



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ЮЖНО-УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ГУМАНИТАРНО–
ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «ЮУрГГПУ»)

ФАКУЛЬТЕТ ЕСТЕСТВЕННО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
КАФЕДРА ХИМИИ, ЭКОЛОГИИ И МЕТОДИКИ ОБУЧЕНИЯ ХИМИИ

Изучение структурно-функциональных аспектов
РНК-белкового взаимодействия белка SmAR из
Halobacterium salinarum

Выпускная квалификационная работа
по направлению 44.03.05 Педагогическое образование
(с двумя профилями подготовки)
Направленность программы бакалавриата
«Биология. Химия»

Проверка на объем заимствований:

93,03 % авторского текста

Работа рекомендована к защите
рекомендована/не рекомендована

« 01 » 06 2019 г.

зав. кафедрой Химии, экологии и
МОХ

Ср Сутягин А.А.

Выполнила:

Студентка группы ОФ-501/068-5-1

Буюклян Юлия Андреевна Букоф

Научный руководитель:

к.п.н., доцент

Лисун Лисун Наталья Михайловна

Челябинск
2019

СОДЕРЖАНИЕ

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 СТРУКТУРНО– ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛКА SmAP ИЗ <i>HALOBACTERIUM SALINARUM R1</i> И ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ НА ОСНОВЕ <i>HALOBACTERIUM SALINARUM R1</i> ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ.....	7
1.1 Белок SmAP из <i>Halobacteretium salinarum R1</i>	7
1.2 Общее представление о строение, физиологии и экологии <i>Halobacterium salinarum</i>	11
1.3 Делеция гена белка SmAP в <i>Halobacterium salinarum sp. R1</i>	15
Выводы по первой главе.....	22
ГЛАВА 2 ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ <i>H. SALINARUM</i> С ДЕЛЕТИРОВАННЫМ ГЕНОМ БЕЛКА SmAP.....	24
2.1 Получение генетической конструкции для делеции гена белка SmAP из <i>H. salinarum</i>	24
2.2 Получение штамма <i>dam⁻ E. coli XL</i> для наработки плазмиды pNXBdHsaSm для последующей трансформации клеток <i>H. salinarum</i>	30
2.3 Получение штамма <i>H. salinarum</i> с делетированным геном белка SmAP.....	35
2.4 Подготовка образцов растворимой фракции белков клеток <i>H.</i> <i>salinarum</i> для двумерного электрофореза с целью их дальнейшего протеомного анализа.....	40
Выводы по второй главе.....	43
ГЛАВА 3 СОДЕРЖАНИЕ, МЕТОДИКА ОРГАНИЗАЦИИ И ПРОВЕДЕНИЕ СЕРИИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ НА ЗАНЯТИЯХ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ У СТУДЕНТОВ ХИМИКО– БИОЛОГИЧЕСКОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ.....	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	60
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	62
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	69

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

- БСА – бычий сывороточный альбумин
БФС – бромфеноловый синий
ДМСО – диметилсульфоксид
дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфат
ДСН – додецилсульфат натрия
ДТТ – дитиотрейтол
МЭ – меркаптоэтанол
мяРНК – малая ядерная рибонуклеиновая кислота
п.о. – пара оснований
ПААГ – полиакриламидный гель
ПСА – персульфат аммония
ПЭГ – полиэтиленгликоль
РНК – рибонуклеиновая кислота
РНП – рибонуклеопротеид
рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
ТЕМЕД – N,N,N',N'– тетраметилэтилендиамин
т.п.о. – тысяча пар оснований
Трис – трис(гидроксиметил)аминометан
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ВВЕДЕНИЕ

Белки архей SmAP (Sm Archaeal Protein) относятся к семейству Lsm (Sm-like) белков, характеризующемуся наличием консервативного Sm-мотива из N-концевой α -спирали и пяти-тяжевого β -листа. Мономеры Lsm белков формируют четвертичную структуру в виде тороидальных колец из 6 или 7 молекул.

Несмотря на структурную схожесть, функции белков семейства Lsm в археях, бактериях и эукариотах отличаются. В бактериях имеется только один Lsm белок, называемый Hfq (Host factor Qbeta-replicase). Он является регулятором экспрессии многих генов, способствуя взаимодействию малых регуляторных РНК с мРНК и таким образом подавляя или стимулируя их трансляцию. Эукариоты содержат ряд гомологичных Sm/Lsm белков, которые участвуют в формировании целого ряда функционально важных рибонуклеопротеидных (РНП) комплексов, включая сплайсосомы и теломеразы. Эти белки формируют гетерологичные гептамеры, причем Sm-белки образуют их только в присутствии мРНК, а Lsm белки независимо от наличия РНК. SmAP, как и эукариотические белки, формируют гептамеры, но из гомологичных мономеров, как бактериальные белки Hfq. В геноме архей, аминокислотная последовательность белка SmAP кодируется одним или несколькими генами. У галофильной археи *H. salinarum* выявлен только один ген SmAP белка, однако транскриптомные данные свидетельствуют о двух возможных вариантах транскрипции. SmAP из *H. salinarum* не содержит характерных для большинства гомологов N- и C- неструктурированных участков, кроме того в этом белке отсутствует протяженная петля L4, характерная для эукариотических и архейных гомологов. Тем самым SmAP из *H. salinarum* представляет собой белок с «минимальным» Sm-мотивом.

Клетки *H. salinarum* удобны для культивирования в лабораторных условиях и являются одними из наиболее изученными представителем галобактерий. Данное обстоятельство предоставляет возможность исследовать процессы в клетках *H. salinarum* на уровне *in vivo*. На данный момент имеются только отдельные сведения о взаимодействии SmAP белков с РНК в археях *Haloferax volcanii* и *Sulfolobus solfataricus*, которые, однако, не дают полного представления о роли этих белков в археях. Число вероятных РНК– мишеней для SmAP в этих работах велико и не систематизировано. Представленная работа является кирпичиком на первом этапе понимания роли SmAP белка в клетках археи *H. salinarum*.

Цель исследования – определить, как отсутствие белка SmAP в клетках скажется на протеоме археи *Halobacterium salinarum* путем создания штамма с делецией гена белка.

Задачи исследования:

1. Получить клетки *Halobacterium salinarum* с делецией гена белка SmAP.
 - 1.1. Создать генетическую конструкцию для делеции гена белка SmAP в клетках *H. Salinarum*.
 - 1.2. Оптимизировать методику трансформации клеток *H. salinarum*.
2. Отработать методику получения протеомных карт клеток архей/
 - 2.1. Подготовить образцы растворимой фракции белков клеток *H. salinarum*.
 - 2.2. Получить протеомную карту растворимой фракции белков клеток *H. salinarum* методом двумерного электрофореза.
3. Оптимизировать условия культивирования клеток *Bacillus sp.* и выделения геномной ДНК.
4. Составить серию лабораторных работ по молекулярной биологии для студентов химико-биологической направленности.

Предмет исследования: клетки галофильной археи *H. salinarum*.

Объект исследования: белок SmAP из *H. salinarum*.

Гипотеза исследования: архейный белок SmAP влияет на экспрессию генов белков археи *H. salinarum*.

Практическая значимость исследования: галофильные археи способны жить и развиваться при экстремальных условиях; их изучение актуально с точки зрения эволюции на ранних этапах развития жизни на Земле, потенциальной способности выживания организмов за пределами нашей планеты [18], а также для изучения разнообразия процессов регуляции генов в представителях разных доменов жизни.

Помимо этого, методы, используемые в данной работе, имеют большую практическую значимость при разработке лабораторных практикумов по дисциплинам биохимия и молекулярная биология, а также в школьном курсе при выполнении различных проектов и факультативных курсов, для углубленного изучения биологических процессов, лежащих на молекулярном уровне.

**ГЛАВА 1 СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
БЕЛКА SmAP ИЗ HALOBACTERIUM SALINARUM R1
И ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ НА ОСНОВЕ
HALOBACTERIUM SALINARUM R1 ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ
ИССЛЕДУЕМОГО БЕЛКА**

1.1. Белок SmAP из *Halobacteretium salinarum R1*

Lsm (Sm-like) белки принадлежат к семейству РНК-связывающих белков, присутствующих в трех доменах жизни: эукариотах, бактериях и археях. Они характеризуются консервативной пространственной структурой, называемой Sm-мотивом, состоящей из пятитяжевого β -слоя дополненной N-концевой α -спиралью (рис. 1) [36, 60]. В структуре белка выделяют две части Sm-мотива: одна (Sm2, тяжи $\beta 4$ и $\beta 5$) поддерживает межсубъединичные контакты, а другая (Sm1), представленная тремя β -тяжами ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$), участвует в формировании РНК-связывающих сайтов белка (сайт связывания одноцепочечных У-богатых РНК, обнаруженный у всех белков; поли(А) РНК-связывающий сайт и боковой РНК-связывающий сайт у бактериальных белков Hfq) [36].

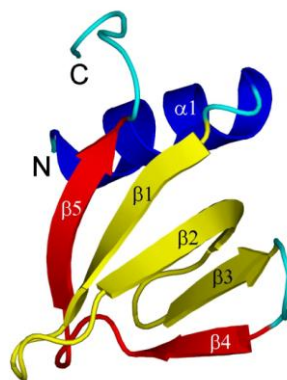


Рис. 1 Ленточная модель укладки мономера представителя белков семейства Lsm. Синим цветом выделена N-концевая α -спираль; мотив Sm1-тяжи $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$ — выделен желтым цветом; мотив Sm2-тяжи $\beta 5$ и $\beta 4$ — выделен красным цветом

Эукариотические представители данного семейства были открыты при изучении аутоиммунного заболевания системная красная волчанка. При болезни человеческий организм вырабатывает антитела против собственных белковых антигенов, которые, как позднее выяснилось, входят в состав сплайсосомы и формируют комплексы с малыми ядерными РНК (рис 2.) [57, 41].

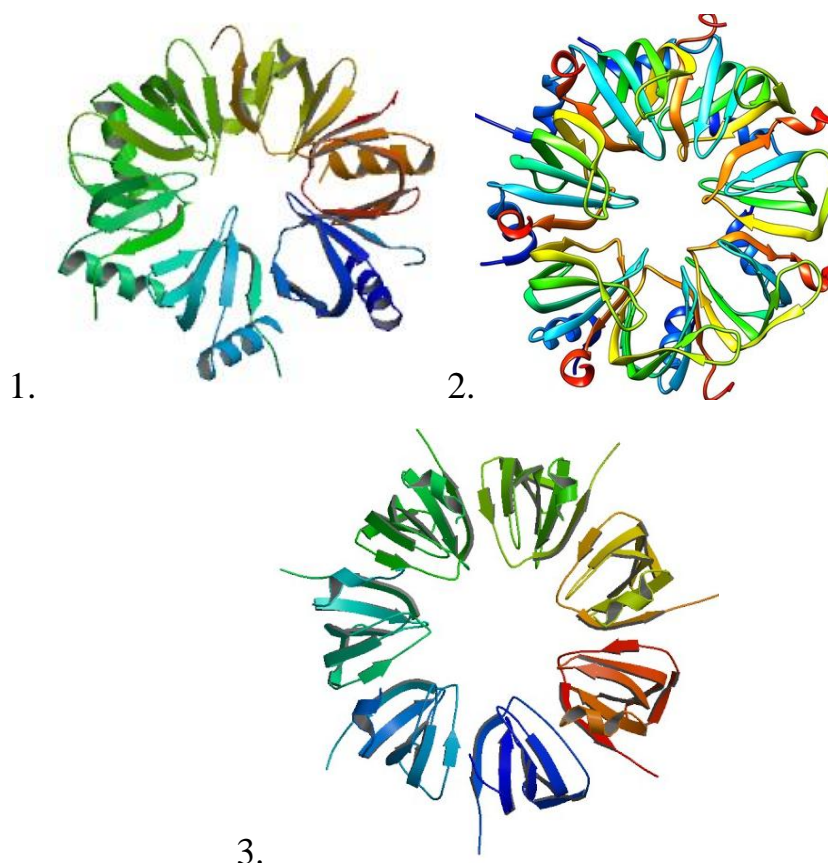


Рис. 2 Пространственные структуры ряда Sm- и Sm- подобных белков.
 (1) Гомогексамер белка Hfq *P. aeruginosa* PDB 1U1S [40], (2). Гомогептамер
 белка SmAP *Sulfolobus acidocaldarius* PDB 5MKL [39], (3) SmF *Saccharomyces cerevisiae*
 PDB 1N9S [17]

Бактериальный представитель семейства Lsm – высококонсервативный белок Hfq (рис. 2) [3, 49]. Белки Hfq несколько отличаются по аминокислотной последовательности от других представителей данного семейства, однако также имеет четвертичную структуру, характерную для белков семейства Lsm [34]. Hfq связывает А/У богатые участки РНК в трех

сайтах на поверхности образуемого им гексамера [37]. Он является глобальным регулятором экспрессии генов, а также РНК-шапероном, способствующим взаимодействию малых регуляторных РНК и их целевых мРНК [55].

Архейные гомологи семейства Lsm, известные как белки SmAP (Sm Archaeal protein) (рис. 2.) [39], связывают уридин-богатые участки малых ядерных РНК и тРНК, а также взаимодействуют с рядом белков, участвующих в регуляции трансляции и метаболизме РНК [3, 36].

Отличительная особенность представителей архейных белков SmAP – формирование ими гомогептамерной структуры. Исключением является белок SmAP из *Methanocaldococcus jannaschii*, который имеет стабильную Hfq-подобную гексамерную четвертичную структуру [38]. SmAP2 из археи *Archeoglobus fulgidus* может формировать гексамеры или гептамеры в зависимости от присутствия РНК и рН среды. У этого белка гексамеры формируются в кислой среде при отсутствии РНК, а добавление У- богатой РНК приводит к формированию гептамеров [53].

В SmAP белках отсутствует неупорядоченный С– концевой участок, характерный для бактериальных и некоторых эукариотических гомологов. С эукариотическими белками архейные роднит и наличие консенсусной последовательности RGXX Sm2 мотива (X – заряженная аминокислота) на дистальной поверхности РНК-связывающего сайта.

Одной из вероятных ролей архейных SmAP белков в клетке является участие в биогенезе некодирующих РНК: тРНК, рРНК и мяРНК, поскольку у архей в генах кодирующих тРНК и рРНК встречаются интроны [29]. Обнаружение гомологов белков малого ядрышкового рибонуклеопротеида U3 позволяет предположить наличие у архей механизма процессинга рРНК с участием РНП [33]. Помимо этого, был обнаружен некий предшественник интронов мРНК – ген псевдоуридиновой синтазы, модифицирующей тРНК и рРНК (архейный гомолог эукариотического центромер-связывающего фактора 5, Cbf5b), который содержит интрон, подвергаю-

щийся сплайсингу *in vivo* [56]. Однако, для архей, характерен механизм процессинга РНК с участием экзосомы – комплекса экзонуклеаз, РНК-связывающих белков и РНК-хеликаз, которые обеспечивают 3'→5' деградацию мРНК и других РНК [21].

Другая предполагаемая роль SmAP белков может быть связана с функциями домена «Тюдор», который представляет собой 5-членный антипараллельный β -лист, имеющий сходство с Sm-мотивом (рис. 3) [48]. Данный домен представлен во многих белках, участвующих в метаболизме РНК, например, в комплексе SMN, способствующем сборке Sm белков на малой ядерной РНК. «Тюдор» связывает метилированные остатки субстратных белков, такие как дважды метилированные аргинины эукариотических Sm белков. Отсутствие системы Тюдор/SMN у архей подразумевает, что SmAP белки не метилируются, либо метилируются через альтернативные пути [36].

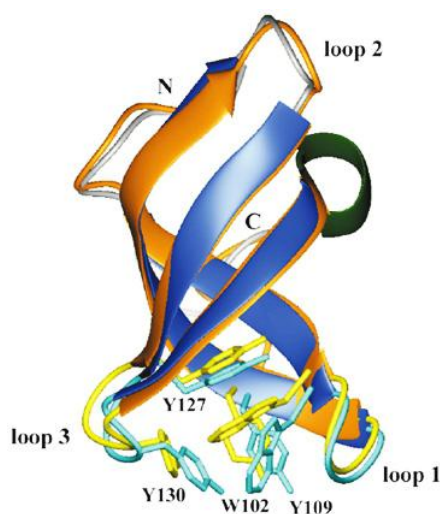


Рис. 3 Структура домена «Тюдор», полученная методами рентгеновской кристаллографии (оранжевый) и ЯМР (синий). Показаны ароматические боковые цепи (в структуре ЯМР – голубым, в кристаллической структуре – желтым) [48], с изменениями

Несмотря на все полученные результаты, до сих пор нельзя однозначно сказать, являются ли архейные SmAP белки каркасными белками для формирования мяРНК, как Sm белки эукариот, действуют ли как ша-

пероны малых регуляторных РНК, как бактериальные Hfq, или же они выполняют свою определенную роль в биологии РНК [36].

Объектом нашего исследования является белок SmAP из *Halobacterium salinarum*. У него отсутствуют последовательности протяженных N- и C- концев, а также последовательность длинной петли между Sm1 и Sm2 мотивами, специфической для архейных и эукариотических белков. Тем самым этот белок представляет собой своего рода «минимальный» Lsm белок.

1.2. Общее представление о строении, физиологии и экологии

Halobacterium salinarum

Археи (*Archaea*) – уникальная группа одноклеточных микроорганизмов, формирующая отдельный домен жизни. Большинство представителей данной группы являются экстремофилами, способными выживать в условиях повышенной и пониженной температуры, кислотности, концентрации соли и давлении. Такая приспособленность к выживанию в экстремальных условиях окружающей среды привела к использованию архей в качестве ресурса для получения ферментов, которые способны работать в широком диапазоне условий. Помимо этого, некоторые виды архей (метаногены) являются составной частью человеческого микробиома, и могут влиять на здоровье и на развитие болезней человека вследствие ассоциации с иммунной системой человека [9].

Археи сочетают в себе признаки присущие как бактериям, так и эукариотам, а также обладают своими уникальными свойствами. Очевидным общим признаком с бактериями является прокариотическая морфология: отсутствие внутренних мембран, оформленного ядра, наличие внехромосомных генетических элементов, одноклеточность, микроскопические размеры, оперонная организация генов. Также в структуре генома присутствуют кластерные последовательности – CRISPR-элементы и гены эффек-

торных *Cas*-белков – компоненты иммунной системы бактерий и архей (рис. 4). Помимо этого, в клетках архей и бактерий существует естественная система защиты, представленная системой рестрикции-модификации, и обеспечивающая деградацию чужеродной молекулы ДНК в клетке (рис. 4).

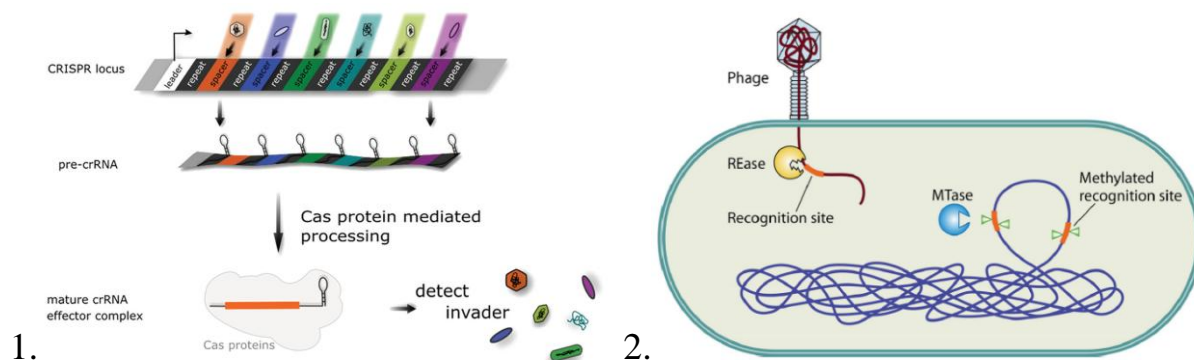


Рис. 4 Системы защиты бактериальных и архейных клеток.
 (1) Иммунная системы прокариот и архей – CRISPR/Cas [31]
 (2) Система рестрикции– модификации бактерий и архей [54]

С эукариотами археи сближает возможность ассоциации хромосомной ДНК с гистонами и образования нуклеосомоподобной структуры [44]. Однако отличительной особенностью в структуре архейных гистонов является отсутствие N- и С- концевых петель, которые присутствуют в эукариотических [23] (рис. 5).

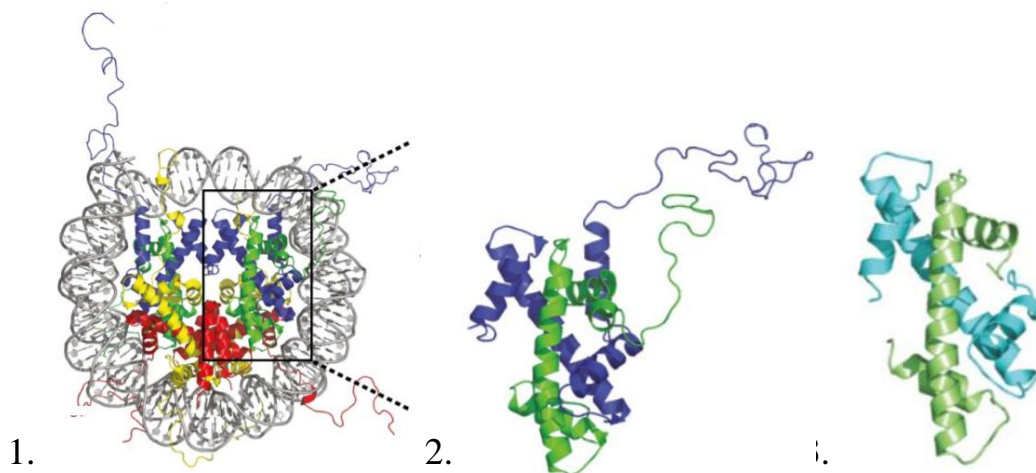


Рис. 5 Пространственные структуры эукариотических и архейных белков гистонов.
 (1) Эукариотическая нуклеосома – желтым окрашен H2A, красным H2B, голубым H3, зеленым H4 гистоны. (2) Эукариотический (H3 – H4) – тетрамер с N- и С- концевыми

петлями. (3) Архейный (H3 – H4) – тетрамер [23]

Помимо этого, в геноме архей, который сопоставим по размерам с бактериальным геномом, может быть больше одной точки начала репликации [62]. Для архей, как и для эукариот, характерно явление РНК– интерференции. Суть данного процесса заключается в подавлении экспрессии гена на стадии транскрипции или трансляции. Главная роль в обеспечении РНК-интерференции принадлежит коротким интерферирующим РНК (киРНК), комплексу белков RISC (RNA – induced silencing complex) и эндонуклеазе семейства Argonaute (рис. 6).

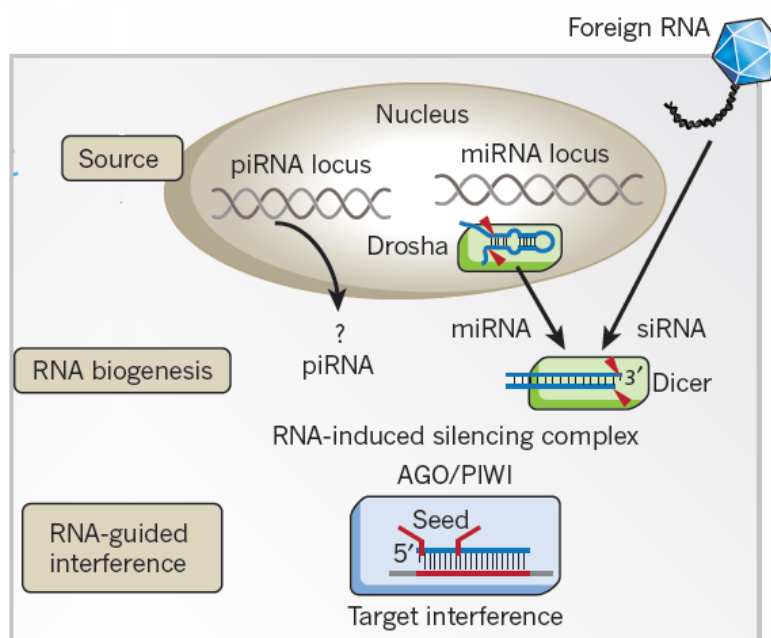


Рис. 6 Процесс РНК– интерференции в эукариотах и археях [59]

Уникальной особенностью архей является строение цитоплазматической мембраны, в состав гидрофобного хвоста которой входит разветвленный углеводород, связанный с гидрофильной частью посредством простой эфирной связи (рис. 7). Для стабильности и защиты клеток от разрушения цитоплазматическая мембрана окружена гликопротеидами, образующими поверхностный слой (рис. 7) [14].

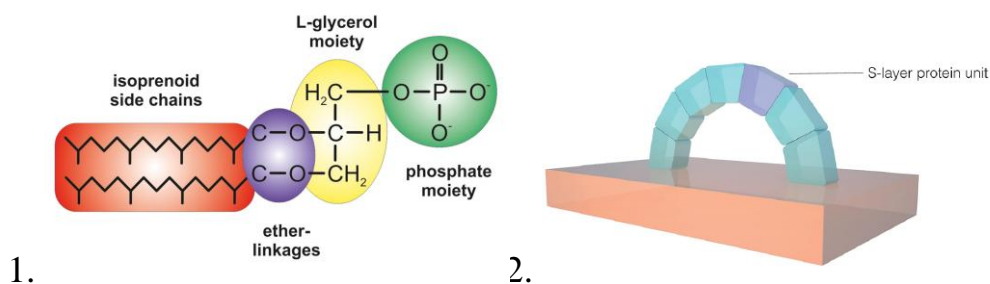


Рис. 7 Структура клеточной оболочки архей.

(1) Состав цитоплазматической мембраны [9],

(2) Архитектура поверхностного S-слоя (Surface layer) в *H. salinarum* [27]

Домен архей, согласно современному руководству по систематике Д. Х. Берджи (*Bergey's manual of systematic bacteriology*), принято классифицировать на четыре крупных типа: Эуриархеота (*Euryarcheota*), Кренархеоты (*Crenarcheota*), Корархеота (*Korarchaeota*) и Наноархеота (*Nanoarcheota*).

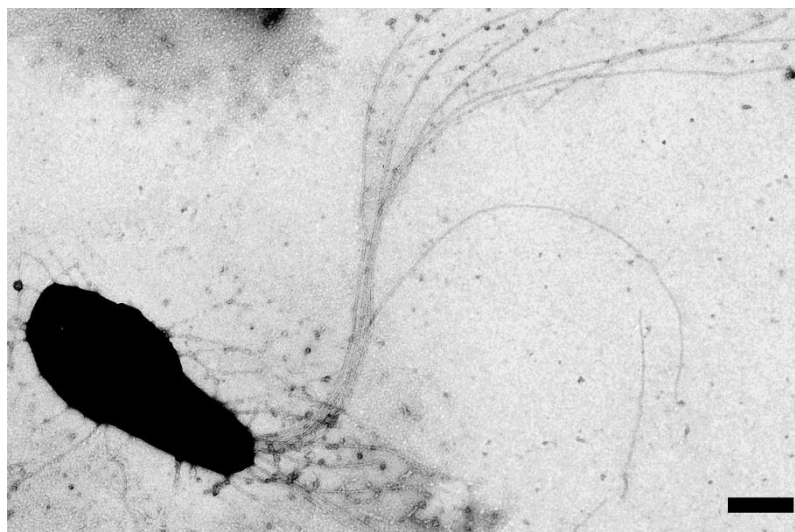


Рис. 8 Электронно-микроскопическое изображение клетки *H. salinarum* со жгутиками.

Негативное контрастирование уранил ацетатом. Масштабная линейка – 300 нм. [1]

Объектом нашего исследования является архея *Halobacterium salinarum* (рис.8). Этот микроорганизм относится к группе эуриархиот, обитающих в условиях повышенной концентрации соли $\omega(\text{NaCl}) \approx 30\%$ [20]. В лабораторных исследованиях используются два штамма галобактерий: *H. salinarum strain R1* (*Hbt. sp. R1*) и *H. salinarum strain NRC-1* (*Hbt.*

sp. NRC-1), так как у данных штаммов была секвенирована и аннотирована полная геномная последовательность. В структуре генома обоих штаммов выделяют следующие компоненты: одна кольцевая молекула ДНК (GC-богатая фракция) и мегаплазмиды (AT-богатая фракция), представленные в количестве двух (*Hbt. sp. NRC-1*) и четырех (*Hbt. sp. R1*) экземпляров [42].

Особенности строения клеточной стенки галофильных архей и условий их обитания, делают невозможным использование «классических» для прокариот методик трансформации клеток. *H. salinarum* наиболее удобен в исследованиях архей организм и является модельным объектом, поскольку для его культивирования используется стандартное оборудование и реактивы. Как следствие, существует большее число оптимизированных методов для осуществления генно-инженерных манипуляций с этими клетками [16].

1.3. Делеция гена белка SmAP в *Halobacterium salinarum sp. R1*

Для определения роли конкретного белка в клетках широко используются методы, позволяющие «выключить» ген исследуемого белка. Чаще всего используют два подхода: делеция или инактивация гена.

Делеция представляет собой один из методов сайт-специфического мутагенеза, который направлен на удаление части или целой нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий исследователя продукт в геноме организма. Данный метод используется для изучения функциональных особенностей, взаимного расположения и влияния генов друг на друга, а также изменений, возникающих в результате инактивации целевого гена [5].

Делеция генов основа на явлении гомологичной рекомбинации. Для архей характерен классический путь гомологичной рекомбинации (рис. 9),

который начинается с двухцепочечного разрыва, возникающего в результате действия клеточных ферментов, либо вследствие повреждения ДНК.

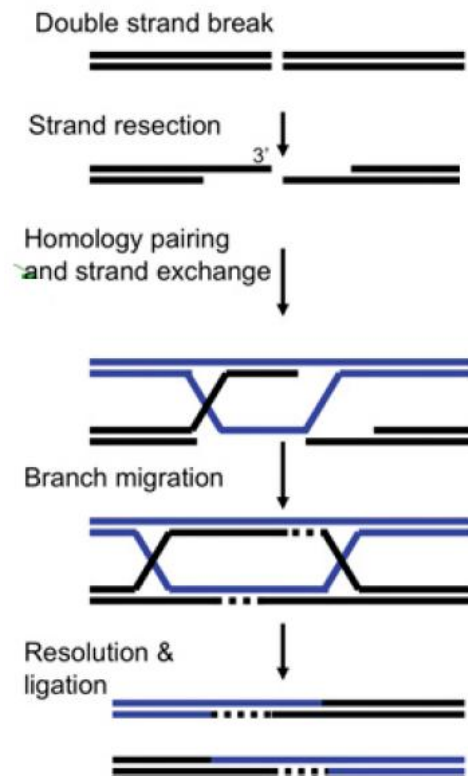


Рис. 9 Процесс гомологичной рекомбинации в археях [58]

Высокий уровень рекомбинации и непостоянство генома, являются характерной особенностью, поскольку способствует выживанию данных организмов в экстремальных условиях среды. Помимо этого, данная способность активно используется в качестве генно-инженерного инструмента для создания организмов с необходимыми мутациями [15]. Процесс гомологичной рекомбинации присущ всем клеткам, ибо обуславливает генетическое разнообразие организмов; он также активно используется в генной инженерии для создания штаммов клеток с делециями, заменами, вставками в последовательность ДНК [58].

В генной инженерии архей выделяют четыре метода делеции генов, основанные на явлении гомологичной рекомбинации/

Так, например, для замены гена можно использовать гомологичную рекомбинацию с использованием линейного ДНК фрагмента (рис. 10), ко-

торый имеет области гомологии, окаймляющие делетируемый участок гена в хромосоме, и содержит ген устойчивости к антибиотику.

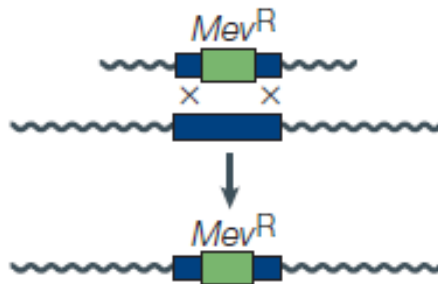


Рис. 10 Метод делеции гена в клетках архей с использованием линейного ДНК фрагмента [7]

Данный подход является наиболее простым и может быть использован во многих штаммах, однако рекомбинация с линейным фрагментом малоэффективна и используется на практике крайне редко.

Следующий метод делеции, который также называют «pop-in pop-out gene deletion» (рис. 11) заключается в использовании кольцевой молекулы ДНК, которая содержит маркерный ген, окаймленный участками гомологии deletируемого гена.

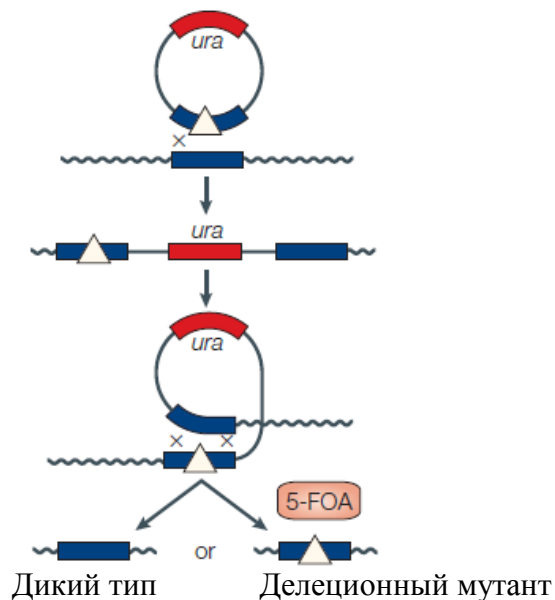


Рис. 11 Метод pop-in pop-out делеции гена в клетках архей [7]

Данный подход требует использование нескольких этапов: вначале происходит интеграция плазмидного вектора в хромосому – pop-in, затем в результате гомологичной рекомбинации, осуществляется удаление целево-

го гена: pop-out, это возможно в случае, если второй этап гомологичной рекомбинации произошел по противоположному участку гомологии, относительно целевого гена. В случае рекомбинации по первоначальному сайту, делеции целевого гена не происходит.

Существует альтернативный вариант pop– in pop– out метода (pop-in pop-out gene replacement) (рис. 12) для делеции генов, который заключается в замене целевого фрагмента на маркерный ген.

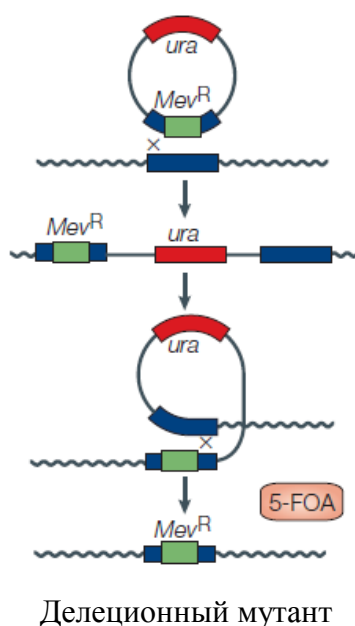


Рис. 12 Метод pop-in pop-out gene замены генов в клетках архей [7]

В данном случае также используется кольцевая молекула ДНК с необходимым маркером и областями гомологии. На первом этапе происходит интеграция плазмидного вектора в хромосому, после чего происходит гомологичная рекомбинация, приводящая к замене делетируемого фрагмента на маркерный ген. Такой процесс приводит к образованию мутантных клеток, содержащих на месте целевого участка, селективный маркер

Четвертым вариантом является двухэтапный метод pop-in pop-out делеции (рис. 13), который комбинирует описанные выше способы делеции генов.

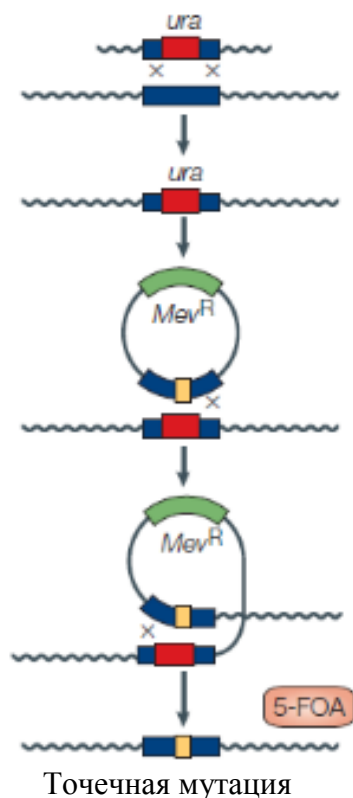


Рис. 13 Двухэтапный метод *pop-in pop-out* делеции генов в клетках архей [7]

В этом случае используется линейный фрагмент ДНК, содержащий необходимый маркерный ген, встраивание в хромосому которого происходит путем гомологичной рекомбинации. На втором этапе используется кольцевая молекула ДНК, имеющая свой селективный маркер, и необходимый участок гена с точечной мутацией, в результате второй гомологичной рекомбинации образуются клетки с точечной мутацией или делецией [7].

В 2000 г. сотрудниками группы надмолекулярных белковых структур, Института белка РАН Тарасовым и др. для выяснения роли А- и В-флагеллинов у *H. salinarum* был применен метод нокаута путем внесения делеции в область генов исследуемых флагеллинов. Для этого использовались плазмиды, вставка которых осуществлялась по принципу гомологичной рекомбинации [50].

В 2001 г. в лаборатории Джаррелла [52] был получен мутант *M. voltae* с нокаутированным геном *flaH*. Клетки данного штамма теряли подвижность.

В 2006 г. группой надмолекулярных белковых структур, Института белка РАН, Безносовым и др. был получен штамм *H. salinarum* $\Delta flgA\Delta flgB$ для изучения формы и активности жгутиков [10]. В 2007 г. Bonnie Chaban и др. исследователями были проведены работы по созданию делеционных мутантов *Halobacterium salinarum* и *Methanococcus maripaludis* с использованием метода pop– in pop– out, в ходе исследования был проведён делеционный анализ генов жгутиков. В этом же году эксперименты по нокауту генов флагеллинов галофильных и метаногенных микроорганизмах позволили определить возможные функции некоторых из них [50].

Важно отметить, что в 2015 г группой ученых Maier *et al.* был создан штамм *Hfx. volcanii* с делецией как полноразмерного гена белка SmAP, так и делетированного по одному мотиву данного белка [30]. В геноме данного штамма, как и в *H. salinarum*, последовательность гена белка SmAP кодируется одним геном, помимо этого данный белок имеет схожее окружение генов в опероне, что и *H. salinarum*. Однако в структуре SmAP белка из *Hfx. volcanii* присутствует L4 петля, соединяющая Sm1 и Sm2 мотивы, что не наблюдается в клетках *H. salinarum*. То есть белок SmAP из *H. salinarum* является «минимальным белком».

Кроме того, метод делеционного мутагенеза был осуществлён на генах белкового комплекса, участвующего в идентификации сайта начала репликации (*orc1/cdc6*) в четырех видах галобактерий: *Haloferax mediterranei*, *H. volcanii*, *Haloarcula hispanica* и *Halobacterium NRC-1*. В ходе работы было изучено влияние данного кластера генов на рост и развитие клеток вышеперечисленных микроорганизмов, а также на участие белкового комплекса в механизме инициации репликации [8, 22].

Введение генетических конструкций в клетки архей осуществляется любым из трех типов переноса генетической информации: трансформация, трансдукция и конъюгация [47]. Впервые метод трансформации применен Кляйном в 1987 году на клетках *H. volcanii* и использован далее для трансформации других близкородственных видов [16].

В клетках бактерий и архей существует естественная система защиты клеток от чужеродной ДНК – система рестрикции-модификации, проявляющая две противоположные ферментативные активности – эндонуклеазную, расщепляющую чужеродную ДНК по специфическим или неспецифическим сайтам, и метилтрансферазную, осуществляющую метилирование азотистых оснований в специфических последовательностях ДНК [11]. Путем геномного анализа в клетках архей была выявлена 5'-СТАГ-3' метилаза, а также система рестрикции, которая узнает последовательность ДНК GATC, метилированную по аденину, и осуществляет его фрагментацию. Такая последовательность часто встречается в плазмидных векторах, используемых в генной инженерии. Поскольку в клетках *Escherichia coli* есть метилазы, *dam* и *dcm*, осуществляющие метилирование аденинов и цитозинов, то в клетках *E. coli* получаемые конструкции подвергается метилированию. Это приводит к нестабильности получаемых плазмидных конструкций в клетках архей и чрезвычайно затрудняет рекомбинацию в клетках архей [25]. С этой проблемой столкнулись исследователи U. Blaseio и F. Pfeifer во время трансформации *Halobacterium halobium* генетической конструкцией на основе плазмиды, наработанной в *E. coli*. Было показано, что трансформанты *H. halobium* потеряли свои плазмидные конструкции в связи с расщеплением чужеродной метилированной ДНК в клетках архей [13]. Для преодоления этого препятствия исследователи вынуждены использовать большое количество плазмиды на трансформацию (5 мкг) или использовать штаммы *E. coli* с инактивированными генами метилаз.

Одним из доступных методов получения штамма *E. coli* с инактивированными генами метилаз является делеция данных генов в клетках *E. coli* путем трансдукции. Для осуществления такой замены используют умеренный фаг, который является переносчиком генетической информации из клетки донора в клетку – мишень. Данный подход облегчает и уве-

личивает результативность замены целевого гена на селективный маркер [61].

Исследование эффективности использования штаммов *E. coli* с инактивированными генами метилаз проводилось группой ученых из Мельбурнского университета Holmes M. L, Nuttall S. D. и Dyall– Smith M. L при создании челночных векторов на основе штаммов *E. coli* и *H. volcanii*. В ходе работы были получены следующие результаты (таблица 1) [25].

Таблица 1.

**Влияние метилированной ДНК на трансформацию *H. volcanii*
плазмидой pMDS1**

Источник плазмидной ДНК	Генотип метилирования*	Величина трансформируемости клеток <i>H. volcanii</i> Nov ^r (трансформанты/мкг)
<i>E. coli</i> ➤ JM101 ➤ JP3477 ➤ JM110	<i>dam</i> ⁺ <i>dcm</i> ⁺	2,5*10 ²
	<i>dam</i> ⁻ <i>dcm</i> ⁺	3*10 ⁵
	<i>dam</i> ⁻ <i>dcm</i> ⁻	5*10 ⁵
<i>H. volcanii</i> WFD11		10 ⁶

* *dam*⁺, содержащий метилазу, которая реализует метилирование по последовательности GA^mTC; *dcm*⁺ штамм метилированный по аденину в последовательности CC^m($\frac{A}{T}$)GG.

На основании полученных данных было установлено, что рестрикционный барьер, влияющий на трансформирующую способность, обусловлен активностью Dam метилазы. Применение неметилированной плазмиды позволило увеличить частоту трансформации клеток *H. volcanii* на три порядка по сравнению с клетками, трансформированными метилированной плазмидой.

Выводы по первой главе

Белки семейства Lsm представлены во всех трех доменах жизни (эукариоты, бактерии и археи) и обладают структурной схожестью. Однако функционально данные белки различаются, причем роль архейных белков SmAP в клетке на данный момент слабо изучена. В лабораторной практике

для изучения архейных белков SmAP используют клетки *H. salinarum* – модельный объект, сочетающий в себе структурно-функциональные признаки бактериальных и эукариотических клеток. Для определения влияния отсутствия белка SmAP на синтез других белков в клетках *H. salinarum in vivo* было решено применить методы инактивации гена SmAP белка посредством делеции гена, руководствуясь успешным опытом по делетированию генов в клетках галофильных архей, описанному в литературе.

ГЛАВА 2 ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ *H. SALINARUM* С ДЕЛЕТИРОВАННЫМ ГЕНОМ БЕЛКА SmAP

2.1 Получение генетической конструкции для делеции гена белка SmAP из *H. salinarum*

2.1.1 Оптимизация условий ПЦР для наработки фланкирующих участков гена белка SmAP из *H. salinarum*

Для осуществления делеции гена белка SmAP генетическая конструкция должна иметь фрагмент, содержащий окаймляющие участки гена SmAP. Данный фрагмент был наработан в две стадии (рис. 14). Фланкирующие участки гена SmAP белка были наработаны с геномной ДНК клеток *H. salinarum* (приложение 4), а затем полученные участки выступали в качестве матрицы для синтеза целевого фрагмента величиной 3051 пар оснований.

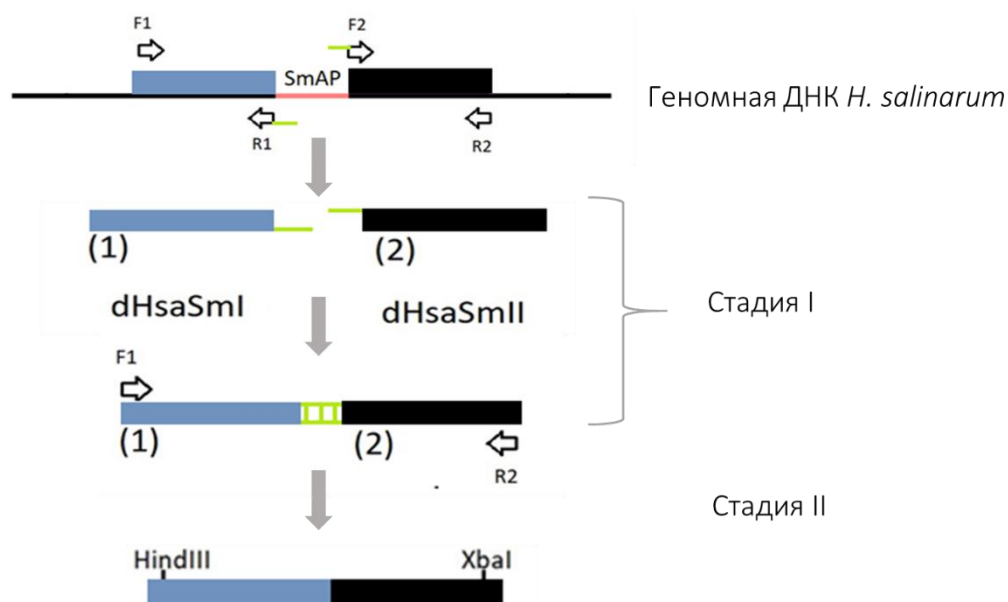


Рис. 14 Схема получения ПЦР целевого фрагмента (dHsaSm), содержащего нуклеотидные последовательности, окаймляющие ген белка SmAP в геноме *H. salinarum*

Для наработки целевого фрагмента были сконструированы олигонуклеотидные праймеры: F_HindIII, R_HsaI, F_HsaII, R_XbaI (таблица 11, приложение 4).

Праймеры R_HsaI, F_HsaII имели области гомологии для объединения двух фрагментов. Кроме того, праймеры F_HindIII и R_XbaI на 5'-конце содержали сайты для ферментов эндонуклеаз рестрикции HindIII и XbaI, для последующей вставки полученной нуклеотидной конструкции в плазмидный вектор pNXB.

Поскольку геномная ДНК *H. salinarum* sp. R1 является GC-богатой матрицей, возникли трудности с наработкой фрагментов dHsaSmI, dHsaSmII, и целевого участка в 3 т.п.о. Большое количество GC-пар в составе полинуклеотидной цепи обуславливает тугоплавкость матрицы, влияет на формирование вторичных структур, в связи с самокоплементарностью участков цепи и, как следствие, препятствует отжигу праймеров и способствует образованию фрагментов меньшей длины.

Для повышения выхода целевого продукта был проведен подбор концентрации $MgSO_4$, необходимый для образования стабильных комплексов с матрицей и повышение ее температуры плавления. Нами были опробованы следующие концентрации $MgSO_4$: 2 мМ, 4 мМ, 6 мМ, избыточная концентрация – больше 10 мМ. Однако, данная добавка не повлияла на выход продукта (рис.15).

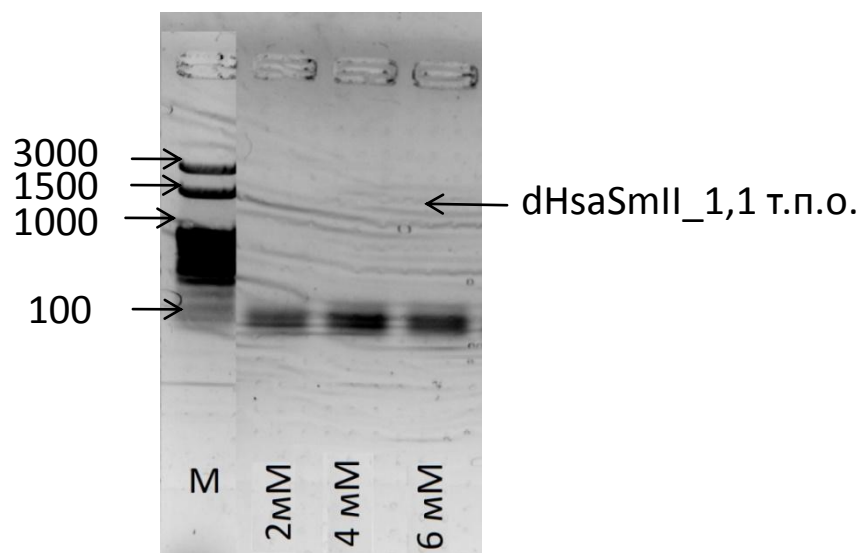


Рис. 15 Электрофореграмма результатов ПЦР с праймеров F_HsaII, R_XbaI с градиентом концентрации ионов магния в 1% агарозном геле: концентрация ионов Mg^{2+} (2 мМ, 4 мМ, 6 мМ); М – маркер молекулярного веса «SibEnzyme 100 bp+1.5Kb +3Kb»

Для решения проблем, связанных с GC- богатой матрицей, мы использовали добавку, ингибирующую спаривание отдельных молекул ДНК. В качестве такого стабилизатора, нами был использован диметилсульфоксид (ДМСО), в разных концентрациях (1%, 3%, 5%, 8%) (рис.16). Наиболее эффективной концентрацией ДМСО оказалось 5%, о чём можно судить исходя из электрофореграммы продуктов ПЦР, представленной на рис 16.

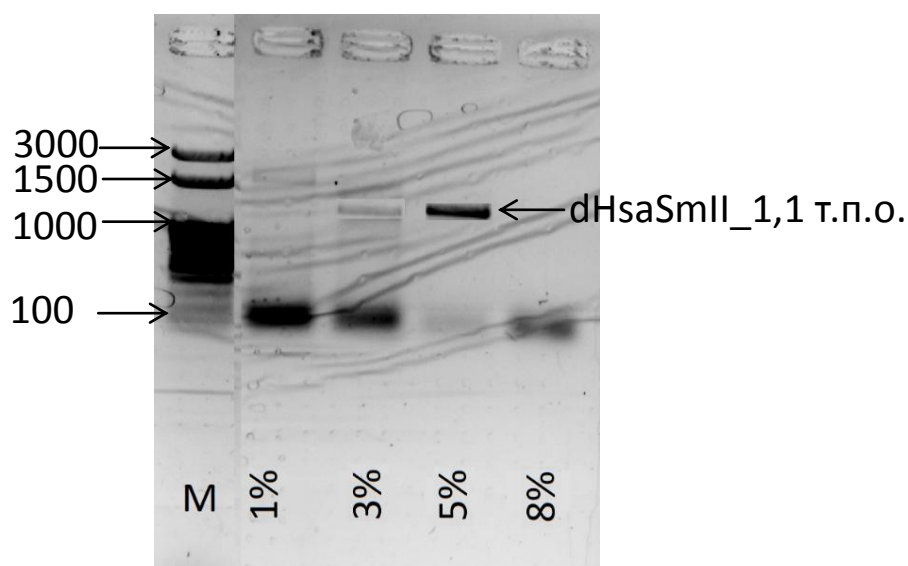


Рис. 16 Электрофореграмма результатов ПЦР с праймеров F_HsaII, R_XbaI в градиенте ДМСО (1%, 3%, 5%, 8%) в 1% агарозном геле. М – маркер молекулярного веса «SibEnzyme 100 bp+1.5Kb +3Kb»

Проблема тугоплавкости нуклеотидной последовательности с большим количеством GC-пар, также была решена с помощью хаотропного реагента – полисорбата 20 (Tween20) – компонент реакционной смеси Premix HS-qPCR (БиоМастер) в концентрации 0,2%, способствующий денатурации матрицы на первых стадиях ПЦР.

Поскольку целевой фрагмент, необходимый для вставки в плазмидный вектор, имел достаточно большую длину ~ 3 т.п.о., для оптимизации условий его выделения нами был осуществлён подбор концентрации дНТФ (0,2 мМ, 0,4 мМ, 0,6 мМ). В результате работ по оптимизации условий ПЦР, целевой фрагмент был наработан (рис. 17) и секвенирован.

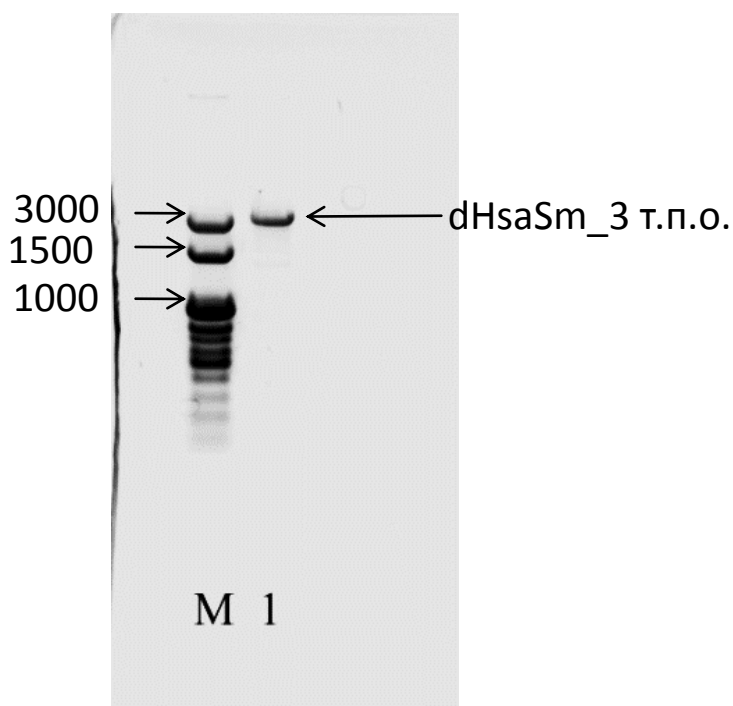


Рис. 17 Электрофореграмма результатов ПЦР с праймеров F_HindIII R_XbaI для целевого фрагмента (dHsaSm), содержащего последовательность генов, окаймляющих ген белка SmAP в геноме *H. salinarum*, в 1% агарозном геле.

M— маркер молекулярного веса «SibEnzyme 100 bp+1.5Kb +3Kb»;

1— целевой фрагмент (dHsaSm)

2.1.2 Получение плазмидной конструкции для делеции гена белка *SmAP* из *H. salinarum*

Генетическая конструкция для осуществления сайт-направленного мутагенеза была получена на основе плазмиды pNXB (рис.18), которая была сконструирована Тарасовым В. Ю. в Группе надмолекулярных белковых структур Института белка РАН, и любезно нам предоставлена. Вышеупомянутая плазмидная конструкция создавалась для делеции генов В-флагелинов [50].

Плазмида содержит в себе бактериальный *ori* ColE1 – сайт начала репликации, селективные маркеры – гены устойчивости к ампициллину – для селекции клеток *E. coli*, содержащих плазмиду, ген устойчивости к новобиоцину – для селекции клеток *H. salinarum*, а также ген β -галактозидазы – фермент, расщепляющий бета-D-галактозид (для селекции с помощью бело-голубого теста, в присутствии X-gal). Однако в данной плазмиде отсутствует архейный репликон. В связи с этим синтез гена, ответственного за устойчивость клеток к новобиоцину и гена архейной β -галактозидазы возможны только после встраивания плазмиды в хромосому *H. salinarum* по сайтам гомологии.

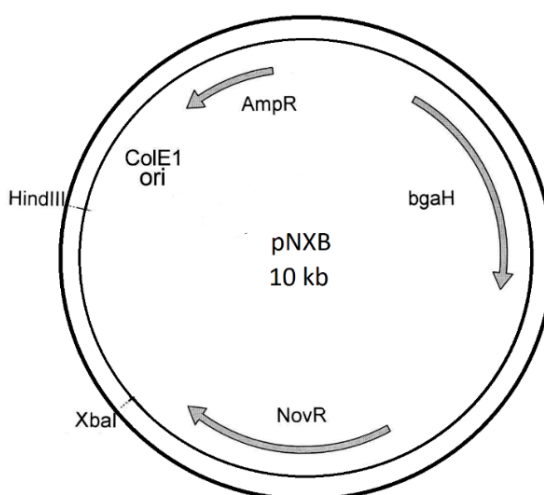


Рис. 18 Плазмида pNXB (сконструирована Тарасовым В. Ю. на основе плазмиды pUC19, где ген *NovR* взят из плазмиды pMDS20 [24], ген *bgaH* из плазмиды pMLH32 [26])

Вектор был получен рестриктазно– лигазным методом с использованием ферментов рестрикции *Hind*III и *Xba*I (Sibenzyme). Плазмида pNXB (рис. 19) и параллельно целевой фрагмент dHsaSm_3kb (рис.20) обрабатывали ферментами *Hind*III и *Xba*I.

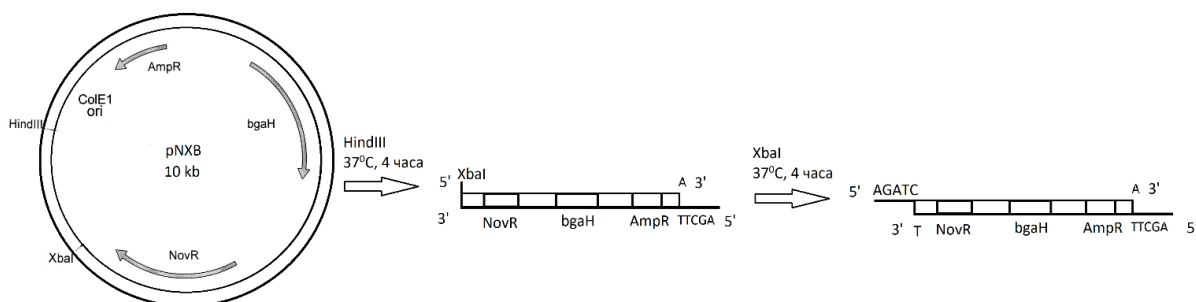


Рис.19 Схема обработки плазмиды pNXB ферментами *Hind*III и *Xba*I по уникальным сайтам рестрикции



Рис. 20 Схема обработки целевого фрагмента dHsaSm_3 т.п.о. ферментами *Hind*III и *Xba*I по уникальным сайтам рестрикции

Далее осуществили лигазную реакцию по методике с образованием целевой генетической конструкции (рис.21). Вставка целевого фрагмента dHsaSm_3kb в плазмиду pNXB проверялась методом ПЦР с использованием праймеров Check_dF и Check_dR (приложение 4, таблица 11).

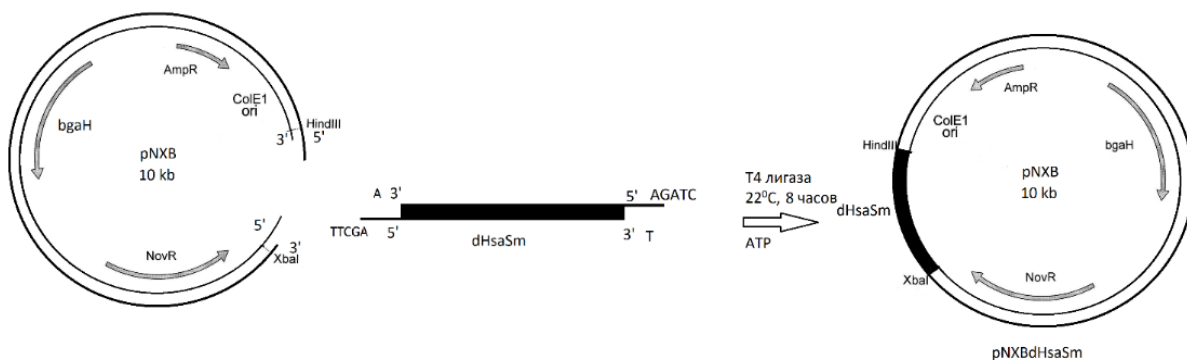


Рис. 21 Схема лигирования вектора pNXB и целевого фрагмента dHsaSm_3 т.п.о. по «липким» концам

Плазмида была наработана в клетках *E. coli XL1(Blue)* путём трансформации лигазной смесью (приложение 10, 11). Методика выделения плазмиды описана в приложении 6 (рис.22).

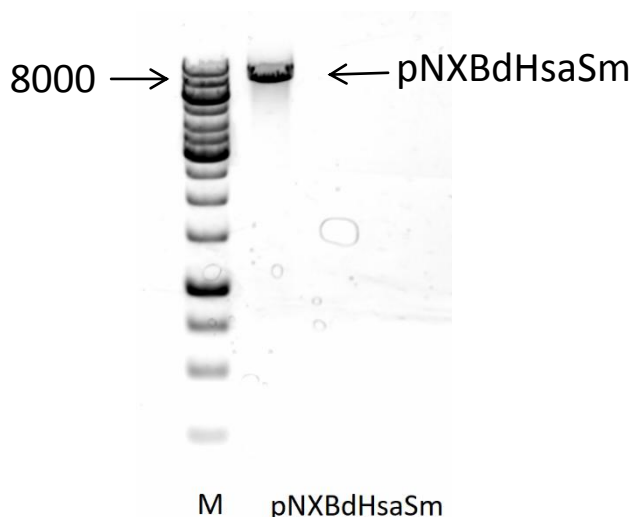


Рис. 22 Электрофореграмма плазмиды pNXBdSmAP, полученной в результате лигирования плазмиды; М – маркер молекулярного веса «БиолЛабМикс Sky-High»; pNXBdHsaSm – плазмида pNXB со вставкой фрагмента гена белка SmAP из *H. salinarum*

2.2. Получение штамма *dam*⁻ *E. coli XL* для наработки плазмиды pNXBdHsaSm для последующей трансформации клеток *H. salinarum*

Как было отмечено в главе 1, п. 1.2, метилирование ДНК в клетках *E. coli* приводят к снижению трансформирующей способности галофильных архей, причем больший вклад вносит метилирование по аденину *dam*-метилазой. Для предотвращения этой проблемы нами получен штамм *E. coli XL (Blue)*, с делецией гена *dam*-метилазы.

2.2.1 Оптимизация условий ПЦР для наработки гена устойчивости к канамицину

Ген устойчивости к канамицину, необходимый для осуществления замены в хромосомной ДНК *E. coli*, был наработан методом ПЦР с геном-

ной ДНК штамма клеток *E. coli dexur::kan* (приложение 4) с использованием праймеров F_km_dam, R_km_dam (приложение 4, таблица 11) имеющих навеску в 40 п.о. для осуществления гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* (рис. 23):

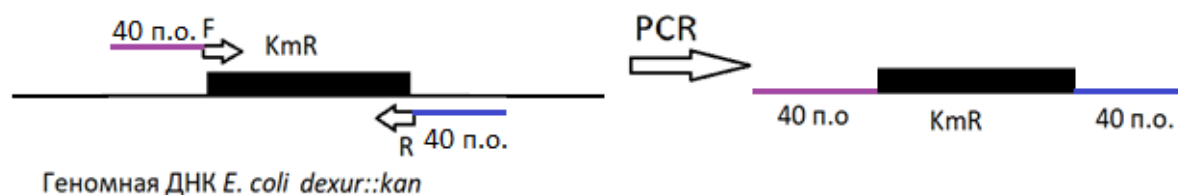


Рис.23 Схема наработки фрагмента гена устойчивости к канамицину с геномной ДНК штамма клеток *E. coli dexur::kan*

Поскольку праймеры, использованные для наработки фрагмента имели длину 60 п.о., что повышает вероятность образования вторичных структур – шпилек и димеризации, возникали проблемы с наработкой целевого фрагмента. Нами была проведена оптимизация условий для повышения выхода продукта амплификации.

Для начала подбиралась оптимальная температура отжига праймера – проведение ПЦР (приложение 4) в градиенте температур от 55°C – 65°C. Затем использовали добавку, ингибирующую образование вторичных структур в молекуле ДНК. В этом качестве использовали ДМСО в концентрации 5%. Данная концентрация была выбрана как самая эффективная на основе предыдущего опыта наработки фрагмента, необходимого для осуществления делеции белка SmAP. Исходя из результатов ПЦР была выявлена оптимальная температура отжига праймеров, которая составила 61°C (рис. 24).

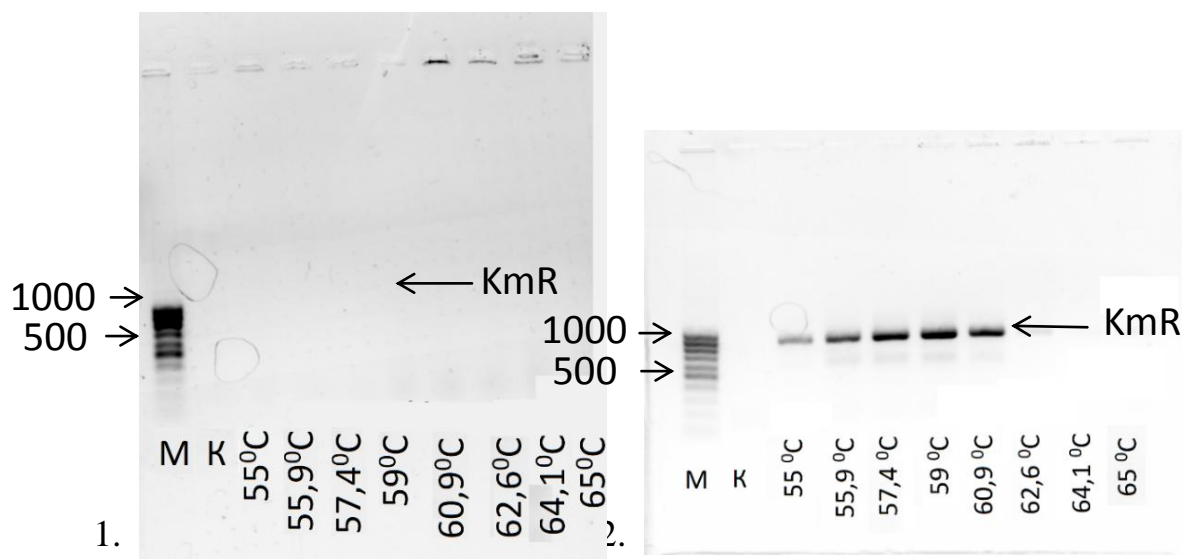


Рис.24 Электрофореграмма результатов ПЦР в градиенте температур 55°C – 65°C в 1% агарозном геле. (а) Без добавления ДМСО. (б) В присутствии 5 % ДМСО.

М – маркер молекулярного веса «БиоЛабМикс Step 100»

К – контроль, ПЦР смесь без добавления матрицы

Далее наработали ПЦР фрагмент гена устойчивости к канамицину в препаративных количествах с добавлением 5% ДМСО и температурой отжига праймеров 61°C (рис. 25) (приложение 4). Полученный фрагмент был выделен и очищен (приложение б).

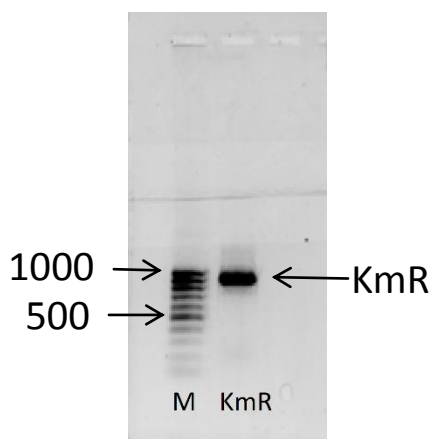


Рис.25 Электрофореграмма гена устойчивости к канамицину после оптимизации условий.

М – маркер молекулярного веса «БиоЛабМикс Step 100»; KmR – ген устойчивости к канамицину

2.2.2. Осуществление замены в хромосомной ДНК *E. coli* NM300 с помощью метода «recombineering»

Линейный фрагмент, содержащий ген устойчивости к канамицину и область гомологии в 40 п.о., использован для трансформации клеток *E. coli* NM300. Данный штамм характеризуется наличием в хромосоме генов фага лямбда, ответственных за синтез белков Echo, Gam, Beta, находящихся под контролем термочувствительного репрессора cI. Замена осуществлялась посредством гомологичной рекомбинации в результате индукции белков Echo, Gam, Beta под действием повышения температуры до 42°C (рис.26).

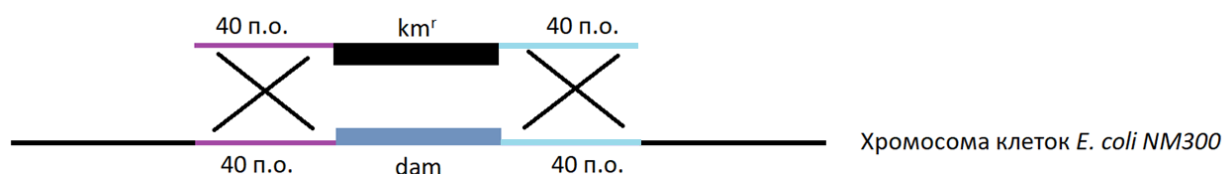


Рис. 26 Схема замены в хромосомной ДНК клеток *E. coli* NM300 посредством гомологичной рекомбинации

Результаты вставки фрагмента гена устойчивости к канамицину были проверены с помощью ПЦР (рис.27). Для этого были использованы единичные колонии клеток *E. coli* NM300, выступающие в качестве матрицы и проверочные праймеры F_check_dam, R_check_dam (приложение 4, таблица 11).

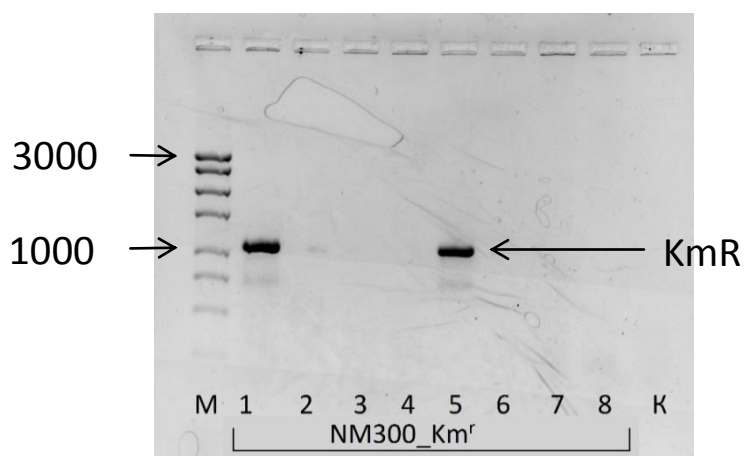


Рис. 27 Электрофореграмма детекции результата замены гена *dam* метилазы на ген устойчивости к канамицину в хромосомной ДНК штамма клеток *E. coli* NM300 М – маркер молекулярного веса «БиоЛабМикс Start 250»; NM300_Km^r – клетки *E. coli* NM300 со вставкой гена устойчивостью к канамицину (разные колонии); К – контроль – клетки *E. coli* NM300

На основе клеток *E. coli* NM300, содержащих ген устойчивости к канамицину был получен фаголизат (рис. 28) для дальнейшего осуществления фаговой трансдукции клеток *E. coli* XL (Blue) (приложение 15).

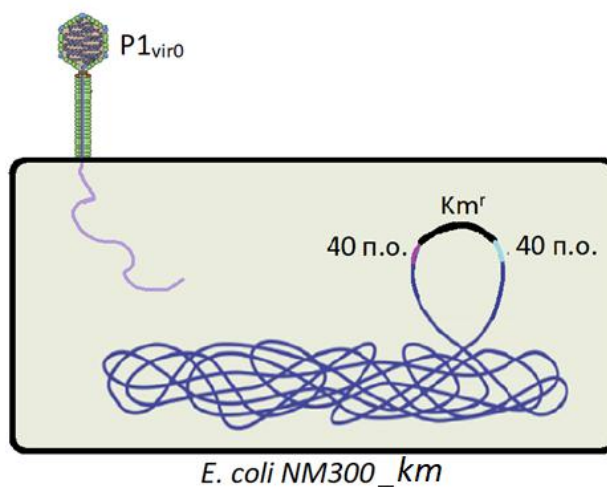


Рис. 28 Схема получения фаголизата на основе клеток *E. coli* NM300, содержащих ген устойчивости к канамицину

2.2.3. Осуществление трансдукции клеток *E. coli* XL(Blue) бактериофагом *P1_{vir}* с геном устойчивости к канамицину

Перенос делеции путём замены гена *dam* на ген устойчивости к канамицину *km* осуществлялся с помощью трансдукции умеренным бактериофагом *P1_{vir}* по методу, описанному в приложении 15 (рис. 29).

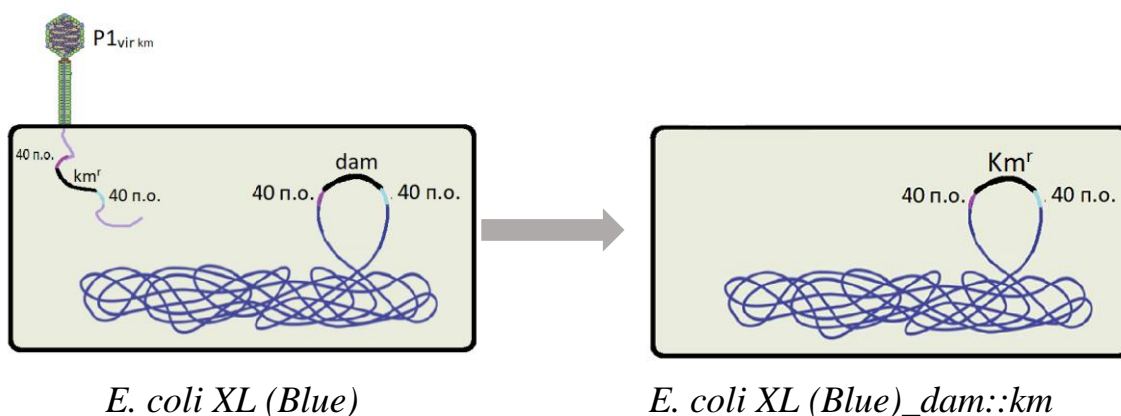


Рис. 29 Схема осуществления фаговой трансдукции клеток *E. coli* XL(Blue)

Наличие вставки гена устойчивости к канамицину в хромосому клеток *E. coli* XL (Blue) детектировали с помощью ПЦР с использованием проверочных праймеров F_check_dam, R_check_dam (рис. 30) (приложе-

ние 4, таблица 11) и единичных колоний клеток *E. coli XL (Blue)_dam::km*. Наличие замены проверяли с помощью секвенирования, полученных ПЦР фрагментов в ЦКП «Геном».

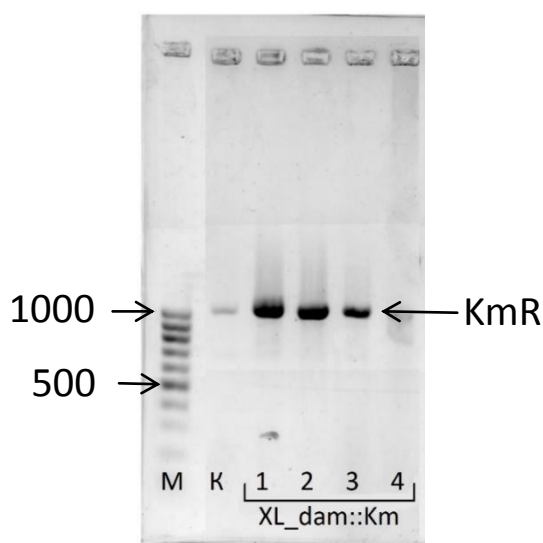


Рис.30 Электрофореграмма результатов ПЦР после трансдукции клеток *E. coli XL(Blue)* бактериофагом P1_{vir}, полученном из клеток NM300, устойчивых к канамицину.

М – маркер молекулярного веса «БиоЛабМикс Step 100»;

К – контроль – клетки *E. coli XL*; XL_{dam::Km} – клетки *E. coli XL* с заменой гена *dam* метилазы на ген устойчивости к канамицину

2.3. Получение штамма *H. salinarum* с делетированным геном белка SmAP

Получение штамма *H. salinarum* с делетированным геном белка SmAP осуществлялось посредством гомологичной рекомбинации методом pop in pop out делеции (рис 11).

Клетки *H. salinarum* трансформировались генетической конструкцией pNXBdHsaSm согласно методике (приложение 12). Особенности строения клеточной оболочки, описанные ранее, а также условия обитания *H. salinarum* при высокой концентрации соли затрудняют использование традиционных для бактерий методов подготовки компетентных клеток для трансформации. Существует два метода, посредством которых возможно внедрение генетического материала в клетки *H. salinarum*: первый, путем образования сферопластов с использованием ПЭГа (приложение 12)

(рис. 31), и второй – метод попеременного замораживания и оттаивания клеток (приложение 13) (рис. 32).

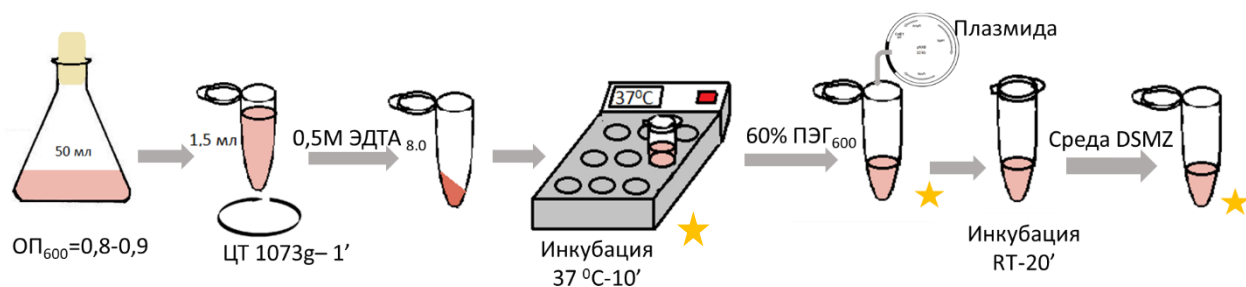


Рис. 31 Схема подготовки компетентных клеток *H. salinarum* для трансформации с использованием ПЭГа

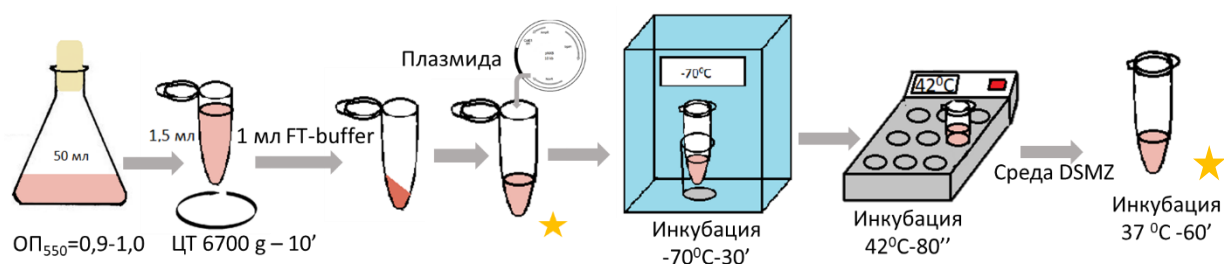


Рис. 32 Схема подготовки компетентных клеток *H. salinarum* для трансформации методом замораживания и оттаивания

Для повышения выживаемости трансформированных клеток *H. salinarum* нами были оптимизированы условия ключевых этапов подготовки компетентных клеток (отмечены на рис. 31 и 32 звездами). Производился подбор времени и температуры инкубации после добавления ЭДТА, в случае методики с использованием ПЭГа, количества вносимого генетического материала (1 мг – 5 мг) в обеих методиках, а также варьировался объем культуральной среды для восстановления клеток на заключительном этапе трансформации. По результатам выживаемости трансформированных клеток *H. salinarum* (рис. 33) предпочтение было отдано методике с использованием ПЭГа. После трансформации плазмидой pNXBdHsaSm клетки были посеяны на агаризованную среду с новобиоцином и X-gal.

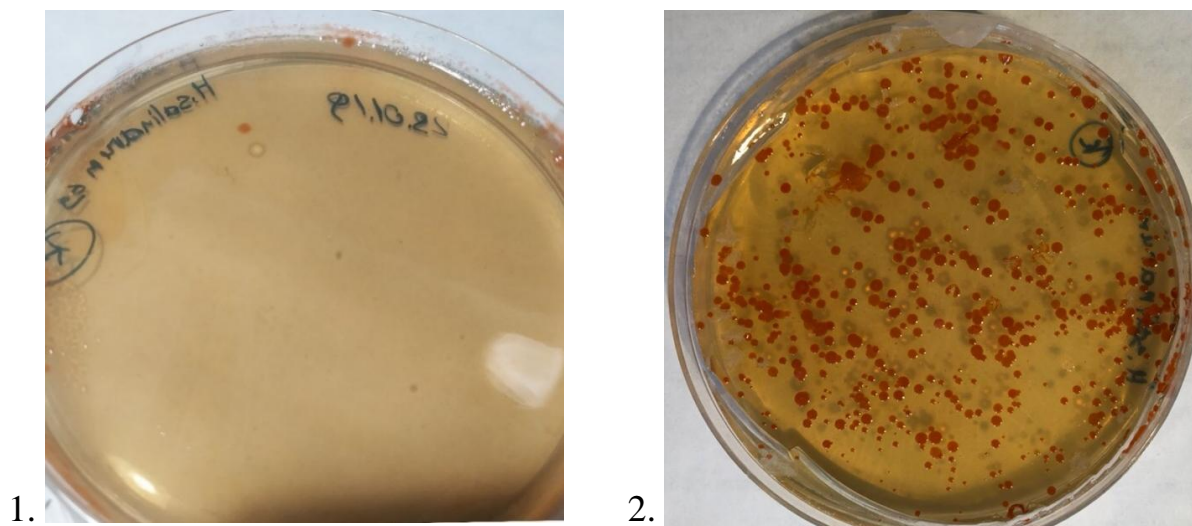


Рис.33 Учет выживаемости клеток *H. salinarum* после трансформации.

(1) До оптимизации условий. (2) После оптимизации условий

В связи с отсутствием архейного репликона в плазмиде pNXBdHsaSm, селектирование трансформированных клеток возможно при условии встраивания генетической конструкции в хромосому клеток *H. salinarum* по механизму гомологичной рекомбинации, согласно схеме, представленной на рисунке 34.

Так как в плазмиде находятся два участка гомологии, то первый акт гомологичной рекомбинации, а именно включение плазмиды в хромосому может произойти с равной вероятностью по одному из сайтов гомологии относительно гена белка SmAP. Наличие гена галофильной β -галактозидазы, обуславливающего появление синей окраски всех колоний клеток в результате ферментативной реакции галофильной β -галактозидазы, является дополнительным маркером, подтверждающим встраивание плазмиды в хромосому.

Путем снятия селективного давления – перенос колоний клеток в 2 – 10 мл культуральной среды без антибиотика, создавалось условие для протекания второго акта гомологичной рекомбинации, результатом которого является элиминирование плазмиды из хромосомы.

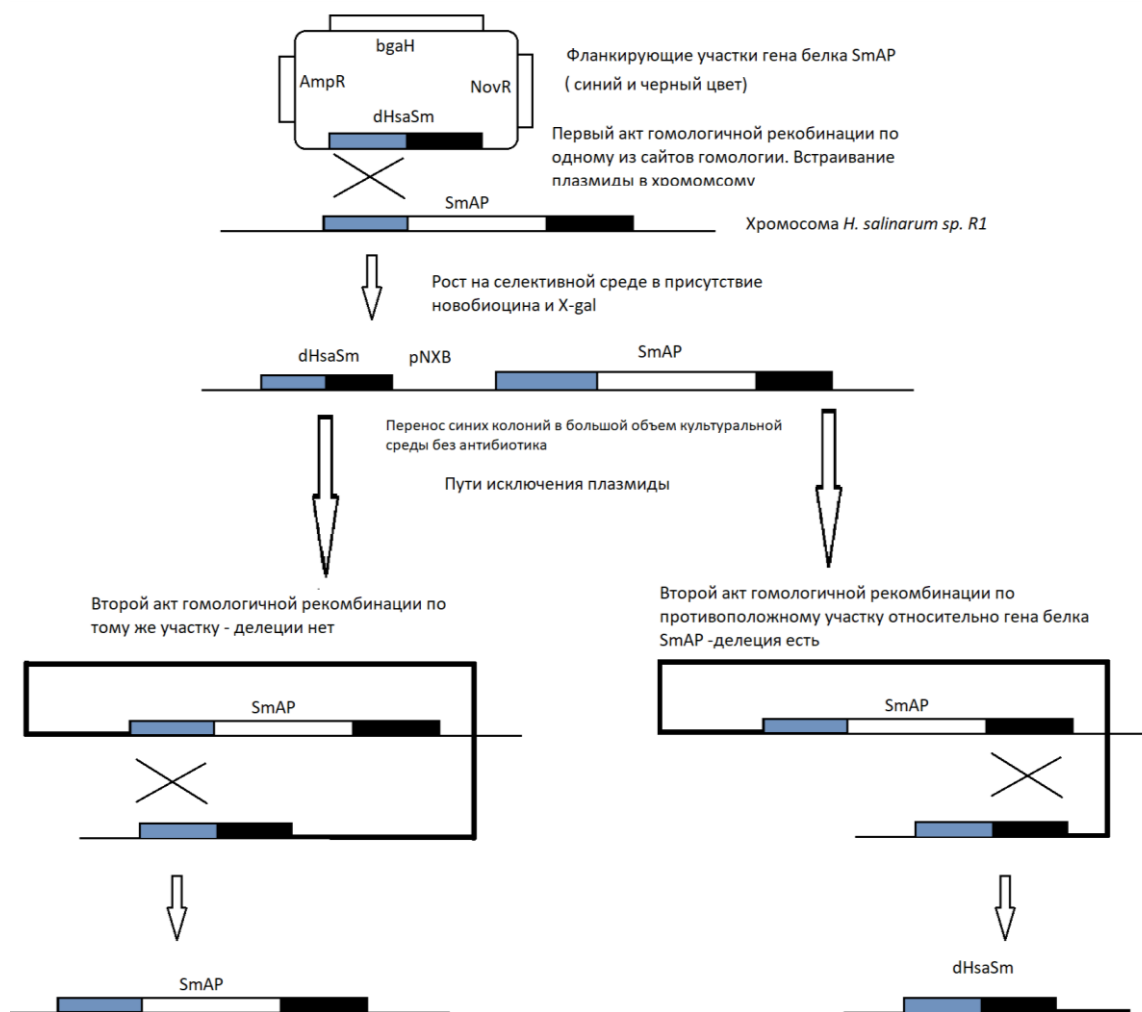
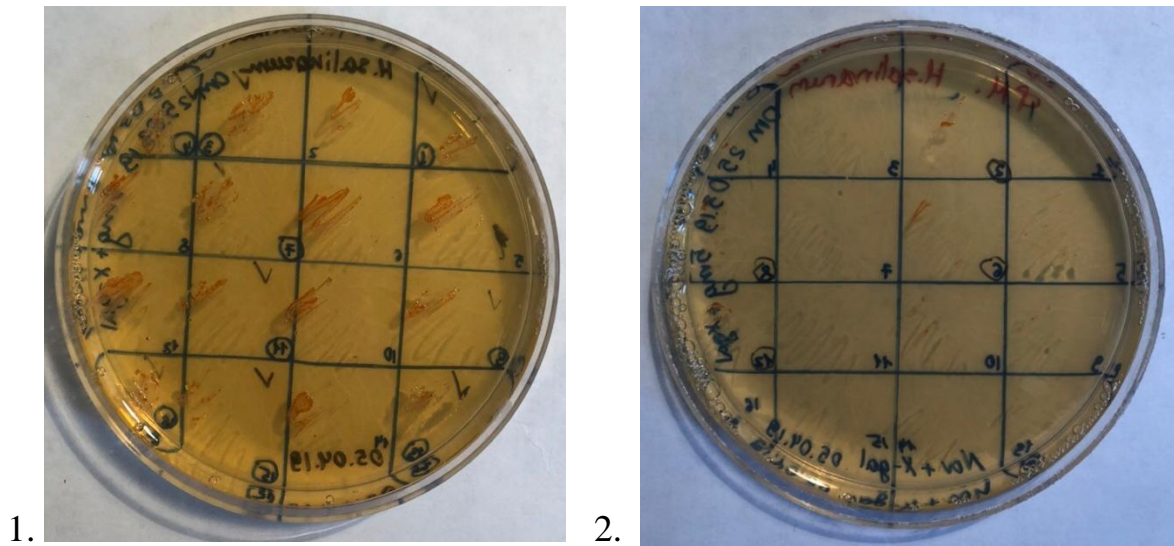


Рис. 34 Схема получения делеции гена белка SmAP *H. salinarum*

Существует два пути исключения плазмиды из геномной ДНК. Первый путь, в случае протекания гомологичной рекомбинации по тому же сайту, что и в первом акте, происходит без делеции гена. При исключении плазмиды путём гомологичной рекомбинации по противоположному встраивания плазмиды в геном *H. salinarum*, гена SmAP, элиминация плазмиды сопровождается захватом гена белка SmAP. Детектирование клеток, в которых произошел второй акт гомологичной рекомбинации, осуществлялось путем высевания клеток на агаризованную среду без селективного маркера, а затем на среду с антибиотиком (рис. 35).



1.

2.

Рис. 35 Селекция клеток, в которых произошел второй акт гомологичной рекомбинации. (1) Клетки на агаризованной среде без антибиотика и X– gal
(2) Клетки на агаризованной среде с антибиотиком и X– gal

Клетки, в которых произошел второй акт гомологичной рекомбинации были проверены на наличие делеции методом ПЦР (приложение 4) с использованием контрольных праймеров Check_dF, Check_dR (рис. 36). Электрофореграмма показала, что нами были получены искомые клетки *H. salinarum* с делецией гена *smar*.

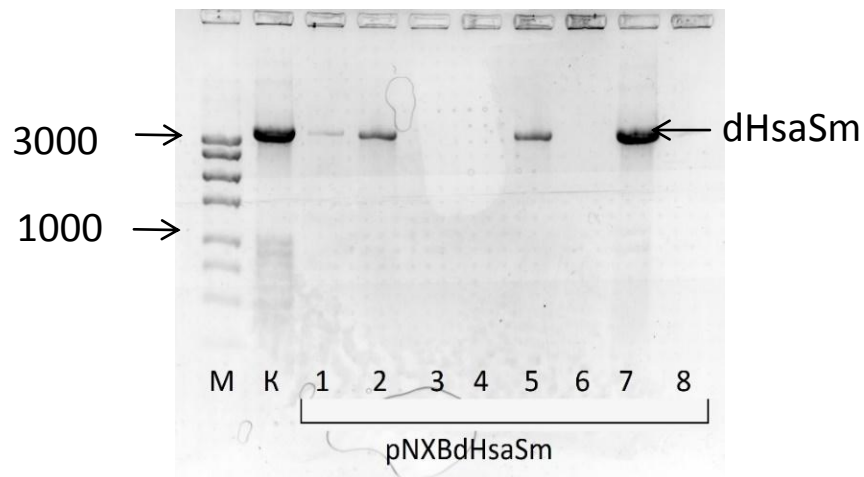


Рис. 36 Электрофореграмма результатов ПЦР с колонии клеток *H. salinarum* после второго акта гомологичной рекомбинации
М – маркер молекулярного веса «БиоЛабМикс Start 250»; К – контроль – клетки *H. salinarum*; 1,2,5,7 pNXBdHsaSm – клетки *H. salinarum* без плазмидной вставки;
3,4,6,8 pNXBdHsaSm – клетки *H. salinarum* с плазмидной вставкой

2.4 Подготовка образцов растворимой фракции белков клеток *H. salinarum* для двумерного электрофореза с целью их дальнейшего протеомного анализа

Влияние делеции гена SmAP белка на экспрессию других белков может быть визуально оценено путем сравнения протеомных карт клеток *H. salinarum* с делецией гена белка SmAP и клеток дикого типа.

Получение протеомных карт осуществлялось с использованием метода двумерного электрофореза в соответствии с протоколом (приложение 17). Образцы растворимой фракции белков клеток *H. salinarum* дикого типа были подготовлены согласно приложению 16. Полученная электрофореграмма (рис. 37) была окрашена флуоресцентным красителем SYPRO Orange по протоколу, предложенному производителем. Длина волны поглощения для этого красителя находится в области 470 нм, а длина волны излучения – 570 нм. SYPRO Orange связывается с оболочкой из молекул SDS, которая формируется при проведении электрофореза белков в ПААГ в денатурирующих условиях.

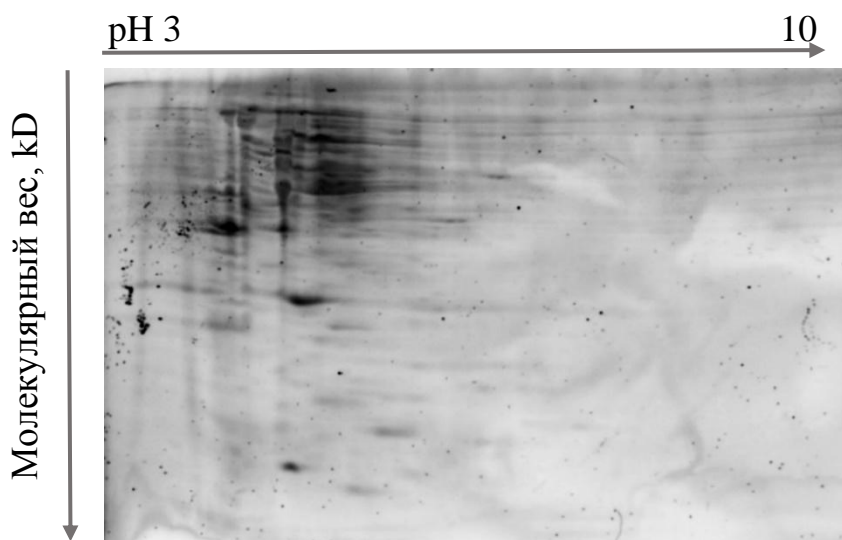


Рис. 37 Электрофореграмма 10 см x 7 см растворимой фракции белков клеток *H. salinarum* до оптимизации условий подготовки образца; краситель SYPRO Orange. 12% ПААГ гель, Bio-Rad Mini Protean II

Для повышения качества протеомных карт нами была проведена оптимизация условий подготовки растворимой фракции белков клеток *H. salinarum*. Каротиноиды, в составе трансмембранного белка бактериородопсина клеточной мембраны *H. salinarum*, являясь низкомолекулярными веществами, обуславливают появление горизонтальных полос на электрофореграмме. Для снижения синтеза пигмента и предотвращения такого эффекта культура клеток *H. salinarum* была выращена в изолированной от света среде на протяжении 4 поколений.

Помимо этого, для полного осаждения клеточного дебриса и полисахаридов, входящих в состав клеточной оболочки, нами была увеличена скорость центрифугирования до 213 000 g. В результате оптимизации условий подготовки растворимой фракции белков клеток *H. salinarum* получена протеомная карта с улучшенным разрешением (рис. 38)

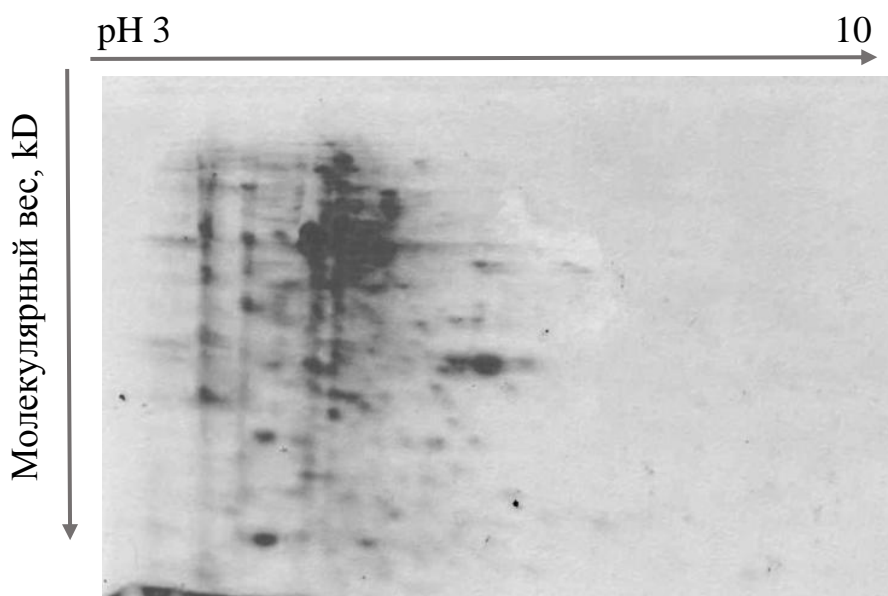


Рис. 38 Электрофореграмма 10 см x 7 см растворимой фракции белков клеток *H. salinarum* после оптимизации условий подготовки образца; краситель SYPRO Orange. 12% ПААГ гель, Bio-Rad Mini Protean II

Растворимая фракция белков *H. salinarum* находится в кислой области рН, что является следствием выживания клеток в условиях повышенной концентрации соли. Поэтому для улучшения разрешения изофокусирования нами были использованы полоски амфолитов первого направления с

диапазоном рН от 3 до 6. Для окраски геля использован более чувствительный флуоресцентный краситель Flamingo (окраска производилась согласно рекомендациям производителя), область поглощения и эмиссии которого находится в области 512 нм и 535 нм соответственно, и гель размером 20 см x 20 см (рис. 39).

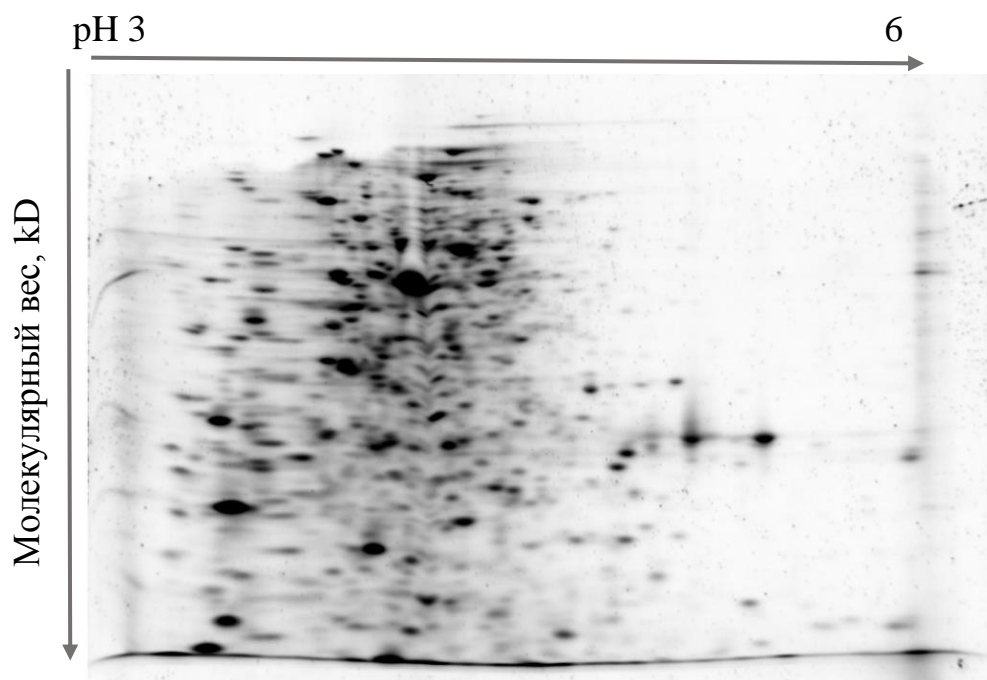


Рис. 39 Электрофореграмма 20 см x 20 см растворимой фракции белков клеток *H. salinarum* после оптимизации условий подготовки образца; краситель Flamingo 12% ПААГ (Protean II XL Cell i12 IEF, BioRad)

В результате работы нам удалось получить клетки *H. salinarum* со встроенной в геном плазмидной конструкцией необходимой для делеции из хромосомы гена белка SmAP. Были получены пригодные для анализа протеомные карты растворимой фракции белков *H. salinarum*. В дальнейшем планируется изучить влияние делеции гена белка SmAP *H. salinarum* на экспрессию белков, с помощью метода двумерного электрофореза, с использованием оптимизированной нами методики получения протеомных карт для клеток *H. salinarum*.

Выводы по второй главе

Нами были оптимизированы условия наработки окаймляющих фрагментов гена белка SmAP из *H. salinarum* для делеции соответствующего гена белка.

1. В ходе работы была создана генетическая конструкция для делеции гена белка SmAP из клеток археи *H. salinarum*.

2. Оптимизированы условия трансформации клеток *H. salinarum* полученной генетической конструкцией.

3. Оптимизированы условия подготовки образцов растворимой фракции белков клеток *H. salinarum* для дальнейшего изучения методом двумерного электрофореза.

ГЛАВА 3 СОДЕРЖАНИЕ, МЕТОДИКА ОРГАНИЗАЦИИ И ПРОВЕДЕНИЕ СЕРИИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ НА ЗАНЯТИЯХ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ У СТУДЕНТОВ ХИМИКО–БИОЛОГИЧЕСКОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ

На занятиях молекулярной биологии необходимо наглядно показать определенные свойства биологических молекул, а также организовать интересную и доступную демонстрацию используемых методов молекулярной биологии и сопряжённые с ними микробиологические и биотехнологические методы.

Оптимизация традиционных методов молекулярной биологии, биохимии и микробиологии, позволяет углубить знания студентов химико–биологической направленности в области изучаемой дисциплины, также способствуют развитию навыков работы с молекулярными объектами и обеспечивает совершенствование навыков построения лабораторного эксперимента, обработки его результатов и формирование умозаключений на основе косвенных результатов.

Пояснительная записка

Изучение свойств заряженных биомолекул и методы их выделения и детекции предусмотрено в курсе молекулярной биологии. Серия лабораторных работ, касающаяся данной тематики, рекомендуется для проведения у студентов химико-биологической направленности на 9 семестре учебного процесса.

Данные лабораторные работы имеют междисциплинарный характер, поскольку рассматриваются вопросы молекулярной биологии, биохимии, а также применяются знания микробиологии.

Основной целью данных лабораторной работы является всестороннее развитие личности, создание таких условий, при которых возможны реализация исследовательских навыков студентов, обеспечение углубле-

ния знаний обучающихся по молекулярной биологии, биохимии, а также совершенствуются навыки микробиологии.

Основными задачами данной лабораторной работы являются:

- Систематизация и углубление знаний студентов о свойствах заряженных биомолекул;
- Умение работать с источниками информации;
- Усовершенствуются практические навыки проведения исследования биологических объектов, что позволяет осуществить преемственность содержания данной лабораторной работы с другими предметами — биохимией и микробиологии;
- Расширить знания по работе с бактериями – культивирование, выделение генетического материала и подготовка образцов для электрофоретического разделения заряженных биомолекул;
- Развить навыки лабораторного эксперимента, обработки, полученных результатов, а также навыки формирования выводов на основе косвенных данных.

Содержание лабораторной работы

1. Подготовка. Основное содержание работы на этой стадии – определение цели и задач работы.

2. Планирование.

- Определение источников информации;
- Определение способов сбора и анализа информации;

3. Основной этап. Стадия теоретического осмысления практической части работы. Студенты обсуждают с преподавателем ключевые моменты работы и получают необходимые указания. Основные инструменты исследования: наблюдения, эксперименты.

4. Результаты и выводы. Студенты анализируют теоретическую информацию и полученные экспериментальные данные. Оформляют результаты проведенной лабораторной работы и формулируют выводы.

Серия лабораторных работ для студентов химико-биологической направленности

Цель работы: отработать методику выделения и детектирования геномной ДНК из клеток *Bacillus sp.* (Сенной палочки)

Задачи:

1. Изучить теоретические основы электрофоретического разделения нуклеиновых кислот в агарозном геле.
2. Отработать методику культивирования клеток *Bacillus sp.*
3. Освоить методы выделения геномной ДНК из клеток *Bacillus sp.*
4. Провести детектирование геномной ДНК *Bacillus sp.*

Вопросы для самоподготовки.

1. Строение нуклеиновых кислот и их классификация.
2. Общие принципы разделения заряженных молекул под действием электрического тока.
3. Особенности строения грамположительных бактерий.

1. Теоретические основы метода электрофоретического разделения нуклеиновых кислот в агарозном геле.

Метод электрофоретического разделения заряженных биополимеров получил широкое практическое применение в исследовании белков и нуклеиновых кислот [4]. В основе метода лежит физический процесс миграции заряженных частиц под действием электрического поля. Вследствие того, что многие биологические молекулы: аминокислоты, пептиды, белки, нуклеиновые кислоты и нуклеотиды, обладают ионизированными группами и поэтому существуют в растворе как заряженные частицы в виде катиона или аниона. [6]. И в зависимости от заряда молекулы движутся либо к катоду (катионы), либо к аноду (аниону). Только в узком диапазоне рН, который индивидуален для каждого образца, молекула представлена в виде цвиттер-иона и ее суммарный заряд молекулы равен нулю, такое значение рН называется изоэлектрической точкой (pI).

Физические силы, действующие на молекулу

Под действием эклектического поля молекула в соответствие со своим суммарным зарядом движется в направлении катода или анода, при этом на образец будет действовать сила ускорения (1).

$$F = \frac{E}{d} * q, \quad (1)$$

где E – потенциал, В;
 d – расстояние между электродами, м;
 q – величина заряд молекулы, Кл.

Так как молекула движется в среде, имеющей плотность, то на нее действует сила сопротивления (трения), которая зависит от размера молекулы, заряда и вязкости среды, и описывается уравнением Стокса (2):

$$f = 6\pi r\eta V, \quad (2)$$

гд r – радиус сферической молекулы
 η – вязкость среды
 V – скорость движения молекулы

Сила трения ограничивает скорость движения молекул, поэтому прекращается ускорение и при неизменных параметрах напряженности электрического поля молекулы переходят к равномерному движению. Это состояние описывается уравнением (3):

$$\frac{E}{d} * q = 6\pi r\eta V \quad (3.1)$$

В результате преобразования уравнения 3.1, получаем значение для скорости движения молекулы в поле электрического тока (3.2):

$$V = \frac{Eq}{6\pi r\eta d} \quad (3.2)$$

Однако, в реальности молекула далека от идеальной геометрической фигуры (шар), и это уравнение определения скорости движения заряженной молекулы (3.2) есть лишь приближение к реальному значению.

Электрический ток, действующий на заряженную молекулу, проводится ионами буфера и в небольшой степени – ионами образца. Связь между силой тока, напряжением и сопротивлением описывается законом Ома (4.1):

$$R = \frac{U}{I}, \quad (4.1)$$

где R – сопротивление, Ом;
 U – напряжение, В;
 I – сила тока, А.

Путем преобразований уравнения (4.1) получаем выражение для силы тока (4.2):

$$I = \frac{U}{R} \quad (4.2)$$

Чтобы ускорить электрофоретическое разделение необходимо увеличить напряжение, что повысит силу тока. Но при этом может произойти увеличение выделения тепла, так как, согласно уравнению (5):

$$W = I * U = I^2 * R, \quad (5)$$

где W – мощность, Вт.

Увеличение напряжения приводит к повышению силы тока в квадрате, что ведет к возрастанию мощности и генерации избыточного тепла, которое влияет на процесс разделения заряженных молекул:

1. Конвекционные потоки;
2. Диффузия образца;
3. Денатурация образца;

4. Уменьшение вязкости буфера и снижение сопротивления;

Оборудование и материалы

Оборудование, необходимое для проведения электрофореза состоит из двух блоков: блок питания (рис. 40) и электрофорезная камера (рис. 41).



Рис. 40 Источник тока

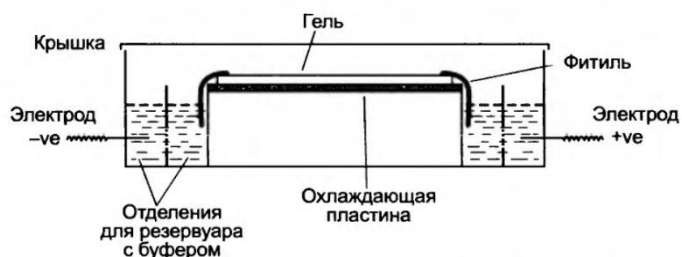


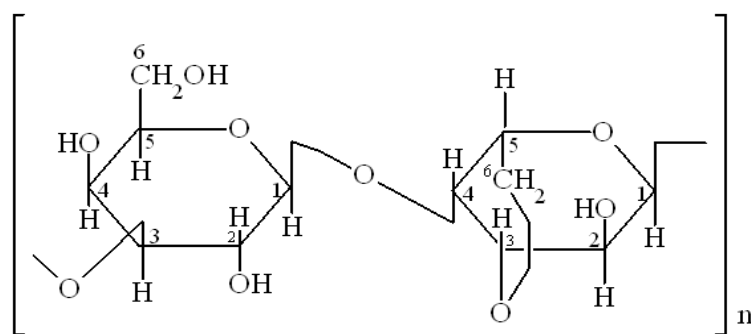
Рис. 41 Электрофорезная камера [6]

Компоненты электрофорезной камеры:

1. Матрица (гель)

Для разделения нуклеиновых кислот в основном используется матрица на основе агарозы, это обусловлено тем, что величина заряда у молекул нуклеиновых кислот одинаковая – отрицательно заряженная, и разделение молекулы будет происходить по размерам.

Агароза – линейный полисахарид $M_r = 12000$, состоящий из повторяющихся звеньев β -D-галактопиранозы и 3,6-ангидро- α -L-галактопиранозы (рис. 42). Трехмерная сетка образуется путем связывания пучков нитей водородными связями [4].



β -D-галактопираноза

3,6-ангидро- α -L-галактопираноза

Рис. 42 Структурная формула агарозы

Скорость миграции молекул нуклеиновых кислот в агарозном геле зависит от размера пор. Зависимость размера пор от концентрации агарозы, приведена в таблице 2.

Таблица 2

Рекомендуемая концентрация агарозного геля для разделения молекул ДНК

Концентрация агарозы, [%]	Диапазон размеров ДНК, [п.о.]
0,75	10 000 – 15 000
1,00	500 – 10 000
1,25	300 – 5 000
1,50	200 – 4 000
2,00	100 – 2 500
2,50	50 – 1 000

2. Буфер для электрофореза

Помимо размера пор агарозного геля и размера молекулы на подвижность ДНК влияет состав и ионная сила буфера для электрофореза. При низкой ионной силе, перемещение молекул ДНК происходит медленно, а высокая очень эффективна, и образуется значительное количество тепла, что может повлиять на расплавление геля и денатурацию образца. В лабораторной практике, чаще всего, используется 1x TAE буфер (трис-ацетатный буфер) (таблица 3).

Таблица 3

Приготовление 50x TAE буфера pH = 7,6

Компонент	Количество для приготовления 100 ml раствора
Трис основание	24,22 г
ЭДТА	1,862 г
CH ₃ COOH (ледяная)	8,96 мл
H ₂ O	73,3 г

3. Загрузочный буфер

Для нанесения образца в агарозный гель, предварительно его смешивают с загрузочным буфером (таблица 4). Это необходимо для увеличения плотности образца и, как следствие, точного попадания ДНК в лунку.

Приготовление бх загрузочного буфера

Компонент	Количество для приготовления 10 мл раствора
Бромфеноловый синий 0,25 %	25 мг
Сахароза 40%	4 г
H_2O	довести до 10 мл

4. Количество матрицы

Минимальное количество ДНК на лунку составляет 10 нг. Максимальное количество ДНК на лунку составляет примерно 100 нг.

2. Выведение штаммов бактерий *Сенной палочки (Bacillus sp.)*.

Сенная палочка (*Bacillus sp.*) является подвижной грамположительной бактерией, относящейся к роду *Bacillus*. Данный организм является удобным для культивирования, поскольку используется минимум оборудования и реактивов. Также в структуре данной бактерии отсутствует липополисахаридный слой на поверхности цитоплазматической мембраны (характерно для грамотрицательных бактерий – *E. coli*), что позволяет лизировать клетки с меньшим количеством реактивов [2].

Ход работы

1. Культуру сенной палочки получают из сена (приложение 19). Для этого в коническую плоскодонную колбу на 500 мл, поместить 30 г сухого сена и добавить 200 мл воды. Закрыть горлышко фольгой и простерилизовать в пламени спиртовки (рис. 43).

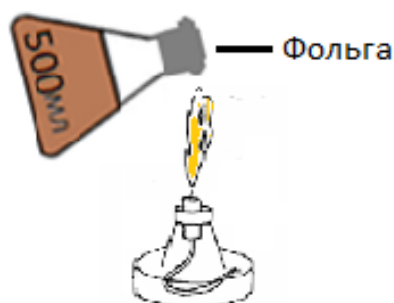


Рис. 43 Стерилизация колбы с культуральной средой в пламени спиртовки

2. Реакционную смесь кипятить 30 минут на электрической плитке, это необходимо, чтобы простерилизовать всю реакционную смесь, и минимизировать вероятность культивирования другого штамма.

3. Охладить колбу (до 30 – 35°C).

4. Далее проводить фильтрование культуральной среды в стерильной атмосфере в колбу объемом 100мл, согласно рисунку 44.

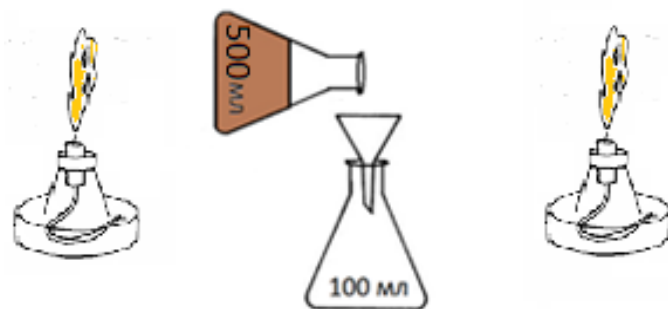


Рис. 44 Фильтрация культуральной среды в стерильной атмосфере

5. Поместить колбу в термостат при 37°C на 5 суток.

6. На пятые сутки на поверхности раствора появляется белка пленка, содержащая штаммы *B. sp.*

7. Приготовление агаризованной среды для ктеток *B. sp.* Для этого используют профильтрованный в горячем виде отвар из 100 г белой фасоли, приготовленной в 1 литр воды (таблица 5).

Таблица 5

Приготовление питательной среды на 2%

Компонент	Количество компонента		
	V=100 мл	V=500 мл	V=1000 мл
Отвар фасоли			
Агар	2 г	10 г	20 г

Затем добавляют агар, в зависимости от необходимого объема и нагревают реакционную смесь на плитке до полного растворения агара. Далее расплавленный агар (≈ 30 мл) заливают в стерильные чашки Петри в стерильной атмосфере (рис. 45).

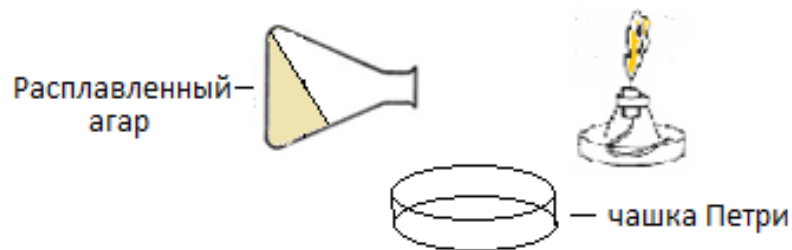


Рис. 45 Приготовление чашек Петри с агаризованной средой для клеток *B. sp.* в стерильной атмосфере

8. Получение изолированных колоний клеток *B. sp.* Пленку бактерий, полученных в пункте 6, рассеять на агаризованную среду, приготовленную в пункте 7. Перед тем, как рассеять колонии клеток *B. sp.* необходимо высушить чашку в термостате при 37°C 20 – 30 минут. после этого 1 мл культуры распределить по высушенной чашке Петри и инкубировать агаром вниз (рис. 46) в термостате при 37°C до появления белых изолированных колоний клеток *B. sp.*

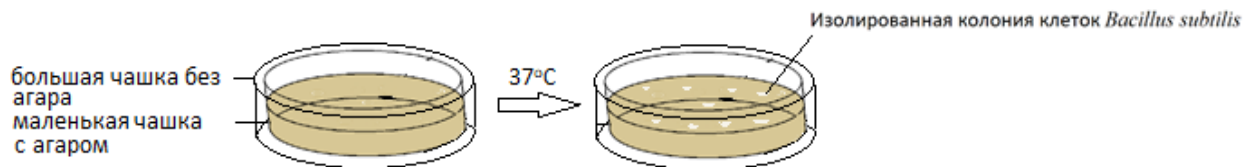


Рис. 46 Получение изолированных колоний клеток *B. sp.*

9. Приготовление ночной культуры клеток *B. sp.* Изолированную колонию клеток *B. sp.*, полученную в пункте 8, перенести с помощью пипетки в 10 мл питательной среды и инкубировать при 37°C более 8 часов (рис.47)



Рис. 47 Приготовление ночной культуры клеток *B. sp.*

3. Выделение геномной ДНК из клеток *Bacillus sp.*

Геном *Bacillus sp.* представлен одной кольцевой хромосомой, размер которой составляет 4,2 миллион пар оснований. (хромосома с NCBI)

Выделение геномной ДНК (приложение 20) проводилось согласно методике Сэмбрука (1989), с модификациями [45].

Ход работы

Осаждение клеток

2 мл ночной культуры клеток *B. sp* перенести в пробирку фирмы Eppendorf, затем центрифугировать 10 минут при 12 000 об/мин (12 000 rpm). Слить супернатант (над осадочная жидкость). При необходимости повторить осаждение.

Разрушение клеточной оболочки

1. К осадку клеток внести 25– 30 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 30 минут при 37 °С, суспензия должна стать прозрачной и коричневой.

2. Перенести клетки в водяную баню (картинка) и внести 400 мкл свежеприготовленного раствора смеси (1:1) 0,2 М NaOH и 1 % ДСД (додецилсульфат натрия). Осторожно перемешать переворачивая пробирку до получения прозрачного вязкого раствора. На этом этапе происходит лизис клеток и геномная ДНК попадает в раствор в раскрученном состоянии, обуславливая вязкость раствора.

4. Детектирование геномной ДНК *Bacillus sp.*

Ход работы

1. Подготовка образцов

1. Разведение 50x ТАЕ буфера (таблица 3) до 1x для заполнения электрофорезной камеры и приготовления агарозы (таблица 6).

Таблица 6

Приготовление 1х ТАЕ буфера

Компонент	Количество вносимого компонента		
	50х ТАЕ	2 мл	10 мл
H_2O	98 мл	490 мл	980 мл
Суммарный объем смеси	V=100 мл	V=500 мл	V=1000 мл

2. Взвесить соответствующее количество агарозы исходя из таблицы 2 (в данном случае 1%) и добавить ее к определенному объему 1х ТАЕ буфера (масс– массовое соотношение) (таблица 7).

Таблица 7

Приготовление 1% агарозы

Компонент	Количество вносимого компонента	
	Агароза	1 г
1х ТАЕ буфер	100 г	200 г
Суммарный объем смеси	V=100 мл	V=200 мл

3. Нагреть агарозу на плитке (емкость с агарозой должна быть неплотно закрыта) до расплавления. Охладить до 50°C.

4. Добавить 5 мкл бромистого этидия к 50 мл агарозы на 1х ТАЕ буфере.

5. Залить гель на подложку для геля, так, чтобы образовавшийся гель был 3– 5 мм. Вставить гребенку и оставить застывать (\approx 20 минут).

6. После застывания аккуратно удалить гребенку и вместе с подложкой перенести гель в электрофорезную камеру. Залить 1х ТАЕ буфер в камеру, так, чтобы буфер покрывал гель на 2– 3 мм.

7. Смешать образец 5 мкл с загрузочным буфером, так, чтобы конечная концентрация буфера была 1х (таблица 8).

Приготовление 1х загрузочного буфера с образцом (ДНК *V. sp*)

Компонент	Количество вносимого компонента
Образец (ДНК <i>V. sp</i>)	5 мкл
6х загрузочный буфер	1мкл
Общий объем смеси	V=6 мкл

8. Электрофоретическое разделение молекул ДНК (рис. 48), необходимо проводить при 160 Вт, 80 В, 80 мА в течение 60 – 90 минут. Поскольку молекула нуклеиновой кислоты заряжена отрицательно, то движение образца будет происходить в сторону положительно заряженного электрода (анода).

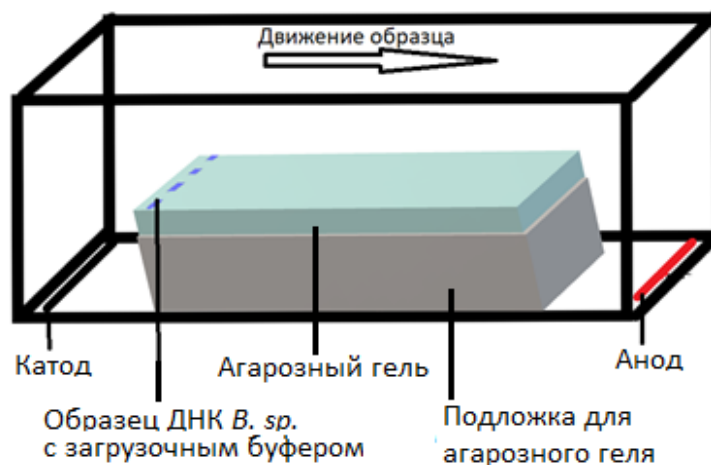


Рис. 48 Расположение агарозного геля в электрофорезной камере

9. Полученное электрофоретическое разделение молекул ДНК детектируют с помощью УФ трансиллюминатора ($\lambda_{\text{излучения}} \approx 240 - 304 \text{ нм}$) (рис. 49)

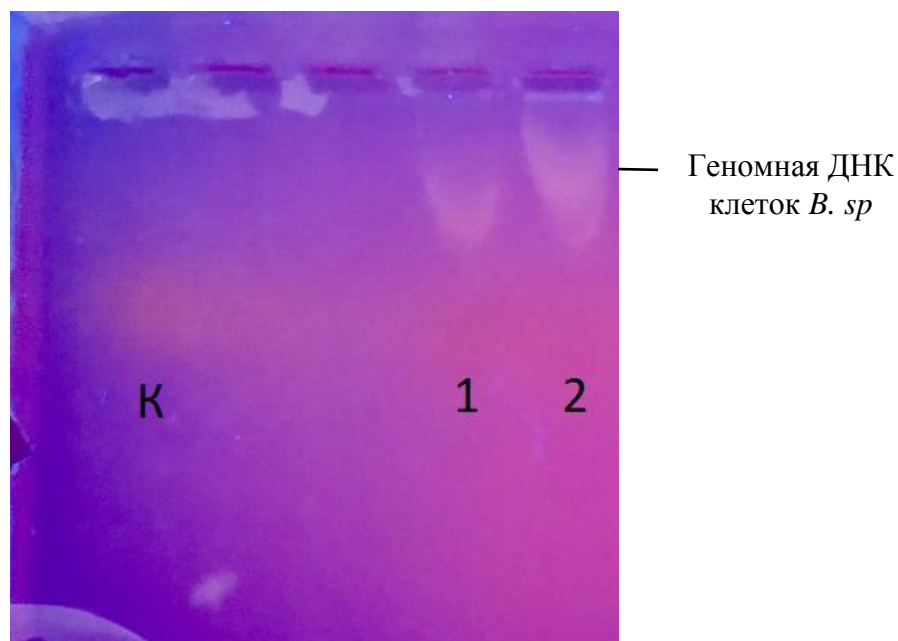


Рис. 49 Примерный вариант электрофореграммы геномной ДНК клеток *B. sp*
 К – отрицательный контроль, загрузочный буфер 1х без образца;
 1, 2 – Геномная ДНК клеток *B. sp*.

Поскольку ДНК поглощает на 254 нм, а поглощение бромистого этидия (рис.50) – 366 нм, полученные комплекс «нуклеиновые кислоты – бромистый этидий» флюоресцирует в области 590 нм (оранжево– красное свечение).

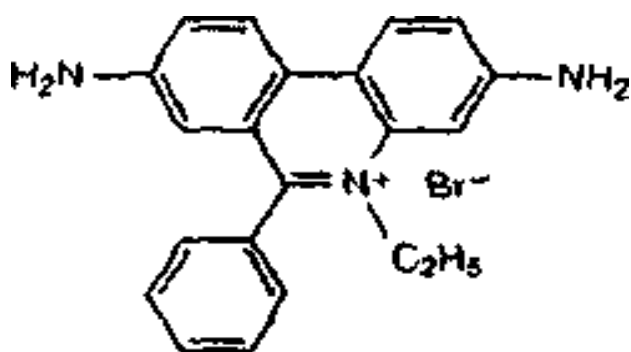
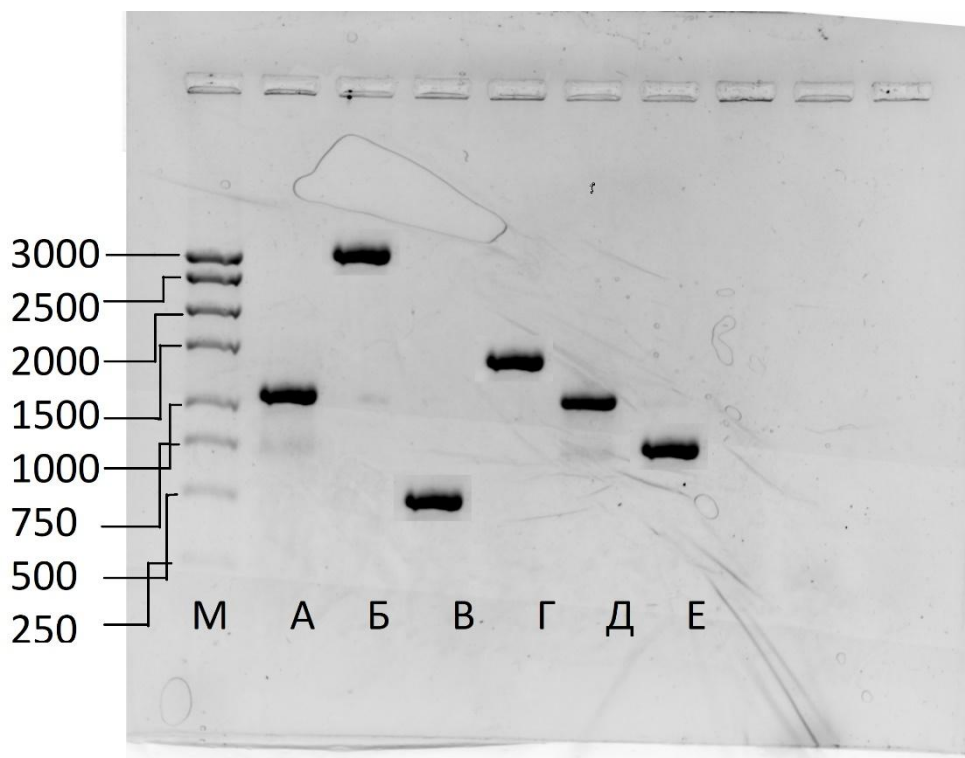


Рис. 50 Структурная формула бромистого этидия

Контрольные вопросы

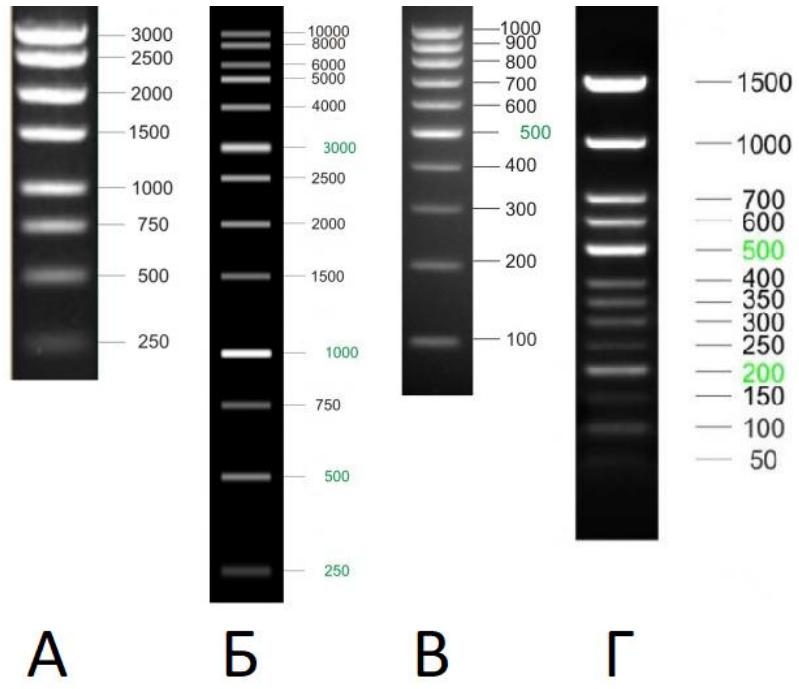
1. От чего зависит скорость перемещения заряженной молекулы в агарозе под действием электрического тока?

2. На чем основано использование бромистого этидия для визуализации фрагментов ДНК в агарозном геле.
3. Какой процент агарозы необходимо использовать для детекции плазмиды в 8 тыс. п.о.?
4. Определите величину фрагмента ДНК по результатам электрофореза.



5. Вы провели электрофоретическое разделение фрагмента ДНК длиной:
 1. 3500 п.о.
 2. 500 п.о.
 3. 10000 п.о.
 4. 4000 п.о.
 5. 850 п.о.

Какой маркер из ниже приведенных Вы будете использовать для визуализации имеющегося фрагмента ДНК?



1.	2.	3.	4.	5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

SmAP белки – архейные представители семейства Lsm белков. На сегодняшний день, данные гомологи мало изучены, имеются данные лишь об их пространственной структуре, однако функциональное значение пока не ясно. В то же время, есть предположительные гипотезы о вероятной роли белков SmAP в жизнедеятельности архей, они могут играть роль коровых белков, которые необходимы для формирования мяРНК, что характерно для эукариотических Sm белков, либо выступать в качестве шаперонов малых регуляторных РНК, как в случае бактериального Hfq. [36].

Для определения влияния белка SmAP на темпы роста, развитие и экспрессию других белков в клетках архей, нами была осуществлена делеция гена белка SmAP на *H. salinarum* методом pop-in pop-out делецией – первый шаг к пониманию приблизительной функции белка SmAP в клетках *H. salinarum*.

Объект (*H. salinarum*), на котором осуществлялась делеция гена белка SmAP, относится к группе экстремофилов, выживающих в условиях повышенной концентрации соли. Данный представитель сочетает в себе признаки, присущие эукариотическим и прокариотическим клеткам, помимо это характерны свои уникальные свойства, связанные со строением клеточной оболочки и с некоторыми процессами реализации наследственной информации. Также, для данного организма существуют оптимизированные методики для проведения генно-инженерных исследований. В ходе исследования был выявлен наиболее эффективный метод трансформации клеток *H. salinarum* применённый Кляйном в 1987. Метод ПЭГ – трансформации с изменениями, а именно: была подобрана оптимальная температура и время после добавления ЭДТА (37°C – 10 минут), а также количество вносимого генетического материала. Помимо этого был преодолен ре-

стрикционный барьер, в связи с применением для трансформации неметилированной плазмиды.

На каждом этапе генно-инженерной работы с фрагментами ДНК или плазмидами, проводилась детекция полученных результатов с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле. Данная методика подходит для объяснения свойств заряженных биомолекул (нуклеиновые кислоты – ДНК или РНК) в поле электрического тока. Проведение лабораторных работ по данной тематике у студентов химико-биологической направленности на занятиях по молекулярной биологии, повысит интерес к изучаемой дисциплине, а также поспособствует закреплению знаний в области биохимии и усовершенствует навыки микробиологии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Безносков, С.Н. Изучение надмолекулярной организации и нанотехнологическое применение жгутиков *Halobacterium Salinarum* при помощи методов модификации генов флагеллинов: автореф. дис. ... канд. биол. наук : специальность 03.01.03 Молекулярная биология / С.Н. Безносков; [Ин-т белка РАН]. – Пущино, 2014. – 119 с.
2. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии [Текст] / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
3. Мурина, В.Н. РНК – связывающие Sm – подобные белки бактерий и архей: сходство и различия структур и функций [Текст] / В.Н. Мурина, А.Д. Никулин // Успехи Биологической Химии. – 2011. – №. 51. – С. 133–164.
4. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование [Текст] / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
5. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы [Текст] / Л.И. Патрушев. – М.: Наука, 2004. – 530 с.
6. Уилсон, К. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии [Текст] / К. Уилсон, Дж. Уолкер. – М.: БИНОМ. – 2013. – 848 с.
7. Allers, T. Archaeal genetics—the third way [Text] / T. Allers, M. Mevarech // Nature Reviews Genetics. – 2005. – Vol. 6, № 1. – P. 58–73.
8. Ausiannikava, D., Allers T. Diversity of DNA replication in the Archaea [Text] / D. Ausiannikava, T Allers // Genes. – 2017. –Vol. 8, № – P. 56–70.
9. Bang, C. Archaea associated with human surfaces: not to be underestimated [Text] / C. Bang, R.A. Schmitz // FEMS microbiology reviews. – 2015. – Vol. 39, № 5. – P. 631–648.

10. Beznosov, S.N. On the multicomponent nature of *Halobacterium salinarum* flagella [Text] / S.N. Beznosov, M.G. Pyatibratov O.V. Fedorov // *Microbiology*. – 2007. – Vol. 76, № 4. – P. 435– 441.
11. Bickle, T.A., Krüger D.H. Biology of DNA restriction [Text] / T.A. Bickle, D.H. Krüger // *Microbiological reviews*. – 1993. – Vol. 57, № 2. – P. 434– 450.
12. Blaseio, U., Pfeifer F. Transformation of *Halobacterium halobium*: development of vectors and investigation of gas vesicle synthesis [Text] / U. Blaseio, F. Pfeifer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1990. – Vol. 87, № 17. – P. 6772– 6776.
13. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding [Text] / M.M Bradford // *Analytical biochemistry*. – 1976. – Vol. 72, № 1– 2. – P. 248– 254.
14. Brock, T.D. *Biology of microorganisms* 7th ed [Text] / T.D. Brock et al. – New Jersey: Prentice Hall Upper Saddle River, 1994. – 650 p.
15. Chaban, B. Archaeal habitats—from the extreme to the ordinary / B. Chaban [et al.] // *Canadian journal of microbiology*. – 2006. – Vol. 52, № 2. – P. 73– 116.
16. Cline, S.W. Efficient transfection of the archaebacterium *Halobacterium halobium* [Text] / S.W. Cline , W.F. Doolittle // *Journal of bacteriology*. – 1987. – Vol. 169, № 3. – P. 1341– 1344.
17. Collins, B.M. Homomeric ring assemblies of eukaryotic Sm proteins have affinity for both RNA and DNA: Crystal structure of an oligomeric complex of yeast SmF [Text] / B. M. Collins [et al.] // *J.Biol.Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 17291– 17298.
18. DasSarma, S. Extreme halophiles are models for astrobiology [Text] / S. DasSarma // *Microbe– American Society for Microbiology*. – 2006. – Vol. 1, № 3. – P. 120– 126.

19. Dyal– Smith, M. The Halohandbook: protocols for halobacterial genetics [Text] / M. Dyal– Smith, Wagga Wagga: Proudly powered by WordPress, 2009. – 144p.
20. Falb, M. Metabolism of halophilic archaea [Text] / M. Falb [et al.] // Extremophiles. – 2008. – Vol. 12, № 2. – P. 177– 196.
21. Hartung, S. Lessons from structural and biochemical studies on the archaeal exosome [Text] / S. Hartung, K. Hopfner // Biochem. Soc. Trans. – 2009. – Vol. 37. – P. 83– 87.
22. Hawkins, M. Accelerated growth in the absence of DNA replication origins [Text] / M. Hawkins [et al.] // Nature. – 2013. – Vol. 503, № 7477. – P. 544– 560.
23. Henneman B. Structure and function of archaeal histones / B. Henneman [et al.] // PLoS genetics. – 2018. – Vol. 14, № 9. – P. 1– 21.
24. Holmes, M. Improved shuttle vectors for *Haloferax volcanii* including a dual– resistance plasmid [Text] / M. Holmes, F. Pfeifer, M. Dyal– Smith // Gene. – 1994. – Vol. 146, № 1. – P. 117– 121.
25. Holmes, M.L. Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Haloferax* DNA gyrase [Text] / M.L. Holmes, S.D. Nuttall, M.L. Dyal– Smith // Journal of Bacteriology. – 1991. – Vol. 173, № 12. – P. 3807– 3813.
26. Holmes, M.L. Sequence and expression of a halobacterial β - galactosidase gene [Text] / M.L. Holmes, M.L. Dyal– Smith // Molecular microbiology. – 2000. – Vol. 36, № 1. – P. 114– 122.
27. Horikoshi, K. The triangular halophilic archaeobacterium *Haloarcula japonica* strain TR– 1 [Text] / K. Horikoshi, R. Aono, S. Nakamura // Experientia. – 1993. – Vol. 49, № 6– 7. – P. 497– 502.
28. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [Text] / U.K. Laemmli // nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680– 685.

29. Lykke– Andersen, J. Archaeal introns: splicing, intercellular mobility and evolution [Text] / J. Lykke– Andersen [et al.] // Trends in biochemical sciences. – 1997. – Vol. 22, № 9. – P. 326– 331.
30. Maier, L. K. Deletion of the Sm1 encoding motif in the *lsm* gene results in distinct changes in the transcriptome and enhanced swarming activity of *Haloferax* cells [Text] / L. K. Maier [et al.] // Biochimie. – 2015. – Vol. 117. – P. 129– 137.
31. Maier, L.K. The immune system of halophilic archaea [Text] / L.K. Maier [et al.] // Mobile genetic elements. – 2012. – Vol. 2, № 5. – P. 228– 232.
32. Mandel, M. Calcium– dependent bacteriophage DNA infection / M. Mandel, A. Higa // Journal of molecular biology. – 1970. – Vol. 53, № 1. – P. 159– 162.
33. Mayer, C. The archaeal homolog of the Imp4 protein, a eukaryotic U3 snoRNP component [Text] / C. Mayer, D. Suck, O. Poch // Trends in biochemical sciences. – 2001. – Vol. 26, № 3. – P. 143– 144.
34. Møller, T. Hfq: a bacterial Sm– like protein that mediates RNA– RNA interaction [Text] / T. Møller [et al.] // Molecular cell. – 2002. – Vol. 9. – № 1. – P. 23– 30.
35. Mullis, K.B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase– catalyzed chain reaction [Text] / K.B. Mullis, F.A. Faloon // Methods in enzymology. – Academic Press, 1987. – Vol. 155. – P. 335– 350.
36. Mura, C. Archaeal and eukaryotic homologs of Hfq: a structural and evolutionary perspective on Sm function [Text] / C. Mura [et al.] // RNA biology. – 2013. – Vol. 10, № 4. – P. 636– 651.
37. Murina, V. Hfq binds ribonucleotides in three different RNA– binding sites [Text] / V. Murina, N. Lekontseva, A. Nikulin // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. – 2013. – Vol. 69, № 8. – P. 1504– 1513.

38. Nielsen, J.S. et al. An Hfq-like protein in archaea: crystal structure and functional characterization of the Sm protein from *Methanococcus jannaschii* [Text] / J.S. Nielsen [et al.] // *Rna*. – 2007. Vol. 13, № 12. – P. 2213–2223.
39. Nikulin, A. Crystal structure of SmAP (LSm) protein from *Sulfolobus acidocaldarius* [RCSB Protein Data Bank] / A.D. Nikulin, N.V. Lekontseva, S.V. Tishchenko. – Available at: <https://www.rcsb.org/structure/5MKL> (Accessed 17 June 2010) (in Russian).
40. Nikulin, A. Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein [Text] / A. Nikulin [et al.] // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2005. – Vol. 61, № 2. – P. 141–146.
41. Notman, D.D. Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases [Text] / D.D. Notman, N. Kurata, E.M. Tan // *Annals of Internal Medicine*. – 1975. – Vol. 83, № 4. – P. 464–469.
42. Pfeiffer F. Evolution in the laboratory: the genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1 [Text] / F. Pfeiffer [et al.] // *Genomics*. – 2008. – Vol. 91, № 4. – P. 335–346.
43. Pyatibratov, M.G. Alternative flagellar filament types in the haloarchaeon *Haloarcula marismortui* [Text] / M.G. Pyatibratov [et al.] // *Canadian journal of microbiology*. – 2008. – Vol. 54, № 10. – P. 835–844.
44. Reeve, J.N. Archaeal chromatin and transcription [Text] / J.N. Reeve // *Molecular microbiology*. – 2003. – Vol. 48, № 3. – P. 587–598.
45. Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual* [Text] / J. Sambrook [et al.] – Dallas : Cold spring harbor laboratory press, 1989. – 1546 p.
46. Schlesner, M. The *Halobacterium salinarum* taxis signal transduction network: a protein–protein interaction study [Text] / M. Schlesner // Ludwig–Maximilians–Universität München, 2008. – 209 p.

47. Sowers, K.R., Gene transfer systems for the Archaea [Text] / K.R. Sowers, H.J. Schreier // Trends in microbiology. – 1999. – Vol. 7, № 5. – P. 212– 219.
48. Sprangers, R. High– resolution X-ray and NMR structures of the SMN Tudor domain: conformational variation in the binding site for symmetrically dimethylated arginine residues [Text] /R. Sprangers [et al.] // Journal of molecular biology. – 2003. – Vol. 327, № 2. – P. 507– 520.
49. Sun, X. Predicted structure and phyletic distribution of the RNA- binding protein Hfq [Text] / X. Sun, I. Zhulin, R. M. Wartell // Nucleic acids research. – 2002. – Vol. 30, № 17. – P. 3662– 3671.
50. Tarasov, V.Y. Role of flagellins from A and B loci in flagella formation of *Halobacterium salinarum* [Text] / V.Y. Tarasov [et al.] // Molecular microbiology. – 2000. – Vol. 35, № 1. – P. 69– 78.
51. Tebbe, A. Analysis of the cytosolic proteome of *Halobacterium salinarum* and its implication for genome annotation [Text] / A. Tebbe // Proteomics. – 2005. – Vol. 5, № 1. – P. 168– 179.
52. Thomas N.A. The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure [Text] / N.A. Thomas, S.L. Bardy, K.F. Jarrell // FEMS microbiology reviews. – 2001. – Vol. 25, № 2. – P. 147– 174.
53. Törö, I. Archaeal Sm proteins form heptameric and hexameric complexes: crystal structures of the Sm1 and Sm2 proteins from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* [Text] / I. Törö [et al.] // Journal of molecular biology. – 2002. – Vol. 320, № 1. – P. 129– 142.
54. Vasu, K. Diverse functions of restriction– modification systems in addition to cellular defense [Text] / K. Vasu, V. Nagaraja // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2013. – Vol. 77, № 1. – P. 53– 72.
55. Wassarman, K. M. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays [Text] / K. M. Wassarman [et al.] // Genes & development. – 2001. – Vol. 15, № 13. – P. 1637– 1651.

56. Watanabe, Y. Introns in protein-coding genes in Archaea [Text] / Y. Watanabe [et al.] // FEBS letters. – 2002. – Vol. 510, № 1– 2. – P. 27– 30.
57. Weber, G. Functional organization of the Sm core in the crystal structure of human U1 snRNP [Text] / G. Weber [et al.] // The EMBO journal. – 2010. – Vol. 29, № 24. – P. 4172– 4184.
58. White, M.F. Homologous recombination in the archaea: the means justify the ends [Text] / M.F. White // Biochem. Soc. Trans. – 2011. Vol 39. – P. 15– 19.
59. Wiedenheft, B. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea [Text] / B. Wiedenheft, S. H. Sternberg, J. A. Doudna // Nature. – 2012. – Vol. 482, № 7385. – P. 331– 338.
60. Wilusz, C. Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria [Text] / C. Wilusz, J Wilusz // Nature structural & molecular biology. – 2005. – Vol. 12, № 12. – P. 1031– 1036.
61. Yu, D. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli* [Text] / D. Yu [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – Vol. 97, № 11. – P. 5978– 5983.
62. Zhang, R. Multiple replication origins of the archaeon *Halobacterium species NRC-1* [Text] / R. Zhang, C.T. Zhang // mBiochemical and biophysical research communications. – 2003. – T. 302. – №. 4. – C. 728– 734.
63. Zibat, A. Efficient transformation of *Halobacterium salinarum* by a “freeze and thaw” technique [Text] / A. Zibat // Biotechniques. – 2001. – Vol. 31, № 5. – P. 1010– 1012.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Буферы, растворы и среды, использованные в работе

Буферы и растворы

ТАЕ: Трис – ацетат 40 мМ, рН 7,8; 2 мМ ЭДТА.

Буфер для нанесения проб ДНК: 0,25% бромфенолового синего; 0,25 %
ксилолцианола; 40% сахароза.

Буфер BS BUF: 4,3 М *NaCl*, 81 мМ *MgSO₄*, 27 мМ *KCl*

Буфер FT: 4,3 М *NaCl*, 27 мМ *KCl*, 100 мМ *CaCl₂*, 100 мМ PIPES, рН 6,8.

Буфер для определения титра фаголизата: 10 мМ Трис – *HCl* рН 7,5
с 10 мМ *MgSO₄*.

Буфер для образцов белка: 7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 4% w/v
CHAPS, 0,6% v/v амфолитов 3 – 10, 65 мМ ДТТ.

Сферопластирующий раствор: 2 М *NaCl*, 27 мМ *KCl*, 50 мМ Трис –
HCl (рН 8,75), сахароза 15%.

Буфер для нанесения проб белка на ДСН– ПААГ: 300 мМ Трис – *HCl*
(рН 6,8), 10% w/v ДСН; 25% v/v МЭ, 30 % v/v глицерина, 0,5% w/v БФС.

Буфер для электрофореза в ДСН– ПААГ: 0,025 М Трис – *HCl*, 0,192
М глицин, рН 8,7; 0,1% ДСН.

Краситель для ПААГ: 20% этанола, 10% уксусной кислоты и 0,5 %
кумасси G – 250.

Среды

LB: 1% бакто – триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% *NaCl*.

LB- агар: 1% бакто – триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% *NaCl*, 1,5% бакто– агар.

R- агар: 1% бакто– триптон, 1,2% бакто – агар, 0,8% *NaCl*, 0,1% дрожжевой экстракт, 2,5 мМ *CaCl₂*.

Верхний R- агар: 1% бакто – триптон, 0,8% бакто – агар, 0,8% *NaCl*, 0,1% дрожжевой экстракт, 2,5 мМ *CaCl₂*.

Среда для *H. salinarum*: 25% *NaCl*; 0,2% *KCl*; 2% *MgSO₄ * 7H₂O*; 0,3% *Na₂C₆H₅O₇*, 0,5 % триптон; 0,2% дрожжевой экстракт, рН 7,5.

Все среды стерилизовали автоклавированием при 1,5 атм. 30 мин, 120°C.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Бактериальные штаммы и плазмиды

В работе были использованы штаммы микроорганизмов, указанные в таблице 9.

Таблица 9

Используемые штаммы

Штамм	Генотип	Источник
<i>E. coli</i> MG1655	F– λ – <i>ilvG</i> – <i>rfb</i> – 50 <i>rph</i> – 1	Blattner <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> NM300	DJ480 mini – λ tetR	N. Majdalani (неопубликованные данные)
<i>E. coli</i> XL1 – Blue	(<i>mcrA</i>)183 <i>mcrCB</i> – <i>hdsSMRmrr</i> 173 <i>endA1 supE44 thi</i> – 1 <i>recA1gyrA96</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proABlacIqZ M15</i> Tn10(TetR)]	Stratagene, США
<i>E. coli</i> Δ dam_XL1 – Blue	XL1(blue) <i>dam:kan</i>	Эта работа
<i>H. salinarum</i> B – 1 769 Type strain		B. Tindall, DSMZ, DSM 3754

Для конструирования плазмиды для внесения делеции в клетки *H. salinarum* использована плаزمида pNXB [50] на основе плазмиды pUC19, в которую введены гены *novR* (ген устойчивости к новобиоцину), взятый из плазмиды pMDS20 [4] и *bgaH* (ген галофильной β – галактозидазы) из плазмиды pMLH32 [26].

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Принадлежности и приборы, использованные в работе

Принадлежности

Для выделения ДНК использовался фирменный набор QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Германия). Для диализа препаратов белков и РНК использовали диализные мембраны Servapor (Serva, Германия). Для очистки растворов и буферов их фильтровали с использованием стекловолокнистых фильтров GF/C (Whatman, Великобритания), при необходимости растворы стерилизовали фильтрованием с помощью фильтров Syringe filters 0,22 μm (TPP[®], Швейцария). Для электротрансформации использовали кюветы с зазором 0,1 см (BioRad, США).

Приборы

В работе использованы фирменные наборы для выделения и очистки ДНК – NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean– up (MACHEREY – NAGEL GmbH & Co. KG) и плазмид – NucleoSpin[®] Plasmid (MACHEREY – NAGEL GmbH & Co. KG) (Германия). Для фильтрования применяли нитроцеллюлозные фильтры MILLIPORE 0,22 мм (США).

Для измерения оптической плотности ДНК использовали спектрофотометр NanoPhotometer[®] P– 330 (IMPLEN, Германия); для измерения оптической плотности колонии клеток использовали ThermoFisher Genesys 10S UV – VIS (Нидерланды).

Аmplификацию фрагментов ДНК проводили методом ПЦР с использованием амплификатора Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (Нидерланды).

В работе использовали автоклавы ВК-75 (СССР) и MLS – 3780 (SANYO, Япония); центрифуги Eppendorf 5415C, 5810R (Eppendorf Gerätebau, Германия), BR4i (Jouan, США), Optima™ L – 90K, TL – 100, Allegra™ X – 22R, L5 – 50 (Beckman Coulter, США); ротор Ti70 (Beckman Coulter, США), термостат MLW UH (MLW, ГДР), воздушные термостатированные шейкеры Innova™ 4000 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, США), ультрафиолетовый трансиллюминатор Cole – Parmer (Cole – Parmer Instrument Company, Франция), магнитные мешалки ММ2А (СССР), рН-метр Accumet 20 (Fisher Scientific, США) комплекты оборудования для электрофореза Mini Protean II, Mini – Sub® Cell GT, Gel Electrophoresis Cell Model 150 (Bio – Rad, США), Hoefer™ Dual Gel Caster (Amersham Biosciences, Англия) и ThermoScientific S4S (Owl Separation Systems, США); источники постоянного тока Эльф – 4 (ДНК– Технология, Россия), аппарат для электротрансформации E.coli – pulser (Bio – Rad, США); ультразвуковой гомогенизатор Gaulin – Homogenizer (MICRON LAB 40, APV Homogenizer GmbH, Германия).

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Полимеразная цепная реакция

Аmplификацию фрагментов ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [35]. Фрагменты ДНК для последующего внедрения их в хромосому *E. coli* амплифицировали с помощью смеси *Taq* SE и *Pfu* ДНК – полимераз.

Taq SE ДНК полимеразу использовали в ПЦР для проверки наличия замен в хромосоме исследуемых штаммов *E. coli* и амплификации фрагментов ДНК для секвенирования.

При использовании различных ДНК– полимераз следовали рекомендациям фирм – производителей ферментов, представленных в таблице 10. Амплификацию проводили в течение 25 – 30 циклов. Денатурацию ДНК проводили при 95°C в течение 30 сек, отжиг праймеров с ДНК (55 – 65°C) в течение 30 сек, синтез ДНК – при 72°C в течение 60 – 240 сек в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента и процессивности ДНК– полимеразы. Температуру отжига олигонуклеотидных праймеров (таблица 11) приблизительно оценивали по формуле (6):

$$2(A+T)+4(G+C) = T(^{\circ}\text{C}), \quad (6)$$

где А, Т, G, С – количество соответствующих нуклеотидных остатков в последовательности праймера;
Т– температура отжига, °С.

После окончания ПЦР одну десятую часть реакционной смеси анализировали электрофорезом в агарозном геле, как описано в разделе 2.2.2

Таблица 10

Условия для проведения ПЦР

Компонент	ДНК полимеразы	
	<i>Pfu+Taq SE</i>	<i>Taq SE</i>
1	2	3
фирменный буфер	1×кратный	
DMSO	5%	0%
прямой и обратный праймеры	0,5 мкМ	
плазмидная (хромосомная) ДНК	10– 20 (100– 200) нг	
смесь дезоксирибонуклеотидов	0,2 мМ каждого	
ДНК полимеразы	2 ед.	1 ед.
деионизированная вода	до 50 мкл	

Таблица 11

Используемые олигонуклеотидные праймеры

Название	Последовательность 5' – >3'
F_HindIII:	CCCAAGCTTGGGCGGTTCCTGGGGCTG
R_HsaI	CCACCGGCGGTAGGTACCTGGCGCAGGAACCCCGAG
F_HsaII	CTCGGGGTTCTGCGCCAGGTACCTACCGCCGGTGG
R_XbaI	GCTCTAGAGCTGGATGCGGAGGATTGATCGG
Check_dF	ACCTCATGCTGTACGTGCTC
Check_dR	GGCAGTGAACCTCCGAATCGT
R_km_dam	GGGGCAATCAAATACTGTTTCATCCGCTTCTCCTTGA- GAATTAGAAAACTCATCGAGCA
F_km_dam	CTTTCTCCACAGCCGGAGAAGGTGTAATTAGTTAGTCAG- CATGAGCCATATTCAACGGGA
R_check_dam	TACAGGCCGATCTGAAGTAA
F_check_dam	GCTTTTGCGGTATCTTCAC

ПРИЛОЖЕНИЕ 5**Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Для анализа фрагментов ДНК использовали электрофорез в агарозном геле [45]. Электрофорез проводили в горизонтальных пластинах геля агарозы в аппарате Mini-Sub[®] Cell GT при напряжении электрического тока 90 В. Концентрация агарозы составляла 1%. Агарозу растворяли в растворе, содержащем 40 мМ Трис – ацетатный буфер рН 7,8 и 2 мМ ЭДТА (приложение 1, п. буферы и растворы). Непосредственно перед полимеризацией в агарозу добавляли бромистый этидий до концентрации 1,5 мкг/мл. К образцам перед нанесением на гель добавляли 1/5 объема раствора, содержащего 0,1% БФС и 30% глицерин. В качестве электродного буфера использовали Трис – ацетатный буфер рН 7,8 и 2 мМ ЭДТА. После электрофореза ДНК в геле анализировали в ультрафиолетовом свете.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6**Очистка фрагментов ДНК и выделение плазмидной ДНК**

Для очистки фрагменты ДНК разделяли при помощи электрофореза в геле 1% или 2% легкоплавкой агарозы. После окрашивания бромистым этидием гель анализировали в ближнем ультрафиолете (356 нм). Зоны геля, содержащие целевые фрагменты, вырезали. Экстракцию образца из геля проводили с использованием фирменных наборов QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) (приложение 3, п. принадлежности) в соответствии с рекомендациями фирмы– изготовителя.

ПРИЛОЖЕНИЕ 7**Выделение хромосомной ДНК из *H. salinarum***

Хромосомную ДНК *H. salinarum* выделяли из 1 мл культуры клеток, выросших до плотности в одну оптическую единицу ($\lambda=600$ нм). Выделение проводили по методу, описанному в *Protocols for halobacterial genetics*, 2009.

Согласно данному протоколу, клетки осаждали при 7000 g в течение 5 минут. Далее супернатант тщательно удалялся, а к клеткам прибавлялось 400 мкл воды и все быстро перемешивалось пипеткой, в результате клетки немедленно подвергались осмотическому лизису. Белки инактивировали инкубацией полученного раствора ДНК при 70°C в течение 10 минут. ДНК очищали последовательной экстракцией равными объемами: фенола, фенол/хлороформа (1/1), хлороформа/изоамилового спирта (24/1). Далее ДНК из водной фазы осаждали этанолом (3 объема этанола и 1\10 объема 3М ацетата натрия, инкубация при -70°C, 30 минут). Осадок после подсушивания растворяли в воде.

ПРИЛОЖЕНИЕ 8**Обработка ДНК сайт-специфическими эндонуклеазами рестрикции**

Рестрикцию плазмидного вектора рNXB и продуктов ПЦР проводили с использованием сайт-специфических эндонуклеаз *HindIII* и *XbaI* в буферах, поставляющихся вместе с ферментами. Обработку плазмидной ДНК и ПЦР – фрагмента проводили отдельно в два этапа в объеме 60 мкл для ПЦР-продукта и в объеме 50 мкл для плазмидной ДНК при 37°C в течение 3 – 6 ч. Фермент *HindIII* инактивировали прогревом 20 минут при 80°C, а фермент *XbaI* при 65°C. Проверку результатов рестрикции проводили методом электрофореза в агарозном геле, как описано в приложении 5.

ПРИЛОЖЕНИЕ 9**Лигирование фрагментов ДНК**

Лигазная смесь (20 мкл) содержала 1X лигазный буфер (SibEnzyme), 1 ед. активности Т4 ДНК– лигазы, 100 нг вектора и вставку. Количество вносимой вставки брали в молярном соотношении вектор:вставка = 1:5. Реакцию лигирования осуществляли при 22°C в течение 12 часов. Фермент инактивировали прогревом в течение 20 минут при температуре 65°C. Для последующей трансформации компетентных клеток *E. coli* использовали весь объем лигазной смеси.

ПРИЛОЖЕНИЕ 10**Получение компетентных клеток *E. coli* с использованием хлорида кальция**

Компетентные клетки получали согласно методике, описанной (Mandel and Higa, 1970) с применением хлористого кальция и ДМСО. Культуру клеток выращивали при интенсивном перемешивании в 50 мл LB при 30°C до достижения оптической плотности $OD_{590} = 0,4 - 0,6$. Клетки центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Полученный осадок суспендировали в 15 мл буфера (10 mM Трис – HCl, pH 8,0, 50 mM $CaCl_2$) (приложение 1, п. буферы и растворы) и снова осаждали клетки. К осадку клеток добавляли 2 мл охлажденного буфера (10 mM Трис – HCl, pH 8,0, 50 mM $CaCl_2$), а затем 225 мкл ДМСО. 100 мкл компетентных клеток были заморожены в жидком азоте и хранились при -70°C 1 – 2 месяца без значительного снижения эффективности трансформации.

ПРИЛОЖЕНИЕ 11**Трансформация клеток *E. coli* с помощью метода теплового шока**

200 мкл компетентных клеток смешивали с 10 – 20 нг плазмидной ДНК и оставляли на льду в течение 30 мин. Температурный шок, способствующий увеличению эффективности трансформации, проводили при 42°C в течение одной минуты. После охлаждения во льду (5 мин) клетки ресуспендировали в 0,8 мл среды LB (приложение 1, п. среды) и растили в течение часа при 37°C. После этого клеточную суспензию наносили на чашки с твердой средой LB и антибиотиком для селекции (ампициллин 100 мкг/мл) и инкубировали при 37°C до появления колоний.

ПРИЛОЖЕНИЕ 12

Трансформация клеток *H.salinarum* с использованием ПЭГа

Трансформацию проводили по методике, описанной Cline *et al.*, (1989) [16], с модификациями. Клеточную культуру объемом 1,5 мл осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 10 минут, после чего клетки ресуспендировали в 150 мкл сферопластирующего раствора (2 М NaCl; 27 mM KCl; 50 mM Трис – HCl (pH 8,75); сахароза 15%) (приложение 1, п. буферы и растворы). Далее добавляли 30 мкл смеси равных объемов 0,5 М ЭДТА (pH 8,75) и сферопластирующего раствора, и инкубировали при комнатной температуре 10 минут. К полученным сферопластам добавлялась плазмидная ДНК в количестве 5 мкг и смесь оставляли на 5 минут. После чего добавляли равный объем раствора, содержащего 60% ПЭГ–600 и 40% сферопластирующего раствора (вес/объем). Клетки инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Далее для восстановления клеток добавляли 1 мл культуральной среды, содержащей 15 % сахарозы, и осаждали клетки 5 минут при 4000 g. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл культуральной среды, содержащей 15 % сахарозы, и инкубировали в течение 12 – 24 часов при 37°C с покачиванием. Селекция трансформантов осуществлялась на агаризованной среде для *H. salinarum*, содержащей 15% сахарозы и 0,1 – 0,2 мкг/мл антибиотика новобиоцина. Инкубация осуществлялась при 37°C в течение 14 дней.

ПРИЛОЖЕНИЕ 13**Трансформация клеток *H. salinarum* методом
замораживания– оттаивания**

Использовали методику, описанную Zibat (2001) [63], с модификациями. Клеточную культуру объемом 1,5 мл осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 минут при температуре 4°C. Осадок промывали 1 мл буфера FT, содержащем 4,3 М NaCl, 27 мМ KCl, 100 мМ CaCl₂, 100 мМ PIPES, pH 6,8 (приложение 1, п. буферы и растворы). К 120 мкл компетентных клеток добавляли 1 – 2 мкг плазмидной ДНК в 2 – 5 мкл буфера FT. Полученную реакционную смесь инкубировали на льду 15 минут, а затем на –70°C в течение 30 минут. Затем, клетки инкубировали в водяном термостате при 40°C в течение 80 секунд. После этого добавляли 900 мкл охлажденной культуральной среды и инкубировали полученную смесь в течение 60 минут в термостате без покачивания при 37°C. Затем 200 мкл клеток смешивали с 3 мл растопленного верхнего агара (0,7 % агароза, культуральная среда и 0,1 мкг/мкл новобиоцина). Данной смесью покрывали чашки с агаризованной средой, содержащей необходимый селективный маркер и инкубировали на 37°C.

ПРИЛОЖЕНИЕ 14**Осуществление замен в хромосомной ДНК *E. coli* с помощью метода «recombineering»**

Суть метода «recombineering» сводится к использованию специального штамма *E. coli*, содержащего в хромосоме дефектный профаг λ , обеспечивающий термоиндуцибельный синтез трех фаговых белков: Echo, Beta и Gam [61]. Данные белки осуществляют гомологичную рекомбинацию между одно- или двуцепочечными ДНК- субстратами и хромосомной или плазмидной ДНК. Для эффективной рекомбинации достаточно наличия коротких (40 – 50 нуклеотидов) участков гомологии. Этот метод позволяет внедрить в хромосому клетки ПЦР- кассету, состоящую из какого-либо маркерного гена и дополнительных последовательностей, необходимых для рекомбинации, с 5'- и 3'-концов. Данные последовательности должны быть комплементарны участкам хромосомы, фланкирующим хромосомный ген- мишень. В результате рекомбинации открытая рамка считывания (ОРС) маркерного гена заменяет ОРС гена- мишени, что позволяет производить селекцию рекомбинантов по соответствующему признаку, например, по устойчивости к антибиотику.

300 мкл культуры клеток штамма NM300 инкубировали в 30 мл среды LB и выращивали при 30°C с интенсивным перемешиванием до $OP_{600} = 0,4 - 0,5$. Далее, для индукции синтеза фаговых белков культуру помещали на 42°C в водяной термостатированный шейкер и инкубировали 15 мин с перемешиванием, после чего помещали в лед. Клетки после охлаждения осаждали центрифугированием (4000 g, 10 мин, 4°C), суспендировали в равном объеме охлажденной стерильной деионизированной воды и повторяли центрифугирование. После этого клетки суспендировали в 1 мл охлажденной стерильной деионизированной воды и снова центрифугировали. Затем клетки суспендировали в 0,25 мл охлажденной стерильной деионизированной воды. Для электротрансформации 50 мкл суспензии

клеток смешивали с 100 – 300 нг ПЦР – кассеты в деионизированной воде (максимальный объем 5 мкл) и помещали в охлажденные кюветы для электропорации. Электротрасформацию осуществляли с помощью прибора *E.coli*– pulser при разности потенциалов 1,8 кВ. Содержимое кюветы сразу после электропорации смешивали с 0,95 мл среды LB и инкубировали в течение 1 – 2 часов при 37°C с перемешиванием. После инкубации 2–1000 мкл клеточной суспензии высевали на чашки с LB – агаром и канамицином (50 мкг/мл). Чашки инкубировали до появления колоний при 37°C. Затем колонии клеток пересевали штрихом в размеченные сектора на чашки с LB – агаром и канамицином (50 мкг/мл). Для анализа вставки использовали единичные колонии клеток. Для этого отбирали колонию клеток и суспендировали в 30 мкл деионизированной воды. 2,5 мкл суспензии клеток использовали на 50 мкл ПЦР – смеси. При этом использовали проверочные праймеры F_check_dam и R_check_dam (приложение 4, таблица 11), отстоящие на 30 – 100 нуклеотидов от 5'– и 3'–концов гена– мишени. О наличии замены судили по изменению размера синтезирующегося ПЦР – продукта в сравнении с контролем (клетки штамма NM300).

ПРИЛОЖЕНИЕ 15

Общая трансдукция бактериофагом P1

Приготовление фаголизата P1vir. 50 мкл ночной культуры клеток *E. coli*, содержащих необходимый хромосомный маркер, инокулировали в 5 мл среды LB с 5 mM $CaCl_2$ и 0,2% глюкозой и инкубировали при 30°C с интенсивным перемешиванием в течение 30–60 мин (до ОП₆₀₀ ~ 0,1 о.е.). К суспензии клеток добавляли около $\sim 10^7$ частиц P1vir и продолжали рост до полного лизиса культуры. После этого добавляли 50 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали в течение 1 мин, центрифугировали (16000 g, 4°C, 10 мин), отбирали супернатант и хранили полученный фаголизат при 4°C.

Определение титра фаголизата P1vir. 250 мкл ночной культуры клеток штамма *E. coli* MG1655 смешивали с 2,5 мл расплавленного и охлажденного (~50°C) верхнего R– агара, выливали на предварительно подготовленную чашку с R– агаром, равномерно распределяли по поверхности и ждали, пока верхний R– агар с клетками затвердеет. После этого в размеченные на чашке сектора наносили 10 мкл серийных разведений фаголизата (от 10^{-2} до 10^{-8} в буфере, содержащем 10 mM Трис – HCl pH 7,5 с 10 mM $MgSO_4$ с шагом в 10 раз). Чашку выдерживали открытой, пока капли не впитаются. Затем чашку инкубировали при 37°C в течение ночи, считали бляшки и проводили расчет титра фаголизата по формуле (7):

$$T = N \times P \times 100, \quad (8)$$

где T – титр фаголизата, pfu/ml;
N – количество бляшек;
P – разведение.

Общая трансдукция бактериофагом P1vir. 1 мл ночной культуры клеток штамма *E. coli* MG1655 центрифугировали (4000 g, 2 мин), клетки суспендировали в 500 мкл раствора, содержащего 10 mM $CaCl_2$ и 5 mM $MgSO_4$. К 100 мкл полученной суспензии добавляли 10–100 мкл фаголизата

(с титром $10^8 - 10^{10}$) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин для адсорбции бактериофага. После этого добавляли 1 мл среды LB, 200 мкл 1 М цитрата натрия, pH 5,5, и инкубировали клетки при 37°C с интенсивным перемешиванием в течение 1 – 2 часов. Далее клетки осаждали центрифугированием (4000 g, 2 мин), суспендировали в 100 мкл LB с 5 mM цитратом натрия и высевали на чашку с LB – агаром, содержащим 5 mM цитрата натрия и 100 мкг/мл ампициллина. Чашки инкубировали при 37°C до появления колоний. Единичные колонии клеток рассеивали штрихом на аналогичные чашки и инкубировали при 37°C до появления колоний. Этот пассаж повторяли еще два раза для предотвращения контаминации конечного штамма бактериофагом.

Наличие необходимых изменений в хромосоме полученных колоний клеток проверяли с помощью ПЦР с проверочными праймерами, как описано в приложении 4, а затем соответствующий участок хромосомной ДНК секвенировали. Для этого с помощью ПЦР с проверочными праймерами амплифицировали необходимые области хромосомной ДНК. Секвенирование полученных фрагментов ДНК проводили в компании «Геном» (Россия).

ПРИЛОЖЕНИЕ 16**Подготовка образцов для двумерного электрофореза**

Образцы растворимой фракции белков из *H. salinarum* подготавливали согласно работе Tebbe [51] с изменениями. Для этого выращивали 4 поколения клеток *H. salinarum* без доступа света, для предотвращения образования каротиноидов. Клетки растили до ОП₆₀₀ 1 о.е. в богатой питательной среде, описанной в разделе 2.1.2, в термостатируемом шейкере при 37°C при интенсивном перешивании. Клетки осаждали 6 мин при 5000 g, 4°C. Осадок промывали буфером BS BUF, содержащим 4,3 М NaCl, 81 мМ MgSO₄, 27 мМ KCl (приложение 1, п. буферы и среды) и центрифугировали 5000 g 6 мин 4°C. Осадок ресуспендировали в 50% BS BUF с добавлением коктейля ингибиторов протеаз и 100 мкг/мл ДНКазы I, и инкубировали во льду 30 минут. Разрушение клеток производили на гомогенизаторе Gaulin – Homogenizer MICRON LAB 40. Клеточные обломки удаляли центрифугированием (213 000 g, 30 мин, 4°C), супернатант переносили в чистые пробирки, добавляли трихлоруксусной кислоты и ацетона до 10% и инкубировали 1– 3 часа во льду. Белки осаждали центрифугированием 20000 g 15 минут 4°C. Убирали супернатант и промывали осадок раствором, содержащим 10% ацетона и 20 мМ ДТТ. Белки осаждали центрифугированием 20000 g 15 минут 2°C. Осадок белков высушивали и растворяли в буфере для образцов (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 4% w/v CHAPS, 0,6% v/v амфолитов 3 – 10, 65 мМ ДТТ) (приложение 1, п. буферы и растворы). Концентрацию белка измеряли с помощью метода Бредфорда (раздел 2.3.3)

Изофокусировку белков проводили на приборе Protean i12 IEF (BioRad) согласно рекомендациям компании.

ПРИЛОЖЕНИЕ 17**Электрофорез белков в ПААГ в присутствии ДСН**

Электрофорез проводили по методу Леммли [28] с некоторыми изменениями в пластинах геля размером 7x8 см толщиной 0,75 мм в аппарате “Mini Protean II” фирмы Bio– Rad.

Разделяющий гель содержал 12 – 15% акриламида, 0,375 М Трис–*HCl* pH 8,7, 0,1% ДСН; для полимеризации на 8 мл раствора добавляли 8 мкл ТЕМЕД и 80 мкл 10% ПСА. Концентрирующий гель содержал: 6 % акриламида ($c=5\%$), 0,125 мМ Трис – *HCl* pH 6,8, 0,1% SDS; для полимеризации на 4 мл раствора добавляли 4 мкл ТЕМЕД и 40 мкл 10% ПСА. Для электрофореза использовали электродный буфер, содержащий 0,025 М Трис–*HCl*, 0,192 М глицин, pH 8,7; 0,1% ДСН. Буфер для приготовления образцов содержал в 10 мл: 3мл 1 М Трис– *HCl*, pH 6,8; 1 г ДСН; 2,5 мл МЭ, 3 мл глицерина, 0.05 г БФС. К образцу добавляли данный буфер (1/4 объема образца) и кипятили в течение 3 – 5 мин.

Режим электрофореза: 60 В (35 мА) до вхождения образцов в разделяющий гель, затем 180 В (60 – 70 мА) до выхода БФС из геля.

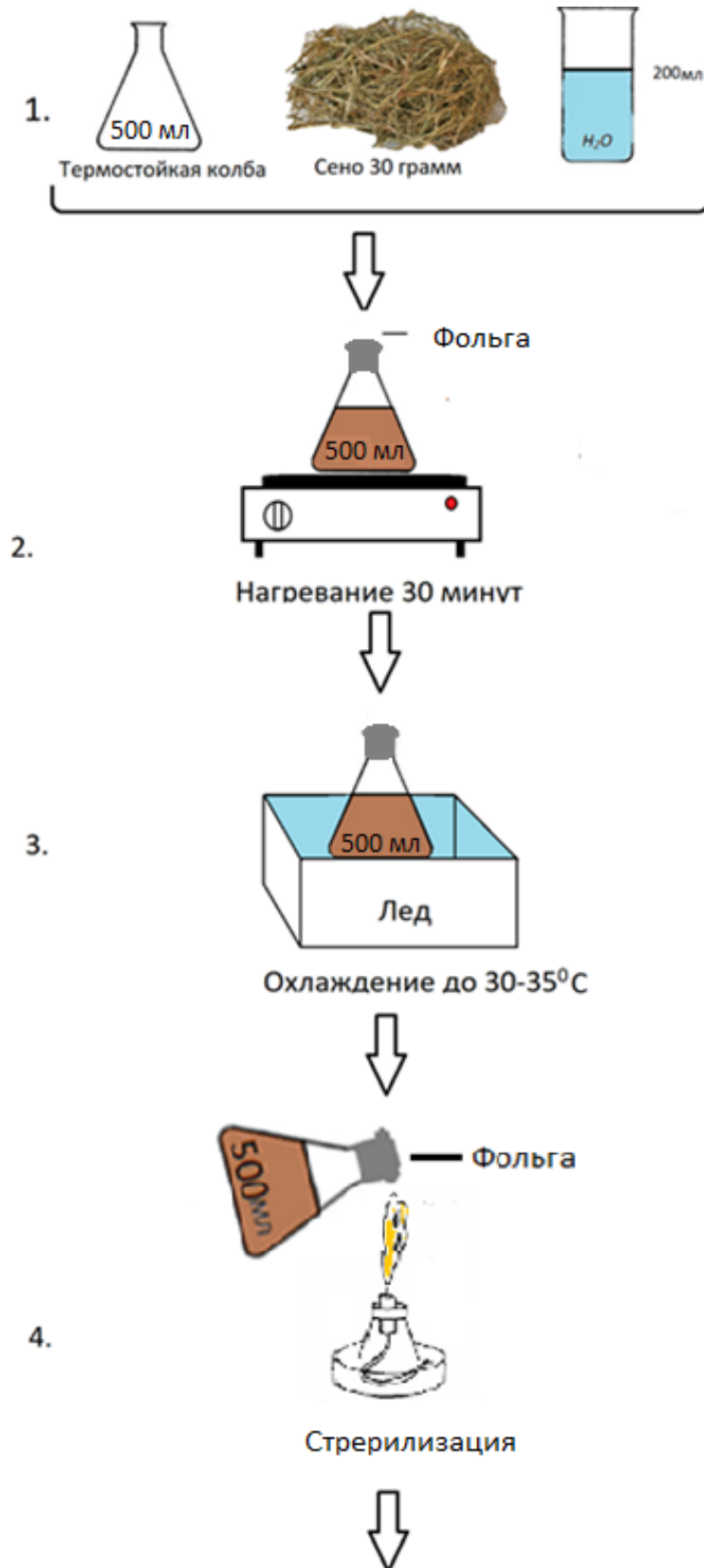
После электрофореза гель фиксировали и окрашивали в растворе, содержащем 20% этанола, 10% уксусной кислоты и 0,5 % кумасси G-250, при 100°C в течение 1 мин. Фоновую окраску отмывали кипячением в дистиллированной воде в течение 20 – 30 мин.

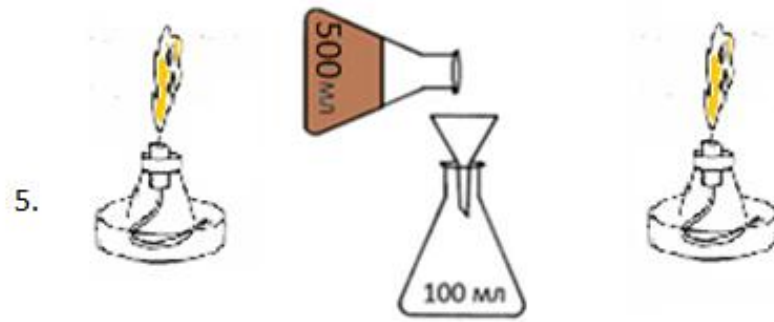
ПРИЛОЖЕНИЕ 18**Определение концентрации белка методом Брэдфорда**

Для определения концентрации белка использовали метод Брэдфорда (Bradford, 1976). Для определения концентрации белка брали разные (обычно кратные) объемы раствора белка, доводили исходным буфером объем образцов до 1600 мкл, добавляли 400 мкл реактива Брэдфорда: 0.05% (w/v) кумасси бриллиантовый синий; 42,5% (w/v) H_3PO_4 ; 24% (v/v) этанол. Образцы тщательно перемешивали и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Через 30 мин измеряли оптическую плотность образцов на длине волны 595 нм относительно «нулевого образца», не содержащего белка.

Концентрацию белка определяли на основании калибровочной прямой. Калибровочную прямую строили для БСА с известной концентрацией.

ПРИЛОЖЕНИЕ 19

Выведение штаммов бактерий Сенной палочки (*Bacillus sp.*)



Фильтрация культуральной среды
в стерильной атмосфере

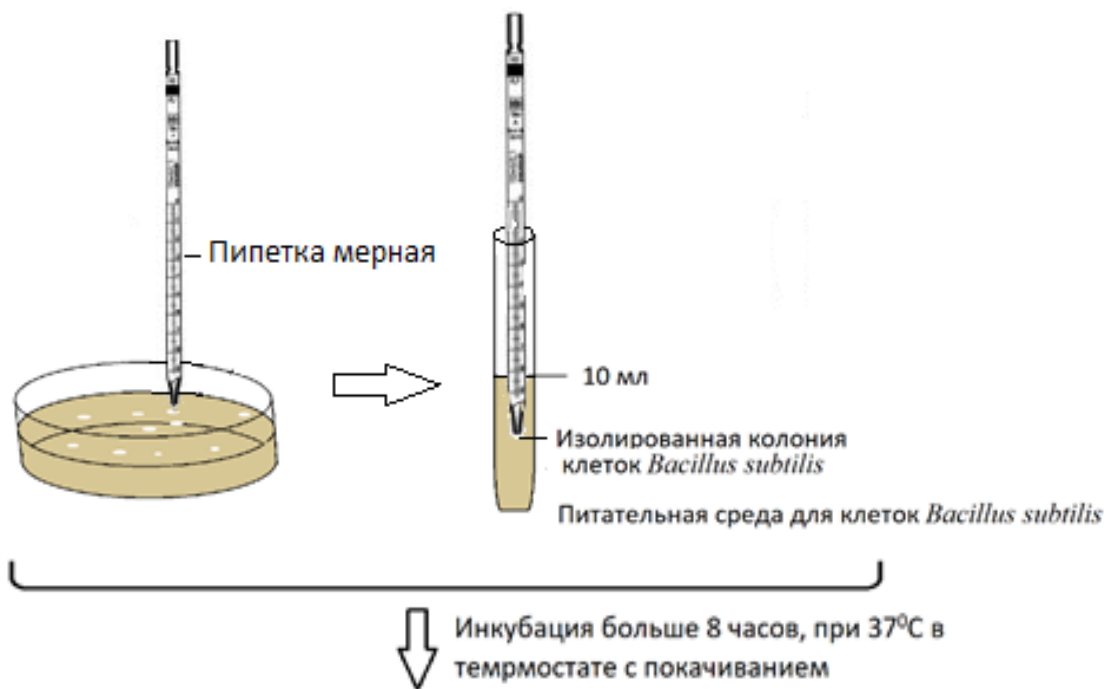


Инкубация 5 суток при 37°C

ПРИЛОЖЕНИЕ 20

Выделение геномной ДНК *Bacillus sp.*

1. Получение ночной культуры клеток *Bacillus sp.*



2. Осаждение клеток.



3. Разрушение клеточной оболочки и переход ДНК в раствор.

