептидазы, так как активностью по субстрату APrNA обладают дипептидилпептидазы (ДПП) II и IV, пролилполипептидазы (ПОП), пролилэндопептидазы (ПЭП) и пролилкарбокисептидазы (ПКП).

С использованием трех стадий очистки: гель-фильтрации на сефадексе G-150, ионообменной хроматографии на колонке MonoQ (FPLC) и гидрофобной хроматографии на колонке с фенилсефарозой (FPLC), был получен высокоочищенный препарат ПСП.

Исследование субстратной специфичности препарата показало, что фермент не обладает активностью по отношению к ZAprNA (субстрат ПОП, ПЭП и ПКП) и ZPF (субстрат ПКП). Следовательно, исследуемая пептидаза является ДПП. Используя субстрат APrNA, были изучены pH-стабильность и pH-зависимость ДПП. Фермент активен при pH 5,0-10,0 с максимумом при pH 7,9, а стабилен на участке pH 5,0-7,2 при инкубации в течение 2 часов при 37°C. Ингибиторный анализ показал, что активность ДПП подавляется ингибиторами сериновых пептидаз, диизопропилфторфосфатом и фенилметилсульфонилфторидом. Ингибиторы других подподклассов пептидаз – цистеиновых, аспартильных и металлопептидаз (L-транс эпоксисукцинил-лейциламидо(4-гуанидино)бутан, пепстатин и EDTA, соответственно), не влияли на активность фермента, также как и бестатин, ингибитор аминокислотных пептидаз. Специфический ингибитор ПОП Z-Pro-rolineal, снижал активность пептидазы на 40%. HgCl₂, неспецифический ингибитор SH-зависимых ферментов, существенно снижал, а дитиотреитол повышал активность пептидазы на 10-20%. Таким образом, исследуемая пептидаза, является, по-видимому, SH-зависимой сериновой пептидазой.

Исходя из полученных свойств, можно сделать вывод, что исследуемая пептидаза является ДПП IV (КФ 3.4.14.5) – экзопептидазой, отщепляющей дипептиды X-Pro с N-конца пептидов, в которых Pro является предпоследним остатком.

Был проведён MS/MS анализ триптических пептидов выделенной и очищенной пептидазы, на основании которого было определена de novo предположительная последовательность 11 пептидов ДПП IV.

Была определена локализация ДПП IV: фермент находится в содержимом средней кишки, и, по-видимому, участвует в пищеварении, причем 60% активности локализованы в передней части средней кишки. Новый пищеварительный фермент представляет интерес для разработки лекарства против целиакии, аутоиммунного заболевания, связанного с нарушением пищеварения, вызванного неспособностью человеческих пищеварительных пептидаз полностью гидролизовать глиадины, поступающие с пищей. В настоящее время лекарства против этого наследственного заболевания не существует.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 06-04-49147-а.

Конструирование биосенсора для идентификации автоиндуктора 2-го типа на основе "кворум сенсинг" систем *Escherichia coli*

Лёушкин Евгений Владимирович
студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: leushkin@rambler.ru

«Кворум сенсингом» называют способность бактерий чувствовать плотность популяции и использовать эту информацию в регуляции активности генов. Медиатором этого процесса служит низкомолекулярное вещество – автоиндуктор. Автоиндуктор 2-го типа (АИ-2) синтезируется белком LuxS из S-рибозилгомоцистеина. На основе двухкомпонентной системы LuxPQ *Vibrio harveyi* был создан первый сенсор на АИ-2. Но эта двухкомпонентная система обнаружена только у рода *Vibrio*. Более распространена показанная на *Salmonella enterica* и *Escherichia coli* lsr-система: оперон lsrACDBFG, кодирующий белки транспорта и деградации АИ-2, и сопряженные с ним гены lsrK – киназы АИ-2 и lsrR – репрессора lsr-оперона, теряющего эту способность при связывании с открытой фосфорилированной формой АИ-2.

Для создания сенсора в *E. coli* мы использовали промотор lsr-оперона и ген-репрессор lsrR. Фрагменты ДНК, несущие только промотор, а также промотор вместе с геном lsrR были клонированы в беспромоторный вектор pDEW201 (colEI репликон: 20-50 копий) несущий lux гены *Photobacterium luminescens* в качестве репортёрных. Полученные конструкции были трансформированы в штамм *E. coli* MG1655 и изогенный ему *E. coli* MG1655 Δ luxS. Все 4 штамма были проверены на чувствительность к АИ-2. Для этого клеткам при OD=0,05 -0,1 добавляли надосадочные культуры клеток *E. coli* MG1655 при OD=1,0 (количество АИ-2 при такой плотности максимально) и ночных культур (к этому моменту весь АИ-2 уже переработан). Значимый эффект наблюдали только в клетках с мутацией по luxS и геном lsrR в векторе: двукратное увеличение люминесценции. Предполагается, что значительную роль в регуляции lsr-оперона играет эффект дозы гена lsrR. Поэтому был сконструирован биосенсор с использованием вектора pMWFlux, который отличается от pDEW201 ориджином репликации (pSC репликон: 8-12 копий). В результате в аналогичном случае (штамм *E. coli* MG1655 Δ luxS с геном lsrR в векторе) было получено увеличение люминесценции более чем в 4 раза.

Особенности хроматографического поведения олигодезоксирибонуклеотидных REAL-TIME PCR зондов

Лукьянова Т.Н., Чувилин А.Н., Позмогова Г.Е.
аспирант

ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава, Москва, Россия
E--mail: gloyat@gmail.com

На основе анализа применения метода полимеразной цепной реакции с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени (Real-Time PCR) для генодиагностики инфекционных заболеваний показано, что чувствительность и достоверность количественного определения ДНК-мишеней непосредственно зависит от способа очистки используемых олигонуклеотидных зондов.

Цели настоящей работы состояли в исследовании особенностей хроматографического поведения Real-Time PCR-зондов для поиска подходов к быстрой оптимизации их ВЭЖХ-очистки, а также в сравнении чувствительности Real-Time ПЦР-диагностикумов, содержащих зонды, очищенные предлагаемыми методами и известными ранее [1-3].

Специфика поведения Real-Time PCR зондов обусловлена, в первую очередь, самой структурой олигомеров (высоким G/C-содержание, наличием взаимокomплементарных концевых участков), их склонностью к внутри- и межмолекулярной агрегации.

Оказалось, что соотношение конформационных форм олигомера зависит от температурного режима хроматографии и зачастую различно для разбавленных и концентрированных растворов.

Флуоресцентные хроматографические профили - из-за сочетания в составе одной молекулы флуоресцентной метки и гасителя - в большинстве случаев не только малоинформативны, но и могут вводить в заблуждение относительно времени выхода целевого вещества.

В большинстве случаев найденные температурные и градиентные режимы оказались удачными для обращено-фазовых C16 и C18 колонок. В тоже время, для некоторых олигомеров, в особенности, G-богатых, нам не удалось подобрать приемлемые условия ВЭЖХ очистки только изменением температуры и крутизны градиента элюции. В этом случае эффективным оказалось использование колонок с фазой C4.

Сравнение кривых кинетики накопления продуктов амплификации в условиях ПЦР анализа свидетельствует об очевидных преимуществах предложенных приемов получения олигонуклеотидных зондов в сравнении с традиционными. Замена в диагностическом

наборе зонда, очищенного, например, электрофоретически, на высокоочищенный олигомер повышала суммарную чувствительность анализа не менее, чем на 20%.

Предложенные подходы к оптимизации способов получения зондов успешно использовались при создании и производстве новых наборов для определения широкого круга патогенов (*Bacteroides spp.*, *Chlamydia trachomatis*, *CMV*, *Epstein-Barr virus*, *Gardnerella vaginalis*, *HSV 1*, *HSV 2*, *Lactobacillus spp.*, *Mobiluncus curtissi*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*). Проведение подобных исследований особенно актуально в связи с постоянной потребностью в расширении арсенала диагностических методов с жесткими критериями надежности.

Литература

1. Tyagi S. at all. // In: Nonradioactive analysis of biomolecules, 2nd Edition. Springer Verlag, Berlin, Germany. Ed. Kessler C. 2000. P. 606-616.
 2. Tyagi S. at all. // Nat. Biotech. 2000. V.18. P.1191-1196.
- Tsourkas A., Behlke M.A., Bao G. // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. N. 23. P. 5168-5174

Исследование взаимосвязи между транспортом ядерных белков и репродукцией вирусов в растении

Макаров Александр Алексеевич
Студент 2-ого курса

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: ogion@list.ru

Ядро как клеточная органелла осуществляет многочисленные важные функции растительной клетки, среди которых контроль репродукции вирусов. Исследования в этой области важны ввиду того, что модификация ядерной функции клетки и снижение негативного влияния ядра на репродукцию вирусов является перспективным методом повышения эффективности растительных систем суперпродукции фармацевтических белков.

Данная работа посвящена созданию системы, в которой нивелирование влияния ядра на вирус вызывается дефицитом ядерных белков, обслуживающих многочисленные функции ядра. Был разработан оригинальный способ создания такого дефицита, в котором использовались белки, содержащие сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS) и, таким образом, способные конкурировать за транспорт в ядро с эндогенными ядерными белками. В качестве репортёрного был выбран красный флуоресцентный белок (monomeric Red Fluorescent Protein, mRFP), к С-концу которого была добавлена последовательность NLS протимозина альфа человека (28 а.к.). Ген

mRFP:NLS был получен помощи ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров и клонирован в бинарный вектор pBin19.

На следующем этапе работы использовали *Agrobacterium tumefaciens* для доставки генетического материала в листья *N. benthamiana* – осуществляли ко-агроинъекцию Bin-35S-mRFP:NLS совместно с реплицирующейся матрицей – вирусным вектором крВТМ:GFP. Показано, что эффективность репродукции вирусного вектора заметно возрастает, конфокальная микроскопия выявляет красное свечение ядер из-за присутствия в них mRFP:NLS и зелёные локусы, располагающиеся около ядер – вирусные «фабрики», где происходит синтез огромного количества GFP. Повышение уровня экспрессии GFP было подтверждено статистическим анализом.

Обратный результат был получен при одновременном введении в листья Bin-mRFP:NLS и плазмидой, содержащей ген зелёного флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP) под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты. Оказалось, что в этом случае уровень экспрессии и накопления GFP заметно падает.

Исходя из базовых положений, такое снижение синтеза маркерного белка при одновременной экспрессии с mRFP:NLS можно объяснить (а) конкуренцией соответствующих матриц за факторы трансляции и рибосомы, (б) снижением уровня мРНК GFP в цитоплазме за счёт подавления ядерно-цитоплазматического транспорта и (в) подавлением общего уровня транскрипции в самом ядре.

Первое объяснение представляется маловероятным в рамках созданной системы, поскольку увеличение длины матрицы mRFP за счёт добавления 84 нуклеотидов NLS может лишь уменьшить её конкурентоспособность. Гипотезы о подавлении ядерно-цитоплазматического транспорта, за счёт конкуренции mRFP:NLS с клеточными белками, или о понижении общего уровня транскрипции в ядре в присутствии чужеродного белка – в большей степени отражает природу наблюдаемых явлений.

На данном этапе был сделан вывод, что созданная экспериментальная система имеет потенциальное прикладное применение и пригодна для дальнейшего изучения взаимосвязи ядерной функции и репродукции вируса. Выяснение непосредственного характера воздействия NLS-содержащих белков на функционирования ядра в этой системе будет предметом последующих исследований.

Естественные причины программированной клеточной смерти дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

*Меер Маргарита Валерьевна, Кнорре Дмитрий Алексеевич,
Смирнова Екатерина Анатольевна, Северин Федор Федорович
студентка 5 курса*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: gr.meer@gmail.com

Программированная клеточная смерть была открыта и интенсивно исследовалась на многоклеточных животных. Недавно было обнаружено, что подобный механизм есть и у одноклеточных. Остается открытым вопрос, какова роль программы клеточного самоубийства в этом случае. Полагают, что у одноклеточных организмов подобная программа может служить для элиминации клеток, нежелательных по каким-либо признакам для популяции в целом. Однако тогда остается неясным, (I) что это за признаки (II) чем определяется критическое значение параметра, определяющего запуск механизма самоубийства, и (III) как он измеряется клеткой. Нами были проведены исследования на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, которые позволили высказать предположения на этот счет. В ходе нашей работы получены данные, свидетельствующие в пользу того, что (I) главным параметром, определяющим то, запустит ли клетка программу самоубийства, является уровень повреждения генетического материала, (II) критическое значение этого параметра определяется аппаратом кооперативной чувствительности (quorum sensing) [1] и (III) способом его измерения является контроль прохождения клеточного деления[2].

Литература

1. Chen, H., G.R.Fink. 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.* 20:1150-1161.
2. Fedor F. Severin, Margarita V. Meer, Ekaterina Smirnova, Dmitry Knorre and Vladimir P. Skulachev. 2008. Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA - Molecular Cell Research*. In press.

Биосинтез внеклеточной глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* в присутствии различных источников углерода и азота

*Митрофанова Ольга Владимировна, Мовчан О. А., Марданова А.М.
Студентка, студентка, к.б.н.*

Казанский государственный университет, Казань, Россия

E-mail: olgunhik.ru@mail.ru

В последнее время особое внимание привлекают протеиназы микроорганизмов с узкой субстратной специфичностью, способные гидролизовать пептидные связи по строго определенным аминокислотным остаткам. Среди таких протеиназ интерес вызывают

глутамилэндопептидазы, которые гидролизуют связи глутаминовой и аспарагиновой аминокислот.

Ранее было показано, что *Bacillus intermedius* 3-19 секретирует в культуральную жидкость глутамилэндопептидазу. Целью данной работы явилось исследование влияния различных источников азота и углерода на рост культуры *Bacillus intermedius* 3-19 и уровень синтеза фермента.

Было исследовано совместное влияние источников азота и углерода. В качестве единственных источников азота использовали нитрат натрия (20 мМ) и хлорид аммония (20 мМ), углерода - глюкозу (0,5%) и цитрат натрия (0,6%). Рост культуры и активность глутамилэндопептидазы на среде с наименее доступными источниками углерода и азота - нитратом натрия и цитратом натрия использовали в качестве контрольного варианта (100%). В присутствии цитрата натрия и хлорида аммония рост культуры снижался до 73% по сравнению с контролем. При внесении в среду глюкозы, независимо от источника азота, рост был максимальным и достигал 111%.

Активность глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости была максимальной при добавлении в среду хлорида аммония и цитрата натрия (159%). При росте культуры *B. intermedius* на среде с глюкозой активность фермента снижалась в различной степени в зависимости от источника азота. Так, в присутствии нитрата натрия активность снижалась до 24%, а в присутствии хлорида аммония до 67%. Снижение активности глутамилэндопептидазы в присутствии глюкозы объясняется участием механизма углеродной катаболитной репрессии в регуляции биосинтеза фермента. Степень выраженности углеродной катаболитной репрессии зависит от источника азота. В большей степени она проявляется в присутствии труднодоступного источника (NaNO_3).

Таким образом, биосинтез внеклеточной глутамилэндопептидазы *B. intermedius* регулируется не только углеродной катаболитной репрессией, но и зависит от азотного обмена клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 08-04-00789-а.

Влияние взаимодействия штаммов деструкторов на эффективность биодegradации полициклических ароматических углеводородов в ризосфере растений

*Овчинникова Анастасия Алексеевна, Ветрова Анна Андрияновна
аспирант, магистр биологии*

*Пуцинский Государственный Университет, Пуцино, Московская область, Россия
E-mail: Anastasia_777@rambler.ru*

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) представляют собой группу опасных и распространенных почвенных загрязнителей. Использование микроорганизмов, обладающих способностью к утилизации промышленных отходов, в том числе ПАУ, является наиболее эффективным и экологически чистым способом борьбы с загрязнениями почвенных и водных экосистем в процессе биоремедиации. Дegradация поллютантов существенно повышается при совместном использовании микроорганизмов-деструкторов и растений, а именно в процессе фиторемедиации. Исследования в направлении фиторемедиации проводятся во многих странах мира, однако, взаимодействие составляющих биотехнологии (микроорганизмы, растения, загрязнители) мало изучено.

Целью работы являлось изучение взаимодействия микроорганизмов-деструкторов и его влияния на эффективность биодegradации фенантрена в ризосфере растений.

Для изучения взаимодействия бактерий родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* в условиях загрязнения фенантrenom использовали модельные системы, состоящие из стерильного песка, растений (*Sinapis alba. L*) и ассоциированных с ними микроорганизмов. Фенантрен оказывал сильный токсический эффект на растения.

Ранее штаммы бактерий *Pseudomonas putida* BS3701 и *Burkholderia* sp. BS3702 были выделены с территории Московской области и описаны, как деструкторы нафталина и фенантрена. Дegradация фенантрена наиболее эффективно проходила в модельных системах, инокулированных монокультурами. А при совместной интродукции штаммов-деструкторов степень дegradации снижалась. Защитный эффект на растения наблюдался только в случае штамма *Pseudomonas putida* BS3701 и смешанной культуры. С целью объяснения явлений эффективной дegradации фенантрена с одновременным отсутствием защитного эффекта на растения в случае штамма *Burkholderia* sp. BS3702, и снижения степени дegradации фенантрена при увеличении длины побегов горчицы белой в результате интродукции смешанной культуры микроорганизмов, были изучены особенности дegradации фенантрена моно- и бинарной культурами. Было выявлено, что штамм *Burkholderia* sp. BS3702 в процессе окисления фенантрена накапливал в больших количествах 1-гидрокси-2-нафтоат (14,57 мг/л), который оказался токсичным для растений, а при совместной интродукции двух микроорганизмов в модельную систему,

токсический эффект на растения снижался за счет потребления накопленного 1-гидрокси-2-нафтоата штаммом *Pseudomonas putida* BS3701 (кооперация), как более доступного чем фенантрен источника углерода и энергии.

Таким образом, при подборе микробно-растительных ассоциаций для наиболее эффективной биодegradации ПАУ необходимо изучать и учитывать взаимодействие бактерий-деструкторов друг с другом и растениями, с целью избежать нежелательных явлений, которые могут негативно сказываться как на микробно-растительных ассоциациях, так и на самом процессе ремедиации загрязненных территорий в целом.

Тезисы доклада основана на материалах исследований, проведенных в рамках грантов – Международного научно-технического центра (проект МНТЦ 2366), гос. контракта Тема РНП 2.1.1.7789, CRDF RUB2-010001-PU-05, РНП 2.1.1.9290 и РФФИ 08-04-99019-р_офи.

Авторы выражают признательность доценту, к.б.н. Филонову А.Е. за помощь в подготовке тезисов.

Состояние ультраструктуры клеток *Saccharomyces cerevisiae*

при действии амиодарона

Ожован Сильвия Михайловна

студентка 5-го курса факультета биоинженерии и биоинформатики

Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: ojovan.silva@gmail.com

В настоящее время установлено, что дрожжи обладают программой самоубийства, схожей с апоптозом высших эукариот. Так, в частности, показано, что амиодарон (2-бутил-3-бензофуранил-4-[2-(диэтиламино)-этокси]-3,5-дийодофенилкетон гидрохлорид) индуцирует программируемую клеточную гибель дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* [1].

Нами было изучено влияние амиодарона на ультраструктуру клеток *Saccharomyces cerevisiae*. В работе был использован W303 (mat a) штамм *Saccharomyces cerevisiae*. Клетки выращивали до логарифмической фазы роста ($\sim 2 \cdot 10^6$ клеток/мл) или до стационарной фазы роста в богатой среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу (2%) или раффинозу (2%). Программируемую клеточную гибель индуцировали амиодароном в концентрации 40 мкМ. Для электронно-микроскопического исследования клетки обрабатывали по методу Янга (Yang H.) и соавт. [2]. Инкубация клеток в течение 10 мин с амиодароном вызывает значительные изменения ультраструктуры клеточных органелл. Прежде всего обращают на себя внимание удивительные изменения в ультраструктуре ядра. Помимо хорошо известного для апоптоза клеток животных явления

маргинации хроматина, мы наблюдали образование ядерной оболочкой протяженных ветвистых выростов сложной формы, заполняющих значительный объем клетки. Наряду с этим, в клетках возникают чрезвычайно крупные структурные образования, ограниченные двумя мембранами, содержащие несколько замкнутых отсеков. В отдельных отсеках можно наблюдать хорошо выраженные кристы, что позволяет предположить образование этих структур в результате слияния нескольких отдельных митохондрий.

В литературе отсутствуют данные по ультраструктурным критериям развития апоптоза для клеток дрожжей. Однако обнаруженные нами изменения ультраструктуры ядра клеток *Saccharomyces cerevisiae* соответствуют характерным изменениям ультраструктуры ядер клеток животных при апоптозе. В то же время вместо «ультраконденсации» митохондрий- характерного признака для апоптоза животных клеток- в наших экспериментальных условиях происходило набухание митохондрий, образование объемных мембранных структур. Можно предположить, что обнаруженные нами изменения ультраструктуры клеток *Saccharomyces cerevisiae* под действием амиодарона являются специфическим ответом клеток на развитие процесса апоптоза, подтверждающими наличие программ апоптоза в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.

Литература

1. Pozniakovsky A.I., Knorre D.A., Markova O.V., Hyman A.A., Skulachev V.P., and Severin F.F. (2005). Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J. Cell Biol.*, **168**, 257-269.
2. Yang H., Ren Q., and Zhang Z. (2006). Chromosome or chromatin condensation leads to meiosis or apoptosis in stationary yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells. *FEMS Yest Res.*, **6**, 1254-1263.

Разработка новой технологии приготовления питательной среды для культивирования лактозосбраживающих дрожжей

Олмоева Валентина Дашиевна
аспирант

Восточно-Сибирский государственный технологический университет, факультет сервиса, технологии и дизайна, г. Улан-Удэ, Россия
E-mail: valius@yandex.ru

Современное экологическое состояние окружающей среды постоянно ухудшается. Безусловно, это негативно влияет на здоровье населения, снижая сопротивляемость организма вирусным и бактериальным заболеваниям. Главным фактором, обуславливающим иммунитет животного организма является здоровая микрофлора как кожных покровов, так и внутренних органов. Следовательно, встаёт острая необходимость восстановления нормальной микрофлоры организма. Одним из компонентов такой микрофлоры являются лактозосбраживающие дрожжи.

С физиологической точки зрения наличие лактозосбраживающих дрожжей в продуктах – явление положительное. Дрожжи содержат большое количество витаминов (В₁, В₂, В₃, В₆, В₉, В₁₂, В₁₅, Н, С, РР, D₂), задерживают развитие многих вредных бактерий, например, протей, палочки синего гноя, гноеродного кокка, холерного вибриона [1,2]. Однако, при культивировании лактозосбраживающих микроорганизмов необходимо помнить об их высокой избирательности при выборе источника питания. Лактозосбраживающие микроорганизмы обладают высокой сахаролитической активностью и отсутствием большинства анаболических путей.

Представляет интерес использование природных минеральных вод в качестве источника минерального питания [3]. Республика Бурятия, охватывающая значительную площадь в 351,4 тыс. км.², отличается исключительным разнообразием природных богатств; к их числу относятся и широко распространённые здесь месторождения минеральных вод. В настоящее время число учтённых источников превосходит 600.

При выборе источника минеральной воды, необходимой для приготовления питательной среды учитываются следующие критерии: высокая минерализация, отсутствие токсичных элементов, негативно влияющих на метаболизм микроорганизма, географическое месторасположение (доступность) источника и его состояние (загрязнённость).

Анализ литературных источников показал, что высокой минерализацией обладают источники Плотинный (5583,4 мг/л), Травертиновый (7267,3 мг/л), Гарга (1084,6 мг/л), Енгорбойский (1037,8 мг/л), Сынинский (4496,5 мг/л), Жемчуг (1238,1 мг/л), Истокская скв (3350,9 мг/л), Аршан-Тункинская скв.28 (4100,7 мг/л).

Из них Питателевский сильно загрязнён[4].

Исследованиями выявлена толерантность клеток лактозосбраживающих дрожжей к минеральному составу воды источников Гарга, Аршан.

Литература

1. Скородумова А.М. Дрожжи молока и молочных продуктов и их производственное значение. – М.: Пищевая промышленность, 1969. –120 с.
2. Тулякова Т.В., Пасхин А.В., Седов В.Ю. Дрожжевые экстракты – безопасные источники витаминов, минеральных веществ и аминокислот // Пищевая промышленность, №6, 2004. – с.2-4.
3. Абрамов Ш.А., Котенко С.Ц., Эфендиева Д.А., Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А., Даунова С.М. Новая питательная среда для выращивания дрожжей // Прикладная биохимия и микробиология, №2, 1995. – с.232-233.
4. Ломоносов И.С. Геохимия и формирование современных гидотерм Байкальской рифтовой зоны. – Новосибирск: Наука, 1974. – 164 с.

Синтез гуминоподобных веществ в условиях *in vitro*

*Прутенская Екатерина Анатольевна¹, Воробьева Галина Ивановна²
ст.преподаватель*

*Тверской государственный технический университет, г.Тверь,Россия¹
ВНИИ «Синтез – белок»²*

E-mail: prutenskaya@mail.ru

Гуминовые балластные удобрения обладают значительной физиологической активностью, а также оказывают заметное рекультивирующее влияние на почву: улучшают структурное состояние, водно-физические свойства, способствуют росту нитрификационной способности и увеличению подвижности фосфорных соединений.

Все важнейшие гипотезы гумификации [1,2] основаны на представлении о формировании молекул гумусовых кислот путем частичной трансформации природных биомолекул или взаимодействии их структурных единиц. С этих позиций молекулы гумусовых кислот можно рассматривать как сочетание обычных или частично трансформированных биомолекул и их фрагментов.

К основным органическим веществам, являющиеся наиболее ценными источниками гумусовых веществ относят углеводы, белки, лигнины, нуклеиновые кислоты, липиды, дубильные вещества, воска, смолы. Однако участие этих соединений в гумусообразовании неодинаково. Значительно более высокий выход гуминовых кислот, особенно более устойчивой и трудногидролизуемой фракции наблюдается при гумифицировании лигнина.

Предобработка растительных материалов приводит к освобождению лигнинной компоненты и более легкому ее последующему извлечению. Свойства микроорганизмов разрушить лигнин ставит их в первый ряд перспективных делигнификаторов и может стать основой для развития новых экологически безопасных технологий. Кроме того, может широко использоваться малоценное лигноцеллюлозное сырье, что ведет к сохранению лесных ресурсов и повышению рентабельности лесного хозяйства.

Исследования направлены на изучение процесса биодеструкции лигноцеллюлозного материала с целью получения гуминоподобных веществ.

Объектом изучения являлся штамм микроорганизмов, выделенный на кафедре Биотехнологии и химии ТГТУ. В результате поисковых экспериментов были определены оптимальные условия культивирования, выделенных микроорганизмов, а также выявлен оптимально эффективный субстрат в отношении образования гуминовых кислот.

В работе изучено влияние ультразвука на лигноцеллюлозный материал. Подобраны условия проведения ультразвуковой предобработки субстрата.

С увеличением времени обработки субстрата содержание целлюлозы закономерно уменьшается. Одновременно происходит и уменьшение выхода твердого лигноцеллюлозного остатка. В отличие от целлюлозы, лигнин в условиях ультразвукового воздействия, меньше подвергается деструкции. Использование ультразвука в качестве предобработки лигноцеллюлозного сырья позволило увеличить выход гуминоподобных веществ. Исследование изменения структуры лигнина в процессе ферментации и ультразвуковой обработки контролировали с помощью ИК-Фурье спектроскопии. При интерпретации спектров было выяснено, что лигнин, полученный после ферментации, имеет наибольшее количество гидроксильных групп и наименьшее - метоксильных.

Идентификацию гуминоподобных веществ проводили также методами ИК-спектроскопии, контрольным образцом был низинный торф.

Литература

1. Туев Н.А. Микробиологические процессы гумусообразования/ Н.А. Туев. –М.: Агропромиздат.-1982.-239с.
2. Орлов Д.С. Химия почв / Д.С. Орлов. - М.: Изд-во МГУ.- 1985.- 376с.

Биоинформатические стратегии в липидомике: применение для медицинской диагностики

Руднева В.А.¹, Зезина Е.А.², Каратассо Ю.О.³, Чистяков Д.В.⁴

¹Студент, ²школьник, ³аспирант, ⁴студент

*¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет
Биоинженерии и Биоинформатики, Москва, Россия*

² Лицей №1553 «Лицей на Донской», Москва, Россия

³ Институт Биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

*⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический
факультет, Москва, Россия*

*E-mail: Rudneva-Vasilisa@yandex.ru, katerinkazzzzz@inbox.ru, karatasso@gmail.com,
Chistyakof@gmail.com*

Уровни липидов меняются при различных заболеваниях: диабет, ревматоидный артрит, заболевания ЦНС (маниакально-депрессивный психоз, шизофрения, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона), кожи и др. Поэтому детекция липидов как характеристик заболевания важна для диагностики многих заболеваний. В организме человека около 4000 липидов и 2000 белков, связанных с их метаболизмом. Существуют методы, позволяющие с достаточной точностью измерять концентрации отдельных липидов, однако метаболизм липидов – это совокупность взаимопереплетающихся и взаимодополняющихся биохимических путей, которые меняются при патологиях по большому количеству параметров. Нами предлагается использовать для диагностики новый метод – сравнение «паттернов» выбрасываемых клетками веществ липидной

природы, без определения структуры отдельных липидов. Метод основан на разрабатываемых биоинформатических стратегиях в липидомике [1] и предложенным в нашей лаборатории методом детекции липидов с использованием масс-спектрометрии (ESI-MS с прямым вводом без предварительного хроматографического разделения компонентов) [2]. Цель данной работы - исследовать возможность разграничения нормальных и патологических состояний клетки по «спектру» выбрасываемых липидов. Исследования проводили на линии клеток человека U937, которые обрабатывались липополисахаридом (ЛПС) для имитации воспалительного процесса. Через 24 часа стимуляции ЛПС, отбирали среду культивирования клеток, липиды экстрагировали этилацетатом и высушивали. Далее пробы анализировались методом ESI/MS с прямым вводом по разработанной ранее методике. Проведено сравнение 6 контрольных проб и 6 проб, выделенных из клеток, обработанных ЛПС. Из базы LIPIDMAPs были выбраны теоретически возможные липиды и определен диапазон их анализа (в интервале от 100 до 1000 m/z). Сравнение проводили в отрицательной и положительной моде. Каждый вкол пробы дает набор данных из 9000 значений. Каждую пробу анализировали 3 раза при различных разведениях. В полученном суммарном массиве данных выявляли достоверно различающиеся значения. Проведенный анализ показал, что между «MS-спектрами» воспаленных и невоспаленных клеток существуют достоверные различия, значительно превышающие различия между отдельными контрольными пробами. Таким образом, предложенный подход может быть применен для медицинской диагностики заболеваний и патологических состояний, связанных с нарушением липидного метаболизма. Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 07-04-01160).

[1] Laxman Yetukuri, Mikko Katajamaa, Gema Medina-Gomez, Tuulikki Seppänen-Laakso, Antonio Vidal-Puig, and Matej Orešič. Bioinformatics strategies for lipidomics analysis: characterization of obesity related hepatic steatosis, *BMC Syst Biol.*, 2007, Feb 15;1:12.

[2] Каратаско, Ю.О., С.Е. Алёшин, Н.В. Попова, В.В. Чистяков, М.Г. Сергеева, С.Д. Варфоломеев. Количественный анализ простагландинов и полиненасыщенных жирных кислот методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. *Масс-спектрометрия*, 2007, 4(3): 173-178.

Картирование участка белка протимозина альфа, ответственного за активацию экспрессии генов, регулируемых опухолевым супрессором p53

*Соколов Виктор Владимирович, Рудько Владимир Владимирович
студент, студент*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: phoenix@mprotein.ru, vovka-chem@bk.ru

Протимозин α (ПроТа) человека – это небольшой, очень кислый, мультикопийный ядерный белок. Он является предшественником иммуномодулирующего пептида тимозина $\alpha 1$, состоящего из 28 N-концевых аминокислотных остатков ПроТа. В центральной области ПроТа расположен «кислый» домен - участок, состоящий в основном из отрицательно заряженных аминокислот. На его C-конце расположен двухчастный сигнал ядерной локализации, ответственный за транслокацию белка в клеточное ядро.

Оказалось, что даже такой относительно простой белок является многофункциональным, способным участвовать в самых разнообразных процессах жизни и смерти клеток. ПроТа обладает свойствами онкобелка, стимулирует клеточную пролиферацию, защищает клетки от апоптоза. В нашей лаборатории было обнаружено, что суперэкспрессия ПроТа в клетках линии HeLa приводит к повышению внутриклеточного уровня опухолевого супрессора p53 и стимуляции экспрессии p53-зависимых генов.

Цель данной работы - картирование участка в последовательности ПроТа, ответственного за стимуляцию экспрессии p53-зависимых генов, с помощью делеционного мутагенеза. Был сконструирован набор плазмид для экспрессии в клетках человека делеционных мутантов ПроТа с делециями в N-концевой и центральной области этого белка. Исследовали влияние сверхпродукции этих мутантов на эффективность экспрессии репортерного гена люциферазы светлячков под контролем p53-регулируемого промотора.

Оказалось, что делеции аминокислотных остатков 1-31, 34-43 и 44-51 в N-концевой части ПроТа не снижают способности этого белка активировать p53. Делеция части «кислого» домена, $\Delta(53-67)$, приводила к значительному снижению этой активности, а удаление всего центрального домена, $\Delta(32-81)$, - к полному исчезновению способности ПроТа стимулировать p53-зависимую экспрессию генов.

Из полученных данных следует, что обогащенная дикарбоновыми аминокислотами центральная часть протимозина α отвечает за стимуляцию p53-зависимой транскрипции. Этот вывод подтвержден тем, что свойством активировать p53 обладал в наших опытах и другой белок, содержащий протяженные блоки дикарбоновых аминокислот, - паратимозин.

Центральная «кислая» область ПроТ□ ответственна за взаимодействие с гистонами и гистоновыми ацетилтрансферазами. Следовательно, механизм активации р53, по-видимому, связан с рекрутированием ацетилтрансферазной активности к соответствующим промоторам, приводящей к ацетилированию гистонов и деконденсации хроматина.

**Секвенирование и анализ 6 кб фрагмента геномной ДНК *Bacillus intermedius*,
содержащего ген протеазы**

*Сабирова Альбина Рушиановна, Рудакова Наталья Леонидовна,
Каюмов Айрат Рашитович, Шарипова Маргарита Рашидовна*
аспирант; аспирант; м.н.с.; д.б.н., профессор
Казанский Государственный Университет им. Ульянова-Ленина,
Биолого-почвенный факультет, Казань, Россия
E-mail: albina-12@mail.ru

Появление новых методов в молекулярной биотехнологии открыло возможность для изучения первичной структуры генов и проведения их сравнительного анализа. Метод секвенирования произвел настоящую революцию в решении биотехнологических задач. Информация о последовательностях геномов различных бацилл, в том числе *B.subtilis*, *B.cereus*, *B.licheniformis*, позволяет провести геноинформационный анализ по идентификации прокариотических генов и их окружения. Изучение регуляции экспрессии генов бациллярных протеиназ позволит выяснить их физиологическую роль в клетках бацилл и связь с различными этапами физиологического роста этих бактерий. Целью работы явилось опеределение нуклеотидной последовательности фрагмента геномной ДНК *B.intermedius* и проведение ее геноинформационного анализа.

В лаборатории проф. Кострова (Москва, ИМГ РАН) было проведено клонирование геномной библиотеки *B.intermedius* 3-19 в экспрессионный вектор pCB22, правая часть которого от сайта рестрикции *Pst*I до *Kpn*I представляет собой фрагмент плазмиды pUC19 с геном устойчивости к ампициллину (ApR), остатками от экспрессионной системы лактозного оперона и полилинкера. Вторая половина этой плазмиды обеспечивает репликацию в клетках *B.subtilis*, содержит экспрессинную единицу EU19035, ген устойчивости к эритромицину (EmR), благодаря чему может использоваться, как вектор экспрессии. В результате трансформации безпротеазных штаммов *B.subtilis*, были отобраны и получены клоны, образующие зоны гидролиза на молочном агаре. В ходе скрининга был отобран клон с экзопротеолитической активностью, которая не подавлялась PMSF (специфическим ингибитором сериновых протеаз) и ингибировалась ЭДТА и о-фенантролином. Эти результаты позволили предположить, что вставка ДНК,

клонированная в pCB22, содержит ген, кодирующий фермент, относящийся к классу металлопротеиназ.

Была выделена плазмидная ДНК pCM4 и с помощью праймеров, фланкирующих вставку геномной ДНК в плазмиде был получен амплификат, служивший матрицей для секвенирования. Для определения нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента хромосомной ДНК *B.intermedius* использовали метод праймерной прогулки. Полученные перекрывающиеся сиквенсы обеспечили корректное построение контига.

Поиск открытых рамок считывания с помощью программы ORF Finder (Open Reading Frame) идентифицировал четыре открытые рамки считывания. Первые две рамки считывания перекрываются на протяжении 56 нуклеотидов и кодируют металлозависимую фосфогидролазу, относящуюся к HD-суперсемейству фосфогидролаз. Третья рамка считывания гена *uwhC* включает 167 аминокислотных остатков и кодирует металлопротеиназу. Были обнаружены следующие структурно-функциональные домены этого белка: SpoIVFB и Peptidase_M50. Данный фермент является Zn-зависимым, относится к семейству белков M50 и в его структуре присутствует консервативный домен HEXXH. Программный анализ выявил 92% – гомологию последовательности этого гена со структурой белка *B. pumilus*, 82% - с *B.subtilis*, 81% - с *B.licheniformis*. Четвертая ОРС кодирует пенициллин-связывающий белок размером в 254 а.к.о.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований 05–04–48182-а.

Новые генноинженерные технологии для эффективной экспрессии целевых белков в растениях с помощью вирусных векторов

Соколова А.Г.¹, Иванов П.А.²

¹ студент, ² к.б.н., в.н.с.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: sokolova.anna@inbox.ru

Растительные экспрессионные системы имеют ряд преимуществ по сравнению с культурами клеток микроорганизмов и животных: при работе с ними не требуется соблюдение стерильности, отсутствует риск загрязнения продукта патогенами бактериального и животного происхождения, полученный белок имеет низкую стоимость. Классической системой для экспрессии целевых белков в растениях является стабильная генетическая трансформация, альтернативой может служить «временная» экспрессия, в том числе с использованием векторов на основе (+)РНК-содержащих вирусов растений. Генноинженерные манипуляции с небольшим вирусным геномом сравнительно просты,

инокуляция листьев модифицированным вирусом - несложный и быстрый процесс по сравнению с получением трансгенных растений. Вирусная экспрессионная система, в которой мРНК целевого гена сильно амплифицирована благодаря репликации генома и синтезу субгеномной РНК, может продуцировать значительные количества белка в листьях и других тканях - до 5 г на 1 кг сырого материала. Для эффективного синтеза целевого белка вирусный вектор должен содержать определённый набор cis-действующих элементов, которые определяют средство к репликазе и облегчают транскрипцию и трансляцию, обеспечивая максимальный уровень экспрессии чужеродных генов. Существующие вирусные векторы построены в основном эмпирическим путём. В данной работе мы анализировали влияние трёх cis-элементов на экспрессию целевого гена. В качестве модельного объекта был выбран ген G-CSF (гранулоцит колониестимулирующий фактор роста человека). Было создано 8 вирусных векторов, содержащих все три элемента в различных сочетаниях.

Для трансфекции кДНК вирусного вектора в растительную клетку использовали метод агроинfiltrации листьев с последующей транскрипцией Т-ДНК в ядре. Известно, что цикл репликации (+)-РНК-содержащих вирусов растений происходит в цитоплазме. Для подавления сплайсинга криптоических интронов в ядре в последовательность гена G-CSF был введён синтетический интрон, при этом выход целевого белка (ЦБ) повысился в несколько раз по сравнению с исходной конструкцией. Ранее было показано, что часть субгеномного промотера вирусного белка оболочки (БО) располагается в начале кодирующей области БО, поэтому использование полной последовательности промотера повышает выход субгеномной РНК (сгРНК) целевого гена. В данной работе впервые продемонстрировано влияние контекста стартового кодона БО на трансляцию целевого белка. Были созданы конструкции, в которых первые 25 аминокислотных остатков БО образовывали слитный с G-CSF белок, что также привело к увеличению экспрессии G-CSF в несколько раз. Можно предположить, что важное значение для эффективной трансляции ЦБ также играет длина 5' нетранслируемой области соответствующей сгРНК, и в случае трансляции слитного белка 25АК-БО/ЦБ имитируются природные условия. Доказано, что интрон и 5' концевая часть гена БО способны усиливать экспрессию ЦБ независимо друг от друга. Если в конструкции присутствуют оба элемента, то положительный эффект складывается и суммарное превышение над контрольной конструкцией составляет 4-5 раз. Кроме того, мы показали, что наличие С-концевого участка из шести гистидинов (6×His) не влияет на экспрессию целевого белка, который можно легко очистить обычным методом на Ni-NTA агарозе.

Различия в стабильности пенициллинацилаз из *Kluyvera citrophila* и *Escherichia coli* объясняются различной ориентацией Arg β 291

Суплатов Дмитрий Андреевич, Пуляхина Ирина Викторовна
аспирант студент

Факультет Биоинженерии и Биоинформатики,

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Email: genesup@belozersky.msu.ru

Семейство пенициллинацилаз (РА) объединяет ферменты промышленного значения, которые используются для получения ключевых соединений синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов — т.н. ядер бета-лактамных антибиотиков. Изученные на настоящий момент бактериальные РА значительно различаются как по стабильности, так и по каталитической активности. Правильное понимание молекулярных механизмов регулирования активности и стабильности этих ферментов необходимо для оптимизации их применения в широком спектре биотехнологических процессов. Несмотря на большое количество исследований в этом направлении, систематический подход к получению более стабильных и активных препаратов РА на настоящий момент отсутствует. Проведено кинетическое исследование каталитической активности и стабильности РА из *Kluyvera citrophila* (КсРА) в широком интервале рН и температуры. Фермент чрезвычайно стабилен и проявляет высокую каталитическую активность при физиологических значениях рН 7-8, однако быстро инактивируется в кислых и щелочных средах и при температуре выше 60⁰С. Поскольку рН и температурная инактивация ферментов семейства РА не связана с ковалентной модификацией белковой молекулы [1], анализ рН-зависимости эффективной константы инактивации КсРА позволяет предположить ключевую роль трех ионных взаимодействий в стабилизации структуры. Разрушение солевых мостиков в результате протонирования или депротонирования аминокислотных остатков, образующих ионные пары, обуславливает инактивацию за счет образования менее стабильных “кислотных” (EH₃²⁺, EH₂⁺) и “щелочной” (E⁻) форм фермента. Несмотря на высокий уровень сходства по первичной структуре (80%) между КсРА и РА из *Escherichia coli* (ЕсРА), было показано, что последний значительно менее стабилен в кислой среде. С помощью программы для моделирования по гомологии Modeller и пакета программ для проведения молекулярной динамики Gromacs была построена третичная структура КсРА. Сравнение полученной модели с рентгеновской структурой ЕсРА позволило определить сходства и различия в сети ионных взаимодействий этих ферментов. С помощью программы PSI-BLAST и алгоритма выравнивания белковых последовательностей T-COFFEE была получена избыточная выборка гомологов КсРА и построено выравнивание. Было показано, что взаимодействие в КсРА между Glu β 265 и

Arg β 295 присутствует и в EcPA, а указанные аминокислоты консервативны в полученном выравнивании. В то же время, за счет вставки одной аминокислоты в первичной последовательности KcPA, Arg β 291 оказывается сдвинут в третичной структуре KcPA по сравнению с EcPA, в результате чего попадает в более выгодное окружение. Было показано, что в течение 30 нс возможно взаимодействие Arg β 291 с Glu β 327, Asp β 325 и Glu β 265. Учитывая то, что случай с Arg β 291 представляет собой единственное значимое различие в сети ионных взаимодействий KcPA и EcPA и все упомянутые ионные пары — единственные, расположенные в непосредственной близости от активного центра, мы предполагаем важнейшую роль этих взаимодействий в поддержании стабильной конформации в KcPA, а пары Arg β 295-Glu β 265 - во всем семействе.

Авторы выражают признательность своим научным руководителям, к.х.н. Д.Гуранда и д.х.н. проф. В.Швядасу, за помощь в подготовке тезисов.

[1] D.T. Guranda, T.A. Scherbakova, D.A.Suplatov, A.V.Sidorova, V.K.Švedas. High pH and thermostability of PA from *Alcaligenes faecalis* in neutral, alkaline and acidic media is due to strongest arginine-aspartate salt bridges. Данные не опубликованы.

Самосборка ассоциатов наночастиц никеля с олигодезоксирибонуклеотидами и гистидинилированными белками

Татарина О. Н., Смирнов И. П., Позмогова Г. Е.
аспирант

ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава, Москва, Россия
E-mail: o.tatarinova@gmail.com

Преимущества наночастиц никеля в сравнении с другими наноразмерными частицами при формировании многофункциональных высокоорганизованных биополимерных структур связаны, помимо электропроводных и магнитных характеристик металлического Ni, с его уникальной способностью удерживать биополимеры за счет электростатических и координационных взаимодействий [1-4]. Известно, что наночастицы никеля способны избирательно связывать гистидинилированные (His-tagged) белки, что стало основой технологии эффективного выделения последних из биомассы. Важно отметить, что сорбция белков носила обратимый характер, а очищенные полипептиды, например, GFP (зеленый флуоресцирующий белок) и цитохром P450 из *Mycobacterium tuberculosis* не теряли своих биологических свойств [4].

В настоящей работе продемонстрированы принципиальная возможность и перспективность использования наночастиц никеля для формирования многофункциональных биополимерных структур. Показана способность агрегатов

наночастиц никеля ассоциироваться с фрагментами однонитевых ДНК (ssДНК) с образованием стабильных комплексов. Исследовано влияние на строение и свойства образовавшихся комплексов длины олигомеров, нуклеотидного состава, природы межнуклеотидных связей, а также условий формирования ассоциатов. На примере двух рекомбинантных гистидинилированных белков (белка зеленой флуоресценции, GFP и рецептор-связывающего домена альфафетопротеина, 3D) исследовано образование протеин-никелевых ассоциатов. Получены изотермы адсорбции белков наночастицами никеля. Методом MALDI TOF масс-спектрометрии показано, что в составе комплексов молекулы биополимеров не деградированы. Экспериментами по гибридизации Ni-олигонуклеотидных комплексов и из сравнения параметров связывания иммобилизованного белка GFP с известными аптамерами и случайными последовательностями мы подтвердили, что в составе ассоциатов с наночастицами никеля биополимеры могут частично или полностью сохранять функциональные свойства. Приведенные данные могут служить основой для успешного использования наночастиц Ni, например, в системах селекции аффинных к белкам аптамеров.

Полученные результаты вносят вклад в создание новых биополимер-никелевых наноструктур - исследовательских и диагностических инструментов в области молекулярной нанoeлектроники, биологии и медицины.

Литература

1. Janknecht R., de Martynoff G., Lou J., Hipskind R.A., Nordheim A., Stunnenberg H.G. 1991. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88. 8972-8976.
2. Schmitt J., Hess H., Stunnenberg H.G. 1993. Affinity purification of histidinetagged proteins. *Mol Biol Rep.* 18. 223-230.
3. Vecerril H.A., Ludtke P., Willardson B.M., Woolley A.T. 2006. DNA-templated nickel nanostructures and protein assemblies. *Langmuir.* 22. 10140-10144.
4. Лазарев В.Н., Филатова Е.В., Левицкий С.А., Николаев Е.Н., Лейпунский И.О., Жигач А.Н., Кусков М.Л., Говорун В.М. 2007. Разработка метода очистки рекомбинантных белков с использованием наночастиц никеля. *Российские нанотехнологии.* 2. 131-138.

Тест-система для количественной оценки «силы» бактериальных промоторов

*Федоров Павел Евгеньевич*¹, *Королева Ольга Николаевна*², *Друца Валерий Львович*³
¹студент, ²старший научный сотрудник, к.х.н., ³ведущий научный сотрудник, к.х.н.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

факультет ¹Биоинженерии и биоинформатики, ²Химический факультет,

³НИИ ФХБ им.А.Н.Белозерского, Москва, Россия

E-mail: ¹pavel.fedorov@gmail.com, ²koroleva@genebee.msu.su, ³druca@genebee.msu.su

Транскрипция – синтез РНК на матрице ДНК – является важнейшим клеточным процессом, который включает несколько стадий: узнавание РНК-полимеразой особого сигнала – промотора; образование открытого промоторного комплекса; собственно инициация синтеза мРНК; элонгация и терминация. Количество синтезируемой РНК в бактериях регулируется преимущественно на уровне взаимодействия фермента с промотором, что в значительной мере определяется структурой последнего. Сравнительный анализ более 500 последовательностей промоторов, узнаваемых РНК-полимеразой *E.coli* (наиболее изученный фермент этого класса), позволил выявить два участка структурной гомологии в области -10-го и -35-го нуклеотидов, T¹A² T³A⁴A⁵T⁶g⁷ и T¹T²G³A⁴C⁵A⁶ (индекс справа вверху - принятая нумерация звеньев в пределах консенсуса), соответственно [1]. Любопытно, что ни в одном из природных сигналов инициации транскрипции полного соответствия в упомянутых областях указанным консенсусным последовательностям не обнаружено. До сих пор нет надежной количественной оценки значимости каждой из нуклеотидных пар в ключевых позициях консенсусных элементов -10-ой и 35-ой областей для эффективного функционирования промотора.

В настоящей работе впервые предложена и опробована удобная тест-система количественной оценки относительной силы промоторов, сконструированная на базе плазмидного вектора, содержащего два дивергентно направленных терминатора *loop*. Возможность встраивания двух промоторов (например, природной структуры и модифицированного) навстречу друг другу в межтерминаторной области, а также наличие в тест-векторе «независимого» промотора «RNA1» (внутренний стандарт) позволяет в этой тест-системе достаточно точно определять «силу» (активность) сигналов инициации транскрипции друг относительно друга.

Для количественной оценки влияния замен наиболее консервативных нуклеотидных пар в составе -10-го и -35-го районов сконструирован набор мутантных промоторов с заменами в позициях 1, 2 и 3 гексануклеотида -35-ой области и в позициях 1, 2, 6 и 7 гептануклеотида -10-ой области. Полученные мутантные промоторы были встроены в

тест-вектор «навстречу» консенсусному («обобщенному») промотору и исследованы в системе транскрипции *in vitro*.

Литература

Shultzaberger, R. K., Chen, Z., Lewis, K.A., Schneider, T.D. (2007) Anatomy of Escherichia coli *s70* promoters // Nucl.Acids Res., v. 35, No. 3, p. 771–788.

Экспрессия генов сериновых протеиназ *B. intermedius* в клетках *B. subtilis*, дефектных по белкам CodY и TngA

Федорова Ксения Павловна, Каюмов А.Р., Шарипова М.Р.

Студентка, м.н.с., профессор

Казанский государственный университет, Казань, Россия

E-mail: ksunchik-@mail.ru

Микроорганизмы способны формировать адаптивный ответ на воздействия внешней среды, который приводит к активации различных регуляторных систем, контролирующей экспрессию генов различных внутриклеточных и секретируемых белков. Одним из результатов является синтез и секреция внеклеточных ферментов, в том числе протеиназ. Так, недостаток азота приводит к активации образования ферментов ассимиляции азотсодержащих соединений. Ранее установлено, что, в присутствии ионов NH₄, уровень биосинтеза протеиназы ArgVi значительно ниже по сравнению со средой, где источником азота служит нитрат. Это позволяет предположить, что контроль биосинтеза протеиназы ArgVi осуществляется со стороны системы регуляции азотного обмена клетки. Задачей данного исследования явилось выяснить, влияет ли система регуляции азотного обмена на синтез внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы ArgVi из *B.intermedius*, секретируемой рекомбинантными штаммами *B.subtilis*, несущих плазмиды pCS9 и pVL1 с геном *aprVi*. Клоны гена субтилизиноподобной протеиназы предоставлены для работы С.В. Костровым (ИМГ РАН, Москва).

Регуляция азотного обмена у бактерий осуществляется благодаря факторам транскрипции TngA и CodY, которые контролируют экспрессию многих генов и оперонов. При анализе регуляторной области гена *aprVi* были идентифицированы потенциальные сайты взаимодействия с белком CodY с гомологией 75%. Сайтов взаимодействия с белком TngA обнаружено не было. Профессором А. Sonenshein был предоставлен штамм, дефектный по белку CodY, который был трансформирован плазмидой pCS9 с геном протеиназы ArgVi. Штамм, дефектный по белку TngA, был протрансформирован плазмидой pVL1. Исследовалась динамика накопления фермента ArgVi контрольным штаммом *B.subtilis* 168 и штаммами дефектными по белкам CodY и TngA. Установлено, что в рекомбинантном штамме *B.subtilis*, мутантном по белку CodY, при росте на богатой среде (LB), продуктивность субтилизиноподобной протеиназы снижалась в 2 раза, по

сравнению с контрольным штаммом. Уровень же экспрессии генов в штамме дефектном по белку TnrA не отличался от контрольного. На основании полученных данных можно сделать заключение, что биосинтез субтилизиноподобной протеиназы ArgVi вероятно находится под контролем глобального регулятора метаболизма CodY в клетках бацилл. Фактор транскрипции TnrA видимо не оказывает влияния на транскрипцию гена *aprVi*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 08-04-00789-а.

О воздействии ТМ на культуры молочнокислых бактерий

Холодова Е.А., Хамнаева Н.И.

асп., д.т.н. (проф.)

Восточно-Сибирский государственный технологический университет

Факультет Сервиса технологии и дизайна г. Улан-Удэ РФ

E-mail: heugy@mail.ru

Безопасность является основным условием питания современного человека. В связи с высоким техногенным воздействием предприятий на окружающую среду, особенно остро в промышленно развитых районах стоит проблема контаминирования растительного и животного сырья соединениями тяжелых металлов.

В молочной промышленности контаминирование молока-сырья ТМ несет значительный экономический ущерб, т.к. данное сырье выбраковывается, вследствие сложности переработки молока с соединениями ТМ. Это объясняется тем, что молоко является продуктом, содержащим большое количество белков, обладающих способностью вступать в прочные соединения с ионами ТМ.

Как известно, ионы металлов образуют соединения с белковыми молекулами путем связывания с сульфгидрильными, карбоксильными группами. Поэтому без разрушения химической структуры белковых молекул удаление ионов тяжелых металлов не представляется возможным. В производстве ферментированных молочных продуктов применяются микроорганизмы, обладающие рядом специфических свойств, которые обуславливают биохимические изменения компонентов молока в процессе ферментации. Молочнокислые бактерии (МКБ) оказывают как прямое воздействие на белковые молекулы – протеолиз, так и косвенное – коагуляция казеина в результате повышения кислотности в процессе молочнокислого брожения. Была поставлена задача исследование влияния процесса ферментации молочнокислыми бактериями на соединения ТМ с белками молока. Известно, что ТМ в определенной концентрации обладают ингибирующим воздействием на жизнедеятельность всех живых организмов, в т.ч. и микроорганизмов.

Поскольку процесс ферментации зависит от биохимической активности используемых культур молочнокислых бактерий, является целесообразным исследовать первоначально влияние ТМ на биохимическую активность некоторых видов молочнокислых бактерий. К наиболее распространенным контаминантам по результатам проведенного ранее мониторинга можно отнести свинец, кадмий, медь.

Изучалась биохимическая активность МКБ вида *Lb.bulgaricum*, характеризующейся высокой кислотообразующей, протеолитической активностью. Биохимическая активность определялась по показателю кислотообразующей активности (титруемая, активная кислотность). Концентрации добавок ТМ определялись согласно СанПиН 2.3.2.1078, требованиям ВОЗ. Доза вносимой закваски – 3%.

Результаты исследований показали, что ингибирующее действие на активность *Lb.bulgaricum* уменьшается в ряду: кадмий-свинец-медь. Токсичность кадмия можно объяснить тем, что кадмий является наиболее реакционноспособным: связываясь с ферментами МКБ, например с лактатдегидрогеназой, кадмий тормозит процесс образования молочной кислоты. Отмечено, что даже минимальное превышение ПДК в 1,5 раза оказывало значительный ингибирующий эффект – энергия кислотообразования снизилась в 2 раза в сравнении с контролем. Заметное торможение кислотообразующей активности под воздействием свинца наблюдалось в опытной пробе при величине концентрации 2ПДК. Таким образом отмечено снижение энергии кислотообразования во всех опытных пробах, однако полного прекращения кислотообразования не выявлено, что указывает на высокую активность ферментных систем *Lb.bulgaricum*.

Литература

1. Л.А.Банникова, Н.С.Королева, В.Ф.Семенихина Микробиологические основы молочного производства – М.:Агропроиздат, 1987.-400с.

Ингибирование bc_1 комплекса дыхательной цепи митохондрий приводит к активации опухолевого супрессора p53

*Хуторненко Анастасия Александровна
студент*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*

E-mail: bioingenier@gmail.com

Митохондрии играют двоякую роль в клетках, являясь энергетическими станциями клетки и регуляторами апоптоза. Механизм трансформации энергии митохондриями включает дыхательную электронтранспортную цепь (ЭТЦ), состоящую из переносящих электроны комплексов I-IV, погруженных во внутреннюю митохондриальную мембрану.

Белок-онкосупрессор p53 играет ключевую роль при ответе клетки на различные стрессы, такие как генотоксический стресс, нарушение транскрипции, активация онкогенов, гипоксия и другие. Он является ядерным транскрипционным фактором, который связывается со специфическими нуклеотидными последовательностями в промоторных областях генов-мишеней и активирует (или подавляет) транскрипцию генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, репарации ДНК или индукции апоптоза.

Цель данной работы - исследование влияния ингибирования дыхательной цепи митохондрий на опухолевый супрессор p53. Нами обнаружено, что обработка ряда клеточных линий миксотиазолом, ингибитором bc_1 комплекса дыхательной цепи митохондрий, приводит к значительному увеличению внутриклеточного уровня p53 и к активации p53 как транскрипционного фактора.

Чтобы выяснить, связан ли эффект миксотиазола с определенным элементом дыхательной цепи митохондрий, исследовали влияние ряда других ингибиторов ЭТЦ на уровень и активность p53. Оказалось, что только ингибирование bc_1 комплекса дыхательной цепи митохондрий (но не I, II или IV комплекса) приводит к активации p53 в клетках, причем ингибиторы Q_0 сайта bc_1 комплекса, миксотиазол и стигмателлин, активируют p53 сильнее, чем ингибитор Q_i сайта антимицин А.

Этот эффект, по-видимому, не зависит от активных форм кислорода (АФК), так как на него не влияла предобработка клеток антиоксидантом N-ацетилцистеином, известным инактиватором АФК.

Действие разобщителей митохондриального мембранного потенциала (ММП) не приводило к значительной активации p53 и практически не влияло на активацию p53 под действием миксотиазола. Эти данные не подтверждают гипотезу Л. Беренд с соавт. [L.Behrend et al., 2005] о том, что уменьшение ММП под действием ингибиторов ЭТЦ может быть причиной активации p53, и указывают на то, что активность p53 в клетках при действии миксотиазола регулируется другими способами.

Нам также удалось показать, что ингибирование bc_1 комплекса дыхательной цепи митохондрий миксотиазолом приводит к гибели клеток по апоптотическому механизму, и апоптоз является в значительной степени p53-зависимым.

Необходимы дальнейшие исследования для установления механизма действия миксотиазола на опухолевый супрессор p53.

Биодеградация 2,4-дихлорфенола клетками *Bacillus cereus*

Центер Ирина Михайловна, Батоев Валерий Бабудоржиевич

Ведущий инженер, заведующий лабораторией, д.б.н.

Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ, Россия

E-mail: tcenter@binm.bscnet.ru

В настоящее время, в условиях повышенного антропогенного воздействия на экосистему озера Байкал, особую актуальность приобретают исследование и разработка биодеструктивных методов утилизации органических акваэтоксикантов, в частности полихлорфенолов (ПХФ). На Байкальском целлюлозно-бумажном комбинате ПХФ образуются при хлорной отбелке целлюлозы и обнаруживаются в воде озера Байкал, в зоне сброса очищенных сточных вод /1/. Вследствие этого, актуальной является проблема их принудительной деградации, с целью защиты окружающей среды.

Биологический метод является наиболее экономически обоснованной альтернативой химическим и физико-химическим методам. Причем, эффективность очистки сточных вод повышается при иммобилизации микроорганизмов /2/.

При исследовании процесса биодеградации 2,4-ДХФ клетками *B. cereus*, найдено, что конечная концентрация субстрата после 12 суток культивирования при исходной концентрации 2,4-ДХФ 100 мкМ (16,3 мг/л) достигала следующих значений: в среде с иммобилизованными клетками 2,1 мг/л (изменение концентрации (ΔC) = 15,6), в среде с суспендированными. Для исследования процессов биодеградации 2,4-дихлорфенола (2,4-ДХФ) была выбрана бактериальная культура *Bacillus cereus* (*B. cereus*) /3/. Иммобилизация клеток *B. cereus* проводилась на природных цеолитах Холинского месторождения (Республика Бурятия).

- 6,5 мг/л (ΔC = 10,9). Конечная концентрация субстрата после 12 суток культивирования при исходной концентрации 2,4-ДХФ 300 мкМ (48,9 мг/л) в среде с иммобилизованными клетками составила 10,9 мг/л (ΔC = 38), с суспендированными – 32 мг/л (ΔC = 16,9). Причем, вклад химического окисления и испарения 2,4-ДХФ при исходной концентрации 300 мкМ в течение 12 суток незначителен, составил 0,3 % в контрольной пробе и 3,2 % в контрольной пробе с цеолитом. Рассчитанные константы скорости биодеградации 2,4-ДХФ позволяют заключить, что скорость деградации субстрата иммобилизованными клетками *B. cereus* в 1,9 раза выше скорости деградации суспендированными клетками *B. cereus* при одинаковых условиях протекания процесса.

Таким образом, установлено, что клетки *B. cereus* обладают высокой деградативной способностью по отношению к 2,4-ДХФ, способны разлагать эти загрязнители при высоких концентрациях, до 300 мкМ. Клетки, иммобилизованные на цеолитах, полностью сохраняют свою деградативную способность, обладают стабильностью при хранении.

Литература

1. Бейм А.М., Белявцева Г.В., Горохова В.Г., Горохов А.Г., Бабкин В.А. Хлорорганические соединения, поступающие в Байкал со сточными водами Байкальского целлюлозно-бумажного комбината // Химия в интересах устойчивого развития, 1997. - Т.5, №4 - С. 383-392.
2. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Грегирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикладная биохимия и микробиология, 2005. -Т.41, №1 - С. 58-63.
3. Matafonova G.G., Shirapova G.S., Zimmer C., Giffhorn F., Batoev V.B., Kohring G. -W. Degradation of 2,4 – dichlorophenol by *Bacillus sp.* isolated from an aeration pond of Baikalsk pulp and paper mill (Russia) // Journal International Biodeterioration & Biodegradation, 2006. – V. 58, №3-4 - P. 209-212.

Физико-химические свойства глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, продуцируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis*

Шамсутдинов Талгат Рахимзянович, Черёмин Андрей Михайлович, Данилова Юлия Васильевна, Балабан Нэлли Павловна, Шарипова Маргарита Рашидовна
аспирант; студент; студент; с.н.с., к.б.н.; д.б.н., проф.
Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина, биолого-почвенный факультет, Казань, Россия
E-mail: Talgat_saby@mail.ru

Бациллы являются удобными объектами исследования, так как они непатогенные, легко культивируются, известна их геномная последовательность. Поэтому они могут быть использованы в биотехнологии, например, для повышения выхода фермента путем клонирования и модификации генов с эффективными регуляторными элементами. Перспективными являются рекомбинантные штаммы, несущие на плаزمиде гены протеиназ. В работе использован рекомбинантный штамм *B.subtilis* AJ73 Δ58.21, у которого плаزمид Δ58.21 имела вставку хромосомной ДНК *B.intermedius* размером 2,6 т.п.о. и содержала ген глутамилэндопептидазы. Штамм любезно предоставлен для работы проф. Костровым С.В. (ИМГ РАН, Москва). Цель работы выделение, очистка и характеристика физико-химических свойств глутамилэндопептидазы ранней и поздней стационарной фазы роста *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 Δ58.21.

Глутамилэндопептидазу выделяли из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B.subtilis* AJ73 Δ58.21 с помощью ионообменной хроматографии на КМ – целлюлозе с последующей очисткой на колонке Mono S в системе FPLC. Двухстадийная очистка фермента позволила получить хроматографически гомогенные препараты ранней и поздней протеиназы. Степень чистоты препаратов протеиназы установлена электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях. Исследование влияния различных ингибиторов на активность глутамилэндопептидазы рекомбинантного штамма *B. subtilis* AJ73 Δ58.21, показало, что специфический ингибитор DFP полностью, а PMSF частично

ингибируют активность ферментов, с более выраженным эффектом для второго препарата. Фермент ранней фазы роста был не чувствителен к ингибиторам металлопротеиназ, а фермент поздней фазы роста, ингибировался этими ингибиторами.

Таким образом ранний фермент более устойчив к действию ингибиторов чем поздний. Глутамилэндопептидаза имеет один оптимум рН по гидролизу синтетического субстрата (9.0 для раннего фермента и 8.5 для позднего фермента) и два оптимума рН по гидролизу казеина (7,5 и 9,0). Оба препарата стабильны в течение 24 часов в диапазоне рН 7.2 - 9.5 и 7.2 - 9.0 соответственно. Присутствие ионов Ca^{2+} в реакционной смеси незначительно увеличивает активность фермента. Температурный оптимум глутамилэндопептидазы ранней и поздней стационарной фазы роста рекомбинантного штамма *B. subtilis* в отсутствие ионов кальция равен 45°C. В присутствии ионов кальция максимум активности только для ранней глутамилэндопептидазы смещается на 15°C, при этом наблюдается увеличение активности ранней и поздней протеиназы на 70-75%. Исследовали влияние ионов двухвалентных металлов (Mg, Mn, Co, Ca) на активность глутамилэндопептидазы разных фаз роста. Ионы этих металлов практически не оказывали влияния на активность раннего препарата, но увеличивали активность второго.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 05-04-48182-а).

**Элиминация фенола с использованием свободной и иммобилизованной тирозиназы
из *Agaricus bisporus***

*Шестеренко Юлия Аркадиевна, Романовская Ирина Игоревна,
аспирантка кандидат химических наук, доцент
Севастьянов Олег Всеволодович, Волошина Инна Витальевна
кандидат химических наук студентка
Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
Львосторфская дор., 86, Одесса, Украина
E-mail: shesterenko@mail.ru*

В настоящее время значительный интерес представляет ферментативный метод элиминации фенольных поллютантов из растворов и сточных вод с использованием оксидоредуктаз (в т.ч. тирозиназы из грибов), выгодно отличающийся от традиционных эффективностью очистки, возможностью применения в мягких условиях, высокой специфичностью. Вместе с тем, промышленное применение тирозиназы ограничено высокой стоимостью, однократностью применения очищенного энзима. Поэтому оптимизация метода с использованием частично очищенного иммобилизованного препарата ТИР является актуальной задачей.

Целью настоящего исследования было получение из грибов *Agaricus bisporus* частично очищенного препарата тирозиназы и создания на его основе биокатализатора в технологичной форме для элиминации фенола из водных растворов.

Из грибов *Agaricus bisporus* выделен частично очищенный препарат тирозиназы (К.Ф. 1.14.18.1) (ТИР); добавление синтетического полимера в ходе выделения способствовало увеличению активности ТИР в 3 раза и десятикратному уменьшению ее себестоимости по сравнению с коммерческим препаратом. В результате был получен частично очищенный препарат ТИР с содержанием белка 0,67 мг/г грибов, активностью 500 ед/мг/мин (по тирозину), содержанием меди 0,19 % (атомно-адсорбционная спектроскопия). Методом SDS- электрофореза в ПААГ исследован фракционный состав препарата; нативный электрофорез показал, что 90 % белковых фракций обладают выраженной активностью. Частично очищенный препарат ТИР катализировал окисление фенола в широком диапазоне концентраций (0,5 – 10 ммоль/дм³) с 98 %-ной степенью трансформации. Для количественного удаления темно-окрашенных растворимых продуктов биоконверсии фенола (олигомерные соединения конденсации о-хинона), в качестве коагулянтов впервые использовали алюмокалиевые, алюмоаммонийные и железоаммонийные квасцы в концентрациях (1,0-20,7 г/дм³), зависящих от таковых исследуемого поллютанта .

Оптимизированы условия иммобилизации препарата ТИР (массовые соотношения белок:носитель, концентрации матрицы и сшивающего агента) в гель альгината кальция. В результате получен биокатализатор в технологичной форме, пригодный для гетерогенного катализа (нерастворимые в воде сферические гранулы диаметром 2 мм), с 50 %-ным сохранением исходной активности.

Иммобилизованная ТИР (3000 ед/г препарата) катализировала окисление водного раствора фенола (0,5 ммоль/дм³, $\tau=1$ час, $t=25^{\circ}\text{C}$) с количественной степенью биоконверсии на протяжении 10-ти циклов (рис.), с высоким сохранением степени трансформации субстрата в последующие 15 циклов.

