

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Симахина Аделия Сергеевна

**Маркирование зеленым флуоресцентным белком
пробиотического штамма *Bacillus subtilis* ЗН для возможности
быстрой его детекции в различных отделах ЖКТ**

Руководитель:

профессор, д.б.н.

А. Х. Баймиев

Уфа – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Краткая историческая справка открытия пробиотиков.....	7
1.2. Пробиотики.....	8
1.3. Бактерии <i>Bacillus subtilis</i>	15
1.4.Использование <i>Bacillus subtilis</i> в качестве пробиотического штамма.....	17
1.5.Трансформация и естественная компетентность клеток <i>B.subtilis</i>	21
1.6 Молекулярные векторы.....	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1. Выделение и очистка плазмидной ДНК <i>Escherichia coli</i>	36
2.2. Полимеразная цепная реакция.....	39
2.3.Аналитический гель-электрофорез ДНК в неденатурирующих условиях.....	40
2.4. Расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами.....	41
2.5. Лигирование ДНК с помощью ДНК-лигазы фага Т4.....	42
2.6. Подготовка химически компетентных клеток <i>Escherichia coli</i>	43
2.7.Трансформация компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> плазмидной ДНК.....	44
2.8.Подготовка компетентных клеток <i>Bacillus subtilis</i> и трансформация.....	44
2.9.Микроскопирование.....	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	48
ВЫВОДЫ	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	56

ПРИЛОЖЕНИЕ.....	64
-----------------	----

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы отмечается радикальный пересмотр роли микроорганизмов в обеспечении жизнедеятельности человека. Все больше данных за то, чтобы система «микробиота-человек» рассматривалась в качестве новой гармонизированной формы существования живых организмов, именуемой «суперорганизм», поскольку целый ряд описанных для данной системы связей реализуется на метаболическом уровне [Eberl, 2010]. Например, показаны корреляции между изменениями микробиоты кишечника человека, продуктами микробного происхождения и уровнем экспрессии генов, определяющих синтез гормонов в организме хозяина [Neuman, 2015].

Указанное обозначило целый ряд методических задач, без решения которых, существенно снижаются темпы получения новых научных данных о поведении бактерий в сложных модельных системах, например, таких, как желудочно-кишечный тракт [Marco, 2006]. К числу таких задач можно отнести необходимость флуоресцентного маркирования штаммов посредством клонирования соответствующих генов, обеспечивающих витальную экспрессию флуорофоров, что позволит исследовать *in vivo* как закономерности колонизации кишечника [van Zyl, 2015], так и особенности симбиотических взаимоотношений, например, почвенных микроорганизмов, имеющих сельскохозяйственное значение [Баймиев, 2011].

Вместе с тем перечень флуоресцентных белков, применимых для прижизненного маркирования микроорганизмов относительно невелик, поскольку для их практического использования они должны соответствовать ряду критериев. В частности, интенсивность их свечения должна превышать уровень исходной аутофлуоресценции клетки. Флуорохромный белок должен быть фотостабильным, что позволит

обнаруживать его в течение длительного периода. И, наконец, не должен быть токсичным для экспрессирующей его клетки [Kilaru, 2015]. Одним из первых белков, который соответствовал всем перечисленным требованиям, был зеленый флуоресцентный белок экворин (GFP, в присутствии ионов Са - голубой), выделенный из медузы *Aequorea victoria* [Shimomura, 1962]. Ген GFP был впервые клонирован в 1992 году [Prasher, 1992], а впоследствии эффективно экспрессировался как в прокариотических, так и эукариотических клетках [Chalfie, 1994; Inouye, 1994]. Однако стоит отметить, что для образования зрелого белка необходима температура ниже 37 градусов, так как в естественных условиях медуза обитает в холодных водах. В настоящее время целесообразнее применять белок TurboGFP выделенный из копеподы *Pontellina plumata*, со способностью к эффективному фолдингу при более высоких градусах цельсия [Зубова, 2006]. Сейчас он успешно применялся на широком круге хозяев для установления внутриклеточной локализации и динамики белков, при изучении механизмов экспрессии и межмолекулярных взаимодействий, в качестве биосенсора [Voss, 2013].

Одним из общепризнано безопасных и наиболее биотехнологически популярных биологических объектов в последние годы становятся *Bacillus subtilis*. Это связано с доказанной возможностью получения при использовании указанных бактерий различных ферментов и сверхэкспрессии целого ряда рекомбинантных белков, представляющих интерес для фармацевтики и промышленности, таких как амилаза [Chen, 2015], липаза [Lu, 2010], щелочная полигалактоуронатлиаза [Zhang, 2013]. Кроме того *B.subtilis* формируют культуры очень высокой плотности, продуцируемые субстраты выделяются в культуральную жидкость, из которой они могут быть выделены и очищены. Несмотря на это до настоящего времени надежные способы маркирования *Bacillus subtilis* не разработаны.

В связи с этим целью настоящего исследования стало получение пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 3Н, флуоресцентно меченного флуоресцентным белком TurboGFP из копеподы *Pontellina plumata*.

Для решения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Создать генно-инженерную конструкцию, несущую ген флуоресцентного белка под управлением сильного промотора.
2. Провести трансформацию клеток *Bacillus subtilis* 3Н созданной генно-инженерной конструкцией.
3. Провести скрининг флуоресцентно-меченных клонов бактерий.
4. Сравнить интенсивность флуоресцентного свечения полученного маркированного штамма *B.subtilis* 3Н со штаммом *E.coli*, несущим тот же ген *gfp*.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Краткая историческая справка открытия пробиотиков

Учение о значении микрофлоры для организма-хозяина тесно связано с именем великого русского ученого, лауреата Нобелевской премии за 1908 год Ильи Ильича Мечникова [Блат, 2011]. В своей работе «Этюды оптимизма» (1911 г.) ученый отмечал многочисленные ассоциации микробов кишечника человека, в значительной степени определяющих его состояние здоровья как духовное, так и физическое, а о кожных и слизистых покровах человека писал, как о своеобразной биопленки из сотен видов бактерий и вирусов. Его гипотеза состояла в том, что долголетие болгарских, турецких и армянских народов связано с характерными чертами их диеты в течении жизни: они потребляют изобилие сброженного молока каждый день. Мечников идентифицировал две бактерии в йогурте: *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*, им он и приписал указанные свойства. Например, считал, что большая продолжительность жизни людей тесно связано с удалением микроорганизмов, оказывающих условно-патогенный эффект, и предложил с такой целью заселять болгарской молочнокислой палочкой ЖКТ. В те же года появился первый кисломолочный продукт, получивший название «Простокваша Мечникова», он разработал лечебную диету с добавлением предварительно ферментированного болгарской палочкой молока. В монографии «Этюды о природе человека» И.И. Мечников высказал философский взгляд о взаимоотношении человека и его микробиоты: «дикие и вредные бактерии в кишечнике» не могут находиться внутри человека, и должны быть «удалены» из него при помощи простокваши и входящих в ее состав молочнокислых бактерий [Лазебник, 2010].

В 1917 году, до того, как был открыт сэр Александром Флемингом пенициллин, немецкий профессор Альфред Ниссле выделил из фекалий солдата Первой мировой войны непатогенный штамм *E.coli*, не вызывающий развития энтероколита во время тяжелой эпидемии шигеллеза. Заболевания ЖКТ и ранее часто лечились жизнеспособными непатогенными микроорганизмами для изменения или замещения кишечных бактерий. Штамм кишечной палочки Ниссле 1917 – один из немногих примеров пробиотиков.

Анри Тиссье (Пастеровский институт) впервые изолировал бифидобактерию от новорожденного, получавшего грудное кормление, и назвал ее *Bacillus bifidus communis*. Он выдвинул утверждение: бифидобактерии могут заменить протеолитические бактерии, которые вызывают диарею, и рекомендовал введение таковых новорожденным, страдающим от данного синдрома.

В 1965 г. Лилли и Стиллуэлл впервые предложили понятие «пробиотики». В отличие от антибиотиков, их обозначали как микробные факторы, стимулирующие рост нормофлоры. А в 1989 г. Рой Фуллер высказал и свое мнение по отношению к применению пробиотиков, выдвинув мысль об их терапевтических эффектах у больных.

1.2. Пробиотики

Ученым удалось выяснить, что общий вес бактерий в теле здорового человека составляет около 2 килограмм, получается, что их суммарное количество больше его собственных клеток. Преимущественно они располагаются в отделах кишечника, где выполняют определенные функции. Например, выступают в роли помощников, помогая переваривать пищу или подавляя деятельность патогенных бактерий. Но

под влиянием факторов, таких как антибиотики, неблагоприятные условия среды, стрессы и многое другое, данное равновесие часто нарушается, и собственной микрофлоре не всегда удается его восстановить. В таком случае прибегают к использованию пробиотиков - одних из альтернативных средств медицины.

Пробиотиками или эубиотиками называют жизнеспособные микроорганизмы и микробные вещества, способные при естественном способе введения оказывать позитивное терапевтическое действие на физиологические, биохимические и иммунные реакции макроорганизма вследствие оптимизации его микробиологического статуса [Коровина, Захарова, 2004]. Препараты, составляющими которых являются эти микробы, обширно используются еще с давних времен в качестве биологических активных добавок к пище, в молочных продуктах – йогурты, бифидок, биокефир и др. Пробиотические штаммы успешно применяют для различных целей, например, для стимуляции неспецифического иммунного ответа, профилактики и лечения смешанных желудочно-кишечных заболеваний, расстройств пищеварения алиментарной этиологии (дисбактериозы, острые молочнокислые ацидозы и др.), часто возникающих вследствие резкого изменения состава пищевого рациона, нарушения режимов кормления, технологических стрессов, воздействия окружающей среды и многих других причин [Ноздрин, 2009].

Целебный эффект пробиотикотерапии производится через нормализацию микробиоты за счет факторов:

а) ингибирование роста потенциально вредных агентов в результате продуцирования веществ, подавляющих развитие - антибиотиков;

б) стимуляция развития и размножения представителей нормофлоры из-за продукции витаминов, различных ростовых факторов, нормализации рН, нейтрализации токсинов;

в) влияния на микробные обменные процессы: увеличение или уменьшение активности энзимов [Манвелова, 1997; Шевелева, 1999; Шендеров, Salminen, 1998; Rowland, 1995].

Препараты-пробиотики абсолютно безвредны для пациента даже в тех концентрациях, которые значительно превышают указанные для их использования, а некоторые штаммы способны существенно повышать неспецифическую резистентность макроорганизма [Ноздрин, 2009; Белоусов, 1998; Бессарабов, 1983, 1988; Белов и др., 1991; Антипов и др., 1980, 1995; Коршунов и др., 1996, 1999; Антипов и др., 1980]. На сегодняшний день выявлены положительные эффекты при лечении ревматоидного артрита, гнойных осложнений в хирургической практике, инфекций, вызывающих заболевания мочеполовых путей, а так же гинекологические воспалительные процессы. Эти и многие другие данные представляют собой основание утверждать, что спектр применения пробиотиков в медицине расширяется. [Ноздрин, 2009; Тараканов, 2000].

Специалисты относят к бактериям-пробиотикам, представителей нормальной флоры кишечника и других полостей организма. Это чаще всего бифидо- и лактобактерии. Считается, что эти микроорганизмы колонизируют ЖКТ и, обычно, являются постоянными его обитателями, способны брать на себя основную иммунную защиту хозяина, в то время как другие микроорганизмы являются транзиторными. Однако имеется достаточно фактических данных, свидетельствующих о наличии пробиотических свойств и у ряда других микроорганизмов, таких как кишечные палочки и фекальные энтерококки, а также пропионибактерии, бациллы, грибы и дрожжи [Кульчицкая, 2001]. Виды эубиотиков, используемые в состав препаратов:

- Escherichia coli*,
- Bifidobacterium adolescentis*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.Longum*,
- Enterococcus faecalis*, *E.faecium*,
- Bacillus subtilis*,
- Lactobacillus acidophilus*. *L.casei*, *L.delbrueckii subsp. bulgaricus*,
- L.helveticus*, *L.fermentum*, *L.lactis*, *L.rhamnosus*, *L.salivarius*,
L.plantarum,
- Saccharomyces boulardii* ,
- . *Pediococcus* spp.,
- Lactococcus* spp.,
- Propionibacterium acnes*,
- Leuconostoc* spp.,
- Streptococcus cremoris*, *S. lactis*,,
- Clostridium butiricum*.

Классификация, основанная на способе технологического производства современных пробиотиков. Различают две группы:

I - препараты, которые изготавливаются с использованием метода лиофилизации субстрата живых активных штаммов. Данные препараты выпускают в виде порошка, капсул, таблеток или свечей. К преимуществам можно отнести то, что данные формы имеют длительные сроки годности и не требовательны к непродолжительным изменениям условий (температура) при хранении. Существенный недостаток - процесс лиофилизации приводит бактерий в анабиоз, то есть к временной приостановке жизнедеятельности. Далее для восстановления активного

физиологического состояния затрачивается около 8-10 часов, за которые большая часть бактерий успеет вывестись из макроорганизма. Кроме того, в процессе лиофильной сушки микроорганизмы теряют специфические рецепторы адгезии, помогающие им закрепляться на поверхностях, из-за этого время их пребывания в кишечнике уменьшается.

При производстве II группы - жидких «живых» эубиотиков бактерии не впадают в анабиоз, а способны к колонизации ЖКТ уже через 2 часа [Запруднов, 2001].

Природа составляющих компонентов и формы использования препаратов так же играют большую роль, на основе этих критериев различают:

- препараты, содержащие микроорганизмы в активном состоянии (монокультуры или их комплексы);
- препараты, содержащие лишь структурные компоненты нормофлоры или их метаболиты;
- препараты микробного или иного происхождения, стимулирующие рост и активность в норме колонизирующих микроорганизмов;
- препараты – комплексы, в состав которых входят как живые микроорганизмы, так и их структурные компоненты, и продукты жизнедеятельности в различных сочетаниях и соединениях, стимулирующих рост представителей нормофлоры;
- препараты на основе живых генно-инженерных штаммов, их структурных компонентов и метаболитов с заданными заранее характеристиками;
- продукты функционального питания на основе активных микроорганизмов, их продуктов метаболизма и различных соединений микробиологического происхождения, которые способны поддерживать и

восстанавливать здоровое состояние пациента через коррекцию микробиоценоза организма-хозяина [Бондаренко, 1995].

Существуют определенные требования, предъявляемые к используемым штаммам:

- свойство продуцировать биологически активные субстанции, способные обуславливать их антагонизм *in vitro*. Продуцирование таких веществ, как органические кислоты, бактериоцины, ингибиторы адгезии для посторонних микробов является значимым селекционным критерием. Однако не стоит забывать, что проявление большинства из этих свойств продемонстрировано в лаборатории, а действие внутри живого объекта еще неопределенно;

- в качестве пробиотиков следует использовать не инвазивные, не канцерогенные и непатогенные штаммы, которые не будут антагоничны в отношении представителей нормофлоры организма [Ноздрин, 2009];

- не терять целебные свойства и оставаться активными при транспортировании: пищевые продукты, препараты;

- бактерии обязаны демонстрировать устойчивость к желчи, фенольным веществам, наиболее популярным антибиотикам;

- штаммы, которые не являются в норме обитателями ЖКТ, обязаны проходить транзитом через организм.

В процессе отбора культуры для приготовления препаратов следует руководствоваться критериями [Тарakanов, 2000]:

- микроорганизмы обязаны являться представителями нормальных обитателей ЖКТ здоровых хозяев, не проявлять токсичных свойств и факторов патогенности, ведь применение иных способно вызвать непредвиденные эффекты;

- должны обладать метаболической активностью в системе рубца (в случае применения для жвачных), переносить пассаж через желудок и выделять необходимые продукты жизнедеятельности в кишечнике моногастальных животных и птицы, повышая тенденцию к их росту или резистентность к заболеваниям;

- обладать способностью к адгезии по отношению к эпителию и приживляться в пищеварительной системе, где активность ферментов, связанная с перевариванием еды, высока, а среда агрессивна;

- сохранять стабильность и биологическую активность продолжительное время, удовлетворяя технологическим регламентам при хранении в производственных условиях. Это важно, ведь использование в промышленности не исключает изменение функциональных свойств штаммов через некоторое время [Бондаренко, 2007].

Более терапевтически значимое действие оказывает совместное использование нескольких штаммов, способных взаимно дополнять друг друга и не оказывающих антагонистического свойства [Сидоров и др., 2000].

Современные пробиотики (линекс, лактобактерин, бифидумбактерин и пр.) относятся к группе биотерапевтических, т. е. лечебных. Принцип их действия: наличие у составляющих бактерий определенных качеств: оставаться жизнеспособными при низких значениях pH, эффективное прикрепление к эпителиоцитам слизистого покрова кишечной стенки и дальнейшая колонизация, продуцирование антимикробных веществ, стимуляция иммунных ответов, предупреждение избыточного развития микроорганизмов, в норме не присутствующих в кишечнике, и восстановление численности микробиоценоза хозяина [Хавкин, 2006].

Таким образом, продвигаясь по пищеварительной системе, пробиотики не теряют активность и способны временно оказывать

полезное действие в отношении микрофлоры желудочно-кишечного тракта.[Урсова, 2005]. Они включаются в питание в виде лиофилизированных порошков - диетические добавки, содержащие лакто – и бифидобактерии, их комбинации, могут отпускаться без рецепта и применяться для поддержания гомеостаза организма в целом [Кульчицкая, 2001], обеспечивая благоприятное самочувствие и здоровье. Поэтому разрешение на производство и применение таких препаратов в качестве диетических добавок от государственных структур, контролирующих создание лекарственных препаратов (в США - Food and Drug Administration: FDA, а в России - Фармакологический комитет и Комитет медицинских и иммунобиологических препаратов МЗ РФ) не требуется [Bmer, 1999; Kailasapathy K.A., 2000.; Roberfroid, 2000].

1.3. Бактерии *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis - грамположительная палочка крупного размера с закругленными концами (1,0-1,3 x 4,6-5,5 мкм). Подвижные (перитрихи), способны образовывать центральную спору овальной формы. Является хемоорганотрофом, встречающимся практически повсеместно: пресная и морская вода, сомнительной чистоты почва (преимущественно содержащая навоз и фекалии). Принимают активное участие в аммонификации (разлагает белки и нуклеиновые кислоты), минерализует органический азот, обеспечивает пополнение запасов минерального азота в земле. Процесс спорообразования не подавляется экспозицией на воздухе. Содержание ГЦ пар в ДНК исследованных штаммов варьирует от 32 до 62 мол.% [Садунова, 2014].

Как и у грамотрицательной бактерии, содержимое грамположительных ограничивает фосфолипидная плазматическая мембрана, к составляющим которой относят интегральные белки мембран

и сложные липиды, образовавшиеся вследствие присоединения липидов к углеводам - гликолипиды. Содержимое клетки окружает толстая клеточная стенка (20-80 нм), главный ее структурный компонент – пептидогликан, образующий трехмерный волокнистый матрикс, число слоев которого доходят до 40. Полисахара пептидогликана связываются друг с другом при помощи пептидных цепочек. Пептидогликановый матрикс стенки ковалентно связан с другими ее макромолекулярными компонентами, имеющимися только у грамположительных бактерий, — тейхоевые кислоты. Эти растворимые в воде полимеры, которые содержат остатки рибита или глицерина, соединены с помощью фосфодиэфирных связей. Цепь тейхоевой кислоты может быть длинной и составлять до 30 и более элементов. Данные образования располагаются перпендикулярно поверхности плазматической мембраны и соединены с пептидогликаном через гидроксильные группы при атомах С6 остатков N-ацетилмурамовой кислоты. Составляющими стенки большинства окрашивающихся положительно по Граму бактерий, как правило, не являются липиды и белок.

Еще одно основное отличие в структуре их клеточных стенок - это то, что белок, который способен преодолевать плазматическую мембрану грамположительных клеток, секретируется из цитоплазмы во внешнюю среду, а у других бактерии белок для выхода из клетки должен преодолевать дополнительный барьер - внешнюю мембрану. Кроме того, первые высокочувствительны к воздействию лизоцима, расщепляющего в пептидогликане гликозидные связи между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина) и пенициллиновых антибиотиков (их действие - предотвращение синтеза клеточной стенки) [Щелкунов, 2010 г].

Бациллы вызывают порчу таких продуктов питания, как картофель, хлеб, молоко и др. *Bacillus subtilis* отличается высокий и разнообразный спектр биологической активности: являются антагонистами по отношению

к патогенным микробам, продуцируют целый ряд энзимов, которые лизируют крахмальные и пектиновые соединения, целлюлозу, жиры, белок, относятся к продуцентам различных аминокислот и антибиотиков [Смирнови др, 1995; Godic, 2003; Sharp, 1989]. На Востоке есть такая традиция - ферментация многих продуктов питания с помощью бактерий. В качестве примера можно привести японское национальное блюдо натто — специальным образом ферментированные бобы при помощи штамма *Bacillus natto (subtilis)* [Hosoi, 2003]. В отношении человеческого ЖКТ бактерии рода *Bacillus* относятся к аллохтонным микроорганизмам, которые попадают внутрь обычно двумя способами: случайным поеданием совместно с пищей, либо осознанного употребления ферментированных продуктов питания [Красочко, 2010].

1.4. Использование *Bacillus subtilis* в качестве пробиотического штамма

Несмотря на то, что большинство пробиотических бактерий - это представители лактобацилл и бифидобактерий, не так давно стали использоваться и спорообразующие микроорганизмы, такие как *Bacillus*. Эти бактерии являются относительно постоянно присутствующим компонентом внутреннего микроокружения человека и выделяются от остальных рядом преимуществ:

1) безопасность по отношению к хозяину даже в больших концентрациях (исключениями являются представители: *B.anthraxis* и *B.cereus*);

2) при пероральном попадании в ЖКТ обладают способностью значительно повышать неспецифическую иммунную систему;

3) являются сильными антогонистами по отношению к большому числу представителей патогенных и условно-патогенных микробов;

4) им присуща высокая ферментативная активность, которая регулирует и стимулирует пищеварение, оказывает антитоксический и противоаллергенный эффект [Сорокулова, 1997];

5) стабильны при технологичном производстве и в процессе хранения (секретируемый белок выводится непосредственно в среду роста, что значительно упрощает их дальнейшую очистку).

6) экологической безопасностью, имеют статус GRAS (*generally regarded as safe*) [Ноздрин, 2009].

Представители *Bacillus* - это одна из наиболее разнообразных и коммерчески полезных групп микроорганизмов. Способность некоторых штаммов выдерживать высокие или низкие температуры и высокие или низкие значения pH сделала их важными источниками получения коммерческих препаратов ферментов [Садунова, 2014].

Таблица 1. Спектр действия пробиотических препаратов, действующим компонентом которых являются спорообразующие представители рода *Bacillus* [Бакулина, 2001].

Действие	Процессы, обеспечивающие это действие
Подавление роста патогенных и условно-патогенных микроорганизмов	Синтез антибиотиков, закисление pH среды, высокая конкурентная способность в процессе размножения.
Нормализация пищеварения	Синтез пектолитических, протеолитических ферментов, липазы

Действие	Процессы, обеспечивающие это действие
Стимуляция неспецифической резистентности макроорганизма	Стимуляция активности лимфоцитов, макрофагов, индукция эндогенного α - и γ - интерферона, увеличение содержания гамма – глобулиновой фракции крови.
Антитоксическое действие	Дезинтеграция высокомолекулярных белков. Способность к связыванию тяжелых металлов.
Антиаллергическое действие	Расщепление аллергенов на биологически инертные субъединицы.
Восстановление эндогенной микрофлоры, коррекция микробиоценоза	Филогенетическая общность представителей нормальной симбионтной микрофлоры.
Синтез заменимых и незаменимых аминокислот и витаминов	Экзоцеллюлярная продукция треонина, глутаминовой кислоты, аланина, валина, тирозина, гистидина, орнитина и др.
Выведение тяжелых металлов и радионуклидов	Сорбирование тяжелых металлов и радионуклидов в сочетании с быстрой элиминацией.
Противоопухолевая и антиметастотическая активность	Стимуляция естественных Т-киллеров и Т-лимфоцитов, стимуляция макрофагов.

Несмотря на тот факт, что бактерии рода *Bacillus* в норме не относятся к естественному микроокружению человека и не должны колонизировать его кишечный тракт, стоит отметить существование более двух десятков пробиотиков, изготовленных на основе видов: *coagulans*,

subtilis, *clausii*, *cereus*, *toyoi*, *lichemiformis*, *mesentericus*, *polymyxa* и др [Красочко, 2010], оказывающих несомненно высокий терапевтический эффект.

Особенность *B.subtilis* состоит в том, что она выделяет в окружающую среду разнообразные ферменты, которые деградируют пектины, полисахариды, белки, а также образует широкий спектр полипептидных антибиотических веществ с выраженной антимикробной активностью по отношению к бактериям как грамположительных, так и грамотрицательных. Стоит отметить, что данная бактерия относится к облигатно – аэробным микроорганизмом. По этой причине при назначении пробиотиков на основе *B.subtilis*, они не увеличиваются в численности в ЖКТ, и наблюдаемые явления в момент терапии, вероятно, наиболее обусловлены присутствующими в концентрате образовавшимися в период наращивания биомассы продуктов жизнедеятельности - антибиотическими веществами и ферментами. [Шендеров, 1998; Данилевская, 2008]. Именно они оказывают терапевтический эффект - способствуют подавлению интенсивного роста патогенных микроорганизмов, следствием которого является стимуляция механизмов иммунной защиты организма-хозяина [Резник и др., 1988].

Так же стоит отметить, данные ряда авторов, утверждающих, что некоторые виды *Bacillus* могут использоваться в качестве вектора доставки и экспрессии белков с фармакологической или иммунологической активностью и являются важным арсеналом совершенствования биопрепаратов [Ouwehand et al., 2003; Sanders et al., 2003; Сорокулова, 1997].

Из всего вышесказанного следует, что у пробиотиков на основе *Bacillus* отмечается многообразие механизмов лечебно-профилактического действия. Так, у пациентов с различными острыми и хроническими заболеваниями ЖКТ, позитивный эффект происходит благодаря

антагонистическим свойствам бацилл, в одних случаях, либо за счет секреции ими ферментов, стимуляции защитных реакций макроорганизма. Но, как правило, более высокое действие проявляется при участии одновременно несколько механизмов [Ноздрин, 2009].

1.5. Трансформация и естественная компетентность клеток *B.subtilis*

Важная стадия при выполнении генно-инженерного эксперимента — это встраивание модифицированных *in vitro* молекул ДНК в клетку — реципиент с целью увеличения их численности и отбора клонов с заданными свойствами. Процесс, в следствие которого экзогенная генетическая информация попадает в реципиента и, тем самым, приводит к наследуемым изменениям, получило название трансформация. Трансформация клеток может проводиться плазмидами — молекулы ДНК линейной и кольцевой формы, способные реплицироваться автономно, которые встраиваются в геном клетки. Генетически трансформированные клетки именуются трансформантами. Результативность данного процесса, как правило, выражается количеством трансформированных культур. Но стоит отметить, что не все клетки способны к встраиванию чужеродной ДНК естественным путем. Потому восприимчивость к экзогенной ДНК у организмов индуцируют различными способами - индуцированная компетентность, например, прибегают к каким-либо физическо-химическим манипуляциям. Клетки различаются по строению клеточных стенок и плазматических мембран, различным другим свойствам, и, чтобы вызвать у них способность к естественной компетентности, прибегают к определённым для каждой группы клеток способам.

Изначально получение компетентных для трансформации бактерий осуществляли путем гидролиза их клеточных стенок ферментами, в результате которого происходит удаление препятствующего физического барьера на пути проникновения вектора в клетку. Действующим веществом служат такие ферменты, как лизоцим, или их смеси - пищеварительный сок виноградной улитки. При такой обработке реципиенты необходимо помещать в изотонический раствор (0,2 М сахара; 1 М сорбит; 0,6 М KCl и др.), осмотическое давление которого примерно равно цитоплазматическому. В результате таких манипуляций бактерии лишаются своей жесткой клеточной стенки и становятся шарообразными, при этом не лопаются от осмотического шока, наблюдаемого в гипотонической среде.

Если же путем гидролиза лишить клетку естественного жесткого физиологического барьера, оставив при этом только плазматическую мембрану, ограничивающую внутреннее содержимое, возникает чувствительный к осмотическому давлению протопласт. Но если все-таки после этого процесса на плазматической мембране остаются фрагменты клеточной стенки или сохраняется внешняя мембрана (как происходит с грамотрицательными бактериями), то такие клетки носят название сферопласты.

Среди на сегодняшний день известных грамположительных бактерий лишь у немногих из них обнаружена физиологическая восприимчивость к захвату молекул ДНК. В качестве примера можно привести хорошо знакомую всем бактерию *Bacillus subtilis*, компетентность которой впервые продемонстрировал Дж. Спицайзен в 1958 г. Затем благодаря дальнейшим исследованиям удалось более эффективно изучить этот процесс. Так, у *B. subtilis*, как и у остальных бактерий, которые восприимчивы к естественной трансформации, это свойство проявляется лишь на определенном этапе в процессе

размножения культуры. Для стимуляции клетки к захвату ДНК, их выращивают на богатой питательной среде, а затем переносят на бедную по составу среду, где отсутствуют белки, необходимые ауксотрофным мутантам. Максимальная возможность, как правило, представляется на поздней стадии логарифмического роста культуры *B.subtilis*. Компетентные клетки могут храниться при температуре -70 °С (при добавлении глицерина до 10 % по объему) с сохранением естественной восприимчивости по крайней мере в течение 6 мес.

Количество компетентных клеток невелико и составляют не более 5-10 % всей популяции бактерий. Их отличает от некомпетентных клеток состав и свойства клеточной стенки, сниженный поверхностный заряд и высокая чувствительность к осмотическому шоку. Чувствительными они становятся вследствие обнаженных участков на плазматической мембране, ведь именно с ними и взаимодействует экзогенная ДНК. Так же стоит подчеркнуть, что такие бактерии характеризуются пониженной метаболической активностью и меньшими размерами по сравнению с обычными клетками. Процесс формирования компетентного состояния у *B. subtilis* регулируют не менее семи генов. Два из которых начинают выполнять свою функцию начиная с ранних этапов роста культуры, а экспрессия остальных индуцируется в период перехода клеток в восприимчивое состояние, т. е. является специфичной стадией. Белки, обеспечивающие компетентность *B.subtilis*, участвуют в процессах связывания (адсорбции), проникновения и встраивания в донорную ДНК.

Через некоторое время после адсорбции экзогенной ДНК совершаются разрывы между цепями, и она расщепляется на небольшие по длине фрагменты, длина которых 14 тпн. После этого одна цепь фрагмента ДНК подвергается гидролизу специфичной нуклеазой, а другая проникает в клетку, частично разрушаясь с концов в результате ферментативной

атаки. Считается, что источником энергии для проникновения ДНК через ограничивающую протопласт мембрану служит протондвижущая сила.

Связать реципиента с экзогенной ДНК помогает белок 38,5К. Он активируется в момент компетентного состояния клетки и имеет молекулярную массу 38,5 кДа. В свое время Б. Восман с соавторами (1988 г.) продемонстрировали важное значение для дальнейших этапов трансформации и других белковых комплексов – это 70К, 14К и 28К. Расположенный на плазматической мембране белок 70К состоит из пары субъединиц специфичной нуклеазы 17К и двух субъединиц 18К, функция которых заключается в регулировании активности данного фермента. (Существует мнение, что 18К действует как ингибитор нуклеазы 17К, предотвращая тем самым чрезмерный гидролиз информационной молекулы). Комплексы 14К и 28К также относятся к нуклеазам, специфичным в период компетентного состояния. При этом, белок 14К синтезируется в следствие процессинга нуклеазы 17К, а 28К - это димер 14К.

Благодаря долгим годам упорной работы по изучению процесса трансформации удалось сформулировать ее наглядную модель (рис 1). После того, как в бактерию проник одноцепочечный фрагмент ДНК, он при участии специфических белков может интегрироваться в гомологичную область хромосомы. В основе этого процесса лежит явление синапсиса (спаривания обеих ДНК), результатом которого служит образование синаптической структуры. Далее внутри нее происходят рекомбинация и репарация разрывов в молекуле ДНК, осуществляется ковалентное встраивание чужеродной ДНК в бактериальную хромосому. При этом мутантный локус заменяется (спасается) на локус дикого типа, присутствующий в ДНК донора, что можно легко выявить на соответствующих селективных средах.

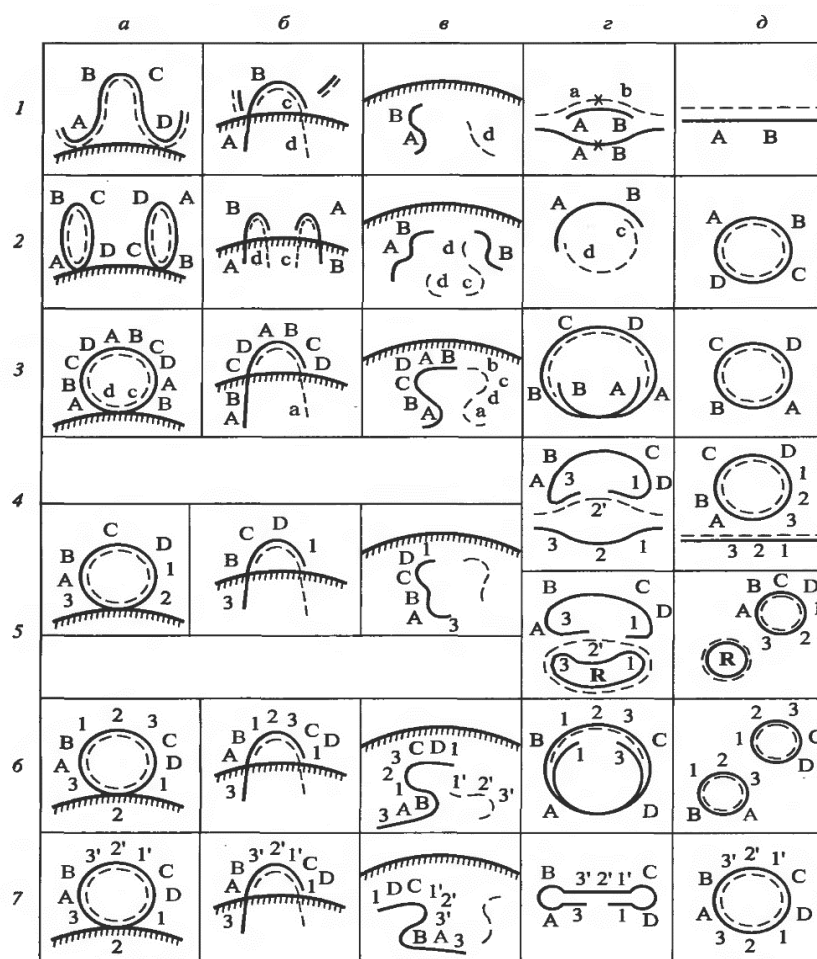


Рисунок 1. Модели трансформации компетентных клеток *B. subtilis* разными типами молекул ДНК (1-7) [Щелкунов, 2010].

Этапы трансформации: а — связывание ДНК с компетентными клетками; б — фрагментация и начало вхождения цепей ДНК в клетку; в — завершение процесса вхождения цепей ДНК; г — комплементарное взаимодействие цепей ДНК внутри клетки (синапсис); д — образование конечных продуктов

С. Контен и Д. Дубнау во второй половине XX века выдвинули предположение о том, что ход формирования компетентности бактерий *Bacillus subtilis* подобен компетентности для хромосомной трансформации, а соотношение количества мутантов к концентрации введенной в них ДНК подчиняется зависимости 1-го порядка. Таким образом на одну реципиентную клетку приходится одна плазмида.

Поразительно, но для достижения наиболее эффективной трансформации необходима лишь мультимерная форма плазмид, отличительным признаком которой является полный плазмидный геном, повторяющийся в прямой ориентации («голова к хвосту») не один раз. Обычно эти формы в препаратах плазмид всегда имеются в малом количестве, и им, как правило, не уделяют должного внимания. Продуктивность же трансформации специально для этого очищенной мономерной суперкольцевой ДНК в 103-104 раз меньше, чем нефракционированным препаратом плазмиды с наличием в нем и мультимерных форм.

В ходе экспериментов была выявлена закономерность, суть которой заключается в том, что плазмидная ДНК проникает в подготовленные для трансформирования *B.subtilis* в виде линейных одноцепочечных структур. При этом цепи нуклеиновых кислот в значительной степени деградируются с концов, и при введении в компетентные бактерии мономерных плазмид для образования трансформанта необходимо, чтобы в клетку попало не менее двух молекул. Однако это не характерно для мультимерных форм плазмид, т.к. для обеспечения процесса достаточно единичной молекулы.

Ученые создали несколько моделей, иллюстрирующих модификацию *B.subtilis* при помощи плазмид. Использование мономерных форм (см. рис. 1, 2) приводит к образованию полноценной плазмиды крайне редко. Дело в том, что способная к автономной репликации ДНК, проникая в компетентную клетку, расщепляется в произвольной точке, а образующаяся цепь гидролизует с концов нуклеазами. Для мультимера (5) вероятность формирования пригодной для трансформации плазмиды значительно увеличивается. Более того, как показал Д. Дубнау, частота плазмидной трансформации достаточно велика только при использовании

тримеров или мультимеров более высокого порядка. При этом процесс не зависит от системы генетической рекомбинации реципиента.

Рестрикционный комплекс трансформанта не оказывает воздействия на повышение продуктивности процесса, поскольку одноцепочечная ДНК не представляет собой субстрат для рестриктаз, а в образуемом с хромосомной ДНК дуплексе одна из цепей модифицирована. Уровень плазмидной трансформации для клеток с нативной системой рестрикции-модификации снижается, причем тем сильнее, чем больше количества мест действия данного фермента существует на плазмиде. Вследствие этого можно сделать вывод: несмотря на то, что в бактерию попадают индивидуальные цепи экзогенной ДНК, велика возможность формирования ими двухцепочечных участков (см. рис. 1, г), чувствительных к действию ферментов.

Без спору, получать *in vitro* мультимерные молекулы гибридных плазмид гораздо сложнее, чем мономерные. Поэтому ученые в ходе экспериментов разработали несколько вариаций естественной трансформации с использованием мономерных плазмид.

В лаборатории Д. Дубнау в 1979 г. обнаружили: компетентные клетки *B.subtilis*, способные трансформироваться при помощи мономерных форм, при условии, что они содержат сегменты ДНК, гомологичные определенным последовательностям совместимой плазмиды, находящейся в трансформантах резидентной плазмиды. Аналогичный подход реализовали Т. Траутнер с группой ученых в 1981 г., когда встроил в трансформируемую плазмиду фрагмент хромосомной ДНК бактерии. В обоих случаях, вероятно, процесс происходит по аналогичной схеме за счет спасения донорной ДНК на гомологичных областях эндогенных информационных молекул. Такой феномен является гес-зависимым. Предполагаемый механизм данного процесса следующий (см. рис. 1,4,5). Одноцепочечные линейные фрагменты способны к автономной

репликации ДНК попадают в клетку, далее совершается разрыв в гомологичной области ДНК донорна и реципиентна, приводящий к образованию синаптической структуры. В следствие последующих событий (рекомбинация, репликация и заполнение брешей) спасается (восстанавливается структура) донорной плазмиды. В такой модели на конечный исход оказывают большое влияние как размер участка гомологии молекул ДНК, так и конформация (суперскрученность) трансформируемой ДНК.

Выполнение трансформации клеток бацилл при помощи мономерных форм имеет место быть также в том случае, если в плазмиде присутствуют протяженные повторяющиеся последовательности. При условии, что эти повторы в экзогенной ДНК прямые, трансформация ее мономерной формой происходит примерно по той же схеме, что и с помощью мультимеров (см. рис. 1, 6). Процесс модификации такими плазмидами сопровождается их распадом по повторам.

Протяженные инвертированные повторы, вполне возможно, могут обуславливать образование в ходе трансформации одноцепочечной гантелевидной структуры (когда разрыв плазмиды произошел в повторе). В итоге заполнения брешы и репликации структура плазмидной ДНК восстановится (см. рис. 1, 7).

Благодаря таким вариантам представляется возможность в той или иной степени преодолевать трудности при использовании мономерных форм плазмид. Однако не всегда введение в состав плазмидной ДНК областей гомологии с бактериальной хромосомой или протяженных инвертированных повторов означает успешную трансформацию бацилл мономерами. Дело в том, что природа вставки, дупликации или самой плазмиды важна для проявления свойств, необходимых для образования внутримолекулярной синаптической структуры. [Щелкунов, 2010].

1.6. Молекулярные векторы

Предназначенный для клонирования участок ДНК должен реплицироваться при попадании в клетку – реципиент, т.е. он должен быть репликоном. Для этого их объединяют с молекулами – переносчиками нуклеиновых кислот - генетическими векторами. Он состоит из двух частей: одна из них - векторная (носитель), другая - клонируемый чужеродный ген. Нельзя перенести ДНК в клетку без вектора, так как попав в клетку, она подвергается атаке ферментов, разрезающую ее на отдельные фрагменты. [Кузьмина, 2006].

Обязательные свойства для генетического переносчика:

1. Автономность. Это свойство подразумевает, что вектор должен иметь свой собственный сайт *ori* – точка начала репликации, желательно, чтобы она была для широкого круга хозяев. Векторы, имеющие несколько таких сайтов репликации и обладающие способностью реплицироваться в нескольких хозяевах именуются челночными;
2. Наличие промотора – контрольной области.
3. Наличие сайта встраивания желаемого объекта.
4. Обязан содержаться в клетке в определенном количестве копий – копияность плазмид (60 – 100 – 200 копий);
5. Должен иметь небольшой размер, то есть следует вырезать все лишнее – быть емким;
6. В составе векторной части должен быть полилинкер – синтетическая последовательность нуклеотидов с несколькими сайтами узнавания для ферментов – рестриктаз;
7. Маркеры – гены, позволяющие отслеживать трансформанты среди других клеток.

Как правило, различают 2 группы маркеров:

1. К первой группе относятся, так называемые, селективные маркеры. Их задача – обеспечивать антибиотикоустойчивость трансформированных бактерий. Например, мутанты не должны погибать на среде, в которой присутствуют вещества ампициллинового, тетрациклинового ряда и многие другие.

2. Репортерные гены несут в себе информацию о нейтральном для трансформанта белке. Данные структуры должны определяться в тканях макроорганизма.

Часто в качестве вектора используют плазмиды – кольцевые информационные молекулы бактерий, состоящие из двух цепей. Они способны к автономной репликации, т. е. являются внехромосомными. Так же стоит подчеркнуть, что плазида не относится к обязательным составляющим, а в некоторых случаях не обнаруживаются вовсе. Обычно, в их составе есть гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов (R-плазмиды), а также гены, контролирующие катаболизм некоторых органических соединений (плазмиды биodeградации, или D-плазмиды). Благодаря такому свойству, как способность к высокой копийности, данные молекулы ДНК снабжают клетку не малым количеством ферментов. Например, соединениями, делающие клетки резистентными к антибиотическим веществам, нейтрализуя их губительное действие. Таким образом, эти автономные генетические элементы определяют факторы устойчивости бактерий в среде.

Из-за того, что размер плазмидной ДНК сильно уступает хромосомной, ее проще выделить в чистом виде. Существуют факторы, облегчающие попадание автономных элементов в клетку. Например, если в среде имеется кальций в ионизированной форме, то бактерии способны легко вбирать в себя плазмиду и далее передавать ее потомству. Тем не

менее, природа распорядилась так, что внутри они могут находиться лишь в единственном количестве. Это свойство определяют группы несовместимости – Inc-группы. В такой группе может быть некоторое их количество, совместимых между собой, но не с другими плазмидами. У них обнаруживаются общие черты, и присутствует гомология ДНК.

Упомянутая выше копияность этих автономных элементов весьма переменчива. Если же плазмиды находятся в бактерии "под ослабленным контролем", то способны к размножению до того момента, когда их количество не достигнет 10-200 копий на клетку. Напротив, "под строгим контролем" их число увеличивается той же частотой, что и главная хромосома. Для исследователя более выгодно и удобно, чтобы тенденция к увеличению числа плазмиды не зависела от самой хромосомы.

Плазида pBR322 входит в список наиболее часто используемых для трансформации клеток. Ее сконструировали на основе естественной внехромосомной автономной молекулы кишечной палочки. Она включает в себя гены устойчивости к двум антибиотикам: ампициллину и тетрациклину, при этом в этих участках обнаружено наличие сайтов рестрикции к таким веществам. В том случае, когда фрагмент экзогенной информационной молекулы встраивается на одно из мест устойчивости, то последний инактивируется. Таким образом по утрате резистентности к ампициллину или тетрациклину, можно убедиться, что произошла мутация в одном из этих генов.

Трансплантацию экзогенной ДНК в реципиент также могут осуществлять и вирусы, которые не способны привести к гибели, а лишь встраиваются в геном. Такая интегративная форма взаимодействия приводит к формированию стабильных мутантов: вирусная информация продолжительное время сохраняется в геноме клетке-хозяина, передаваясь дальнейшим дочерним клеткам по наследству. В качестве примера можно

привести ДНК-вирусы SV-40 и вирус полиомы. В случае работы с бактериями чаще всего используют бактериофаги.

При вирусной инфекции каждый трансформант получает огромное количество копий чужеродного гена. Высокий уровень экспрессии и легкая доступность для исследования достигается благодаря сильным промоторам вируса. К недостаткам же такой системы можно отнести их маленькую емкость и узкий круг потенциальных хозяев.

Учеными были разработаны вектора – гибриды на основе ДНК фага и плазмиды. Они делятся на 2 типа. Первый тип – космиды - это плазмидные вектора со встроенным участком генома фага λ , обеспечивающий возможность упаковки информационной молекулы в фаговую частицу. Благодаря такому слиянию облегчается проникновение экзогенной ДНК в бактерию (путем инъекции), затем молекула замыкается в кольцо по липким концам и реплицируется по механизму плазмидного типа. Однако этот прием возможен при соблюдении одного обязательного условия: для упаковывания в фаг информационной молекулы необходимы *cis*-сайты. Чужеродная информация замещает собой весь фаговый геном между ними и укладывается в вирус. В ходе этой процедуры инактивируется способность к существованию, но ДНК все равно адсорбируется на поверхности потенциального трансформанта и попадает в нее.

Фазмиды тоже представляют собой синтезированную искусственно смесь фагового вектора, со встроенной в него областью с репликоном от небольшой автономной внехромосомной молекулы. Их отличительным свойством является то, что данная конфигурация имеет возможность реплицироваться по типу вируса или же по типу плазмиды.

В том случае, когда стоит цель произвести клонирование по плазмидному механизму, структуру вводят в кишечную палочку, несущие ген-репрессор, инактивирующий экспрессию генов фага.

Напротив, чтобы получить фаговую форму, прибегают к помощи термоиндукции литического развития. Таким образом, вирусная информация запускается, лизируя хозяина.

До сих пор не установлено, как именно вириодам удается провоцировать симптомы болезни в организмах растений. На сегодняшний день лишь удалось выяснить, что они реплицируются ферментами клетки-хозяина, не транслируются в видоспецифичные полипептиды и способны интегрироваться в геном.

Вирусы заражают персистентно (не происходит выздоровления), приводят к инфекции, т.е. мигрируют из места внедрения в другие его части организма механическим путем, через клеточный сок, структуры размножения. К тому же, они связаны с ядерными фракциями растений и могут размножаться в их ядрах.

При работе с вириодами синтезируют однунитевую ДНК, которая является копией РНК, затем достраивают комплементарную ей нить для создания двунитевой молекулы. После этого ее помещают в плазмиду, трансформируют в *E. coli*. Считывание гена начинается с промотора, который узнается РНК-полимеразой, отвечающей за транскрипцию ДНК в матрицу РНК. Обычно это фрагмент ДНК из 41-44 пар оснований. Ген считывается слева направо, от 5' к 3' концу гена и заканчивается в терминальной области гена. Далее следует стартовый сайт транскрипции, за которым идет смысловая часть гена. Промоторная область гена несет в себе определенные небольшие длины сочетания нуклеотидов, типичные для геномов бактерий или высших организмов.

Встраивать желаемые для испытателя свойства возможно с помощью бактерий и в растения. Для этого прибегают к бактериям родов *Agrobacter*, которые образуют раковые опухоли на растении в зоне перехода стебля в корень. В другом случае можно использовать ризобии, способные формировать, так называемые, «бородатые» корни. В бактерию так же помещают чужеродный ген, который затем с ее помощью встраивается в клетки растений. Данный процесс является уникальным примером, иллюстрирующий перемещение ДНК из прокариотического организма в эукариотическую клетку [Кузьмина, 2006].

Изменение свойств так же возможно путем введения чужеродных генов с использованием плазмиды pMTF59. Эта кольцевая молекула содержит в своем наборе гены двух транспозонов Tn5 и Tn9 и проявляет температурную нестабильность в клетках *Enterobacteriaceae* [Воложанцев и др, 1979; Янов и др, 1997]. Если культивировать бактерии со встроенной в них плазмидой pMTF59 при температуре 37°C в питательной среде с антибиотиками канамицин или хлорамфеникол, происходит встраивание Tn5(Km) и Tn9(Cm) в главную хромосому с образованием различных мутаций [Янов и др, 1997].

Транспозоны (Tn) – это подвижные самовоспроизводящиеся элементы. Длина их колеблется от 2500 до 7000 н.п. Данные структуры перемещают в себе экзогенные гены, зашифровывающие определенные функции, так же они содержат по концам IS-элементы. Последние не кодируют какие-либо признаки и не самореплицируются, а отвечают лишь за функцию перемещения. Выделяют 2 типа Tn:

К первому типу относят ретротранспозоны, способные перемещаться с помощью РНК интермедиаты. Они часто обнаруживаются как у растений, так и в других эукариотов. Например, известно, что в кукурузе чуть более половины генома составлена именно такими структурами.

Второй тип представлен ДНК-транспозонами, для которых нет необходимости в стадии РНК- посредника. Они перемещаются по типу «сначала вырезать, затем вставить». Существует немало сведений об организмах, в составе которых нет ретротранспозонов, в них обнаружены представители второго типа.

Механизм перемещения фрагментов ДНК по геному до конца не выяснен. Однако на сегодняшний день точно известно, что ДНК переносится транспозазой. Этот фермент кодирует последовательность размером около двух десятков нуклеотидов в центральной части транспозона. Он специфически связывается с концевыми IS-элементами и может вырезать их из хромосомы. Это явление возможно в двух вариациях. В случае точного вырезания происходит восстановление исходной структурной части ДНК. Если вырезание осуществляется неточно, то имеют место быть делеции и вставки от одного до нескольких нуклеотидов (например, Tn9). Такие процессы несут за собой стабильные мутации и являются одним из способов создания новых нуклеотидных последовательностей.

Генетическую трансформацию векторами на основе Tn первый раз провели на мухе *Drosophila*. Тогда ей ввели экзогенную последовательность, определяющую коричневый цвет глаз [Кузьмина, 2006].

Такие свойства подвижных элементов, как становиться частью генома хозяина, так и сохранять свое присутствие в ряду поколений является важным основанием для их использования в качестве инициаторов мутаций [Подгорная, 2009]. Тем не менее мутанты, получаемые таким образом не всегда стабильны. Это обусловлено наличием повторных транспозиций, которые вызываются встроившимися в хромосому бактерий Tn-элементами [Янов и др, 1997].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Выделение и очистка плазмидной ДНК *Escherichia coli*

Процедуру выделения плазмидной ДНК проводили методом мягкого лизиса [Clewell, Helinski, 1969] в сочетании с небольшими преобразованиями: уменьшение концентрации сахарозы в суспензирующем буфере и осаждение из лизата плазмидной ДНК при помощи полиэтиленгликоля. Изначально производили засев 100 мл среды Лурия-Бертрани (LB) с ампицилином (100 мкг/мл) кишечной палочкой, содержащей в себе некую плазмиду, затем наращивали ночную культуру (встряхивание не требуется). Для штамма *E.coli*, несущего на эписоме транспозон Tn10, который обеспечивает устойчивость к антибиотикам тетрациклинового ряда, добавляли 12.5 мкг/мл этого антибиотика. После 100-кратного разбавления получившейся ночной культуры, небольшое ее количество переносили в колбу со свежеприготовленной средой LB с содержанием требуемых антибиотиков. Наращивание продолжали до достижения оптической плотности, соответствующей концентрации $2 - 3 \times 10^8$ клеток/мл (обычно 14 - 16 час).

После этого проводили осаждение бактерий в течение 10 мин при 3000 об/мин с применением центрифуги К-23. Осадок суспензировали в 8 мл раствора 10%-ной сахарозы. Добавили к смеси 2 мл свежеприготовленной смеси фермента лизоцима (10 мг/мл в 0,25 М трис-НСl, pH 7,8), выдержали в течение 10 мин при 0°C и добавили 2 мл 0,5 М ЭДТА, инкубировали 5 мин в тех же условиях. Процедуру лизирования проводили смесью детергентов бридж 58 - дезоксихолат натрия (конечными концентрациями являлись 1% и 0.4%). Осторожно перемешали в течение 5 мин, до вязкого и прозрачного состояния

раствора. Полученный лизат осветлили в ультрацентрифуге Spinco L2-65B в бакет-роторе, выставив время 30 мин и 39000 об/мин или в ультрацентрифуге Ж-62 (СССР) в течение 45 мин при 29000 об/мин. Аккуратно слили супернатант, не допуская смешивания время от времени образующегося вязкого придонного слоя с хромосомной ДНК, и добавили к нему 1/5 объема 5 М хлорида натрия и 1/4 объема полиэтиленгликоля 6000 50%-го. Необходимый нам осадок плазмидной ДНК, в котором так же имелись загрязняющее количество РНК, белки, полисахара формировался при 0°C в холодильнике в течение нескольких часов.

Полученный осадок собирали в течение 10 мин в центрифуге К-23 при 3000 об/мин в. После того, как он растворился в 1 х ТЕ, перед депротеинизацией удалили остаточный полиэтиленгликоль при встряхивании с хлороформом и расслаивании в центрифуге К-23 (время - 5 мин, обороты - 2500 об/мин). Депротеинизацию проводили встряхиванием с эквивалентным объемом хлороформа + 80%-ого свежеперегнаный фенол (рН 8.0) в равных соотношениях в течение 10 мин. После этого центрифугировали при 2500 об/мин в течение 20 мин. Верхний водно-солевой слой с ДНК отобрали и подвергли процессу повторной депротеинизации. Данную процедуру повторили до исчезновения интерфазы, состоящей из денатурированного белка. Далее супернатант встряхивали с эквивалентным объемом хлороформа, центрифугировали и осаждали ДНК двукратным объемом этанола. Полученную ДНК необходимо промыть 70%-ным этиловым спиртом для того, чтобы удалить фенол и хлороформ, растворить в соответствующем объеме 1 х ТЕ.

Для того, чтобы определить размер вставки руководствовались быстрым методом щелочного лизиса микробных колоний [Birnboim, Doly, 1979]. Перенесли при помощи тefлоновых палочек культуру в микроцентрифужные пробирки и тщательно суспендировали в 100 мкл раствора I, содержащего 50 мМ трис-HCl (рН7,8) и 20 мМ ЭДТА. Далее

добавляли 200 мкл раствора II с содержащимся в нем 1%-ного раствора ДДС натрия и 0.2 М гидроксида натрия. Осторожно перемешали, затем через 5 мин добавили 150 мкл 5 М CH_3COOK - ацетат калия (pH 5.0). Затем требовалось хорошо взболтать и выдержать при 0°C 10 мин, после этого центрифугировать (время - 5 мин, обороты - 12000 об/мин). Осторожно отобрали осветлившуюся жидкость, не захватывая при этом осадок и липидный слой, осаждали ДНК двукратным объемом этилового спирта при -70°C. После растворения, сформировавшиеся и собранные в микроцентрифуге в минимальном объеме 1 x TE препараты ДНК были готовы или для дальнейшего анализа: агарозный гель-электрофорез либо расщепление при помощи соответствующих рестрикционных эндонуклеаз.

Для более быстрого анализа рекомбинантных клонов применяли щелочной лизис бактериальных колоний, исключаяющий этап осаждения ДНК этанолом и позволяющий лишь грубо оценить размер вставки по электрофоретической подвижности суперскрученных форм рекомбинантных плазмид [Sambrook et al., 1989]. Для этой цели тефлоновыми палочками переносили небольшое количество колонии в микроцентрифужные пробирки и суспендировали в 20 мкл раствора А (10 mM трис-HCl (pH 8,0) и 1 mM ЭДТА). Затем добавляли 20 мкл раствора В (0.2 М NaOH, 2%-ный ДДС натрия) и, тщательно перемешав, инкубировали на водяной бане 45 мин при 60°C. После завершения лизиса добавляли 10 мкл 6-ти кратного электрофоретического буфера, содержащего маркерные красители и 50%-ный глицерин, и анализировали посредством электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

2.2. Полимеразная цепная реакция

Аамплификацию необходимых участков ДНК проводили методом ПЦР. Данный метод включает в себя определенные чередующиеся друг за другом циклы, количество которых, как правило, составляет 20 - 30. По истечении заданного времени образуется продукт реакции, состоящий из многократно повторяющихся фрагментов ДНК, обозначенных введенными заранее в смесь праймерами.

Объем реакционной смеси для проведения полимеразной цепной реакции составлял 25 мкл, содержащей 3 мкл исследуемой генетической последовательности, 2.5 мкл 10× Taq – буфера, 2.5 мкл раствора dNTP, по 0.5 мкл каждого праймера, 0.5 мкл Taq-полимеразы и 12.5 мкл mQ. Так как наработка продуктов проходит при довольно высокой температуре, для исключения испарения жидкой составляющей смеси необходимо добавить на ее поверхность по одной капли минерального масла. Далее пробирки помещали в амплификатор MC2 «Терцик» компании "ДНК-технология" с заданной программой. Первым этапом следовала денатурация при 94°C, после 30 циклов самой амплификации необходимых последовательностей. Каждый цикл состоял из денатурации ДНК в течение 30 сек при 94°C, отжиг праймеров в течение 30 сек при 55-70°C и стадии элонгации, продолжающейся так же 30 сек при температуре 72°C, подходящей наилучшим образом для выбранной полимеразы. На последнем этапе пробирки выдерживалась при температуре 72°C 120 сек для завершения построения комплементарных последовательностей и во избежание недостроенных участков в конечном продукте.

2.3. Аналитический гель-электрофорез ДНК в неденатурирующих условиях

Электрофорез анализируемой ДНК проводили в зависимости от размера разделяемых фрагментов ДНК и требуемого разрешения, используя агарозные гели в концентрации 0.4 - 2.0% либо 4 - 12%-ные полиакриламидные гели. Источниками питания служили приборы модели 250/2.5 фирмы «Bio-Rad» (США) или модели «Эльф 4» («ДНК Технология», Россия).

Агарозный гель-электрофорез осуществляли в приборах подводного типа GNA-200 (Pharmacia, Швеция), Wide MINI-SUB CELL GT (Bio-Rad, США), или аналогичных приборах с различными размерами гелевых пластин (стандартная, 14 x 14 см; мини, 8 x 9 см; широкая мини, 12 x 9 см), изготовленных из оргстекла в инструментальной мастерской Уфимского научного центра РАН.

Толщина используемых в различных экспериментах гелей варьировала незначительно от 2 до 4 мм. Гребенки для формирования колодцев имели толщину 1.5 мм и отличались шириной зубчиков (от 3 мм до 8 мм). В качестве буферной системы использовали ТАЕ-буфер, содержащий 40 мМ трис-ацетата (pH7,6) и 2 мМ ЭДТА.

Разделение фрагментов ДНК крупных и средних размеров (от 50 - 70 тпн до 2 тпн) проводили в 0.4 - 1.0%-ных гелях агарозы, соответственно, при напряжении 2 - 3В на см длины геля в течение 12 - 18 час. При разделении мелких фрагментов ДНК (от 2 тпн до 200 пн) использовали 1 - 2%-ные гели агарозы соответственно с градиентом напряжения 8 - 10В на см длины геля. Такой повышенный градиент напряжения способствовал сокращению времени электрофореза и уменьшения диффузии (Sealey, Southern, 1982).

Полиакриламидный гель-электрофорез проводили в вертикальных приборах типа «Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell» фирмы «Bio-Rad» (США). В качестве электрофоретического буфера использовали трис-боратный буфер (pH8,3), содержащий 90 мМ трис-основание (гидроксиметиламинометан), 9 мМ борной кислоты и 2 мМ ЭДТА. Толщину используемых гелей определяли специальные спейсеры, изготовленные из тефлона (1,5 мм) или майлара (0,5 мм). Размер зубчиков гребенки, формирующих ячейки для нанесения препаратов варьировал от 3 до 8 мм, при этом ее толщина строго соответствовала толщине самих спейсеров.

После окончания процедуры гель окрашивали бромистым этидием (5 мкг/мл) в течение 10 мин. Флуоресценцию наблюдали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм в трансиллюминаторе ТМ-36. Нуклеиновые кислоты, окрашенные в бромидом этидие, светились оранжево-красным светом.

Фотографирование полученной картины проводили на фотодокументационной системе модели «Gel Camera System» с эпихемибоксом («UVP, Inc.», США).

2.4. Расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами

Расщепление ДНК производили в буферах, рекомендованных фирмами-поставщиками, также указанными в этом же разделе. Время рестрикции продолжалось от 1 часа до 1 суток. На длительность процесса влияли как цель эксперимента, так и количество расщепляемой ДНК и единицы активности, взятой в реакцию эндонуклеазы.

Для каждого конкретного фермента применялась наиболее оптимальная для него температура инкубации (30⁰С, 37⁰С и 65⁰С). Для

предотвращения испарения инкубационного раствора расщепление ДНК при 65°C проводили под слоем вазелинового масла.

При комбинированном расщеплении препаратов ДНК двумя или более рестрикционными эндонуклеазами либо выбирали буферные растворы, наиболее оптимально соответствующие особенностям действия всех используемых ферментов, либо проводили последовательную инкубацию расщепляемой ДНК с разными ферментами, начиная с требующего более низкую ионную силу.

При препаративном расщеплении полноту рестрикции проверяли аналитическим электрофорезом соответствующих аликвот реакционной смеси в 0.8% - 2.0%-ных агарозных гелях.

По завершению рестрикции к препаратам расщепленной ДНК добавляли специальный буфер для нанесения, содержащий 6-ти кратный ТАЕ-буфер (для агарозных гелей) или ТВЕ-буфер (для полиакриламидных гелей), 50%-ный глицерин и маркерные красители ксиленцианол FF и бромфеноловый синий, и фракционировали их с помощью электрофореза.

Для инактивации рестрикционных эндонуклеаз произвели добавление ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ, за которым последовала обработка раствором, содержащим фенол и хлороформ.

2.5. Лигирование ДНК с помощью ДНК-лигазы фага T4

Объем реакционной смеси составлял 20 мкл: 10 мкл амплификат целевого гена, 5 мкл линеаризованная плазмида, 1 мкл полиэтиленгликоль, 2 мкл буфер, 1 мкл вода, 1 мкл лигаза. Реакция осуществлялась при комнатной температуре, время процесса составило 18 ч. Далее ДНК-лигазу инактивировали прогреванием при 70°C 15 мин. После полученной смесью производили трансформацию клеток *E. coli* [Решетников, 2006].

2.6. Подготовка химически компетентных клеток *Escherichia coli*

Подготовку компетентных клеток проводили как предложено Hanahan (1983). 1 мл выращенной заранее в течение ночи культуры необходимого штамма *E.coli* вводили в колбу на 500 мл со 100 мл среды LB (для штамма XL1-Blue содержащей 12.5 мкг/мл тетрациклина) и наращивали клетки до $D_{600}=0.3$ при 37°C, при интенсивной аэрации на орбитальном термостатируемом встряхивателе ES-20 (BIOSAN, США). Далее бактерии отбирали центрифугированием в стерильных центрифужных стаканах в центрифуге Avanti j-E (Beckman Culter, США) при 4000 g, 10 мин. Удаляли супернатант и аккуратно суспендировали клетки в 25 мл холодного (4°C) буфера I (10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 30 mM ацетат калия, pH 5.8). Повторили центрифугирование при 2500 об/мин, время - 10 мин. Удаляли супернатант как можно большее количество и также мягко суспендировали материал в 5 мл холодного (4°C) буфера II (75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15%-ный глицерин, 10 mM MOPS, pH 6.5). Используемые буферные растворы должны быть стерильны.

Суспензию подготовленных бактерий разделили по 200 мкл в заранее охлажденные стерильные микропробирки из полипропилена и заморозили при -70°C.

Необходимо подчеркнуть: выполненные операции строго производились на льду в стерильных условиях в ламинарном боксе горизонтального типа (Flow, Шотландия) [Сабиржанов, 2003.].

2.7. Трансформация компетентных клеток *Escherichia coli* плазмидной ДНК

Трансформацию компетентных клеток рекомбинантной ДНК проводили по методу Cohen [Cohen, 1972]. К 200 мкл только что размороженной на льду суспензии подготовленной *E.coli* добавили 10 мкл лигазной смеси и инкубировали 1 час на льду. Затем клетки подвергали тепловому шоку на водяной бане при 42 °С в течение 2 мин, добавляли в пробирку 10 объемов свежей среды LB и инкубировали клетки 1 час при 37°С. После инкубации суспензию клеток кратковременно осаждали в микроцентрифуге и осадок суспендировали в 100 мкл среды LB. Затем эту суспензию равномерно распределяли в чашке Петри стерильным стеклянным шпателем по поверхности 1.5%-ного агара, приготовленного на LB-среде с заранее добавленным в нее антибиотиком (ампициллин) в соотношении 100 мкг/мл. Веществу предоставили время впитаться в агар или, если было необходимо, подсушивали его поверхность потоком стерильного воздуха в ламинарном боксе и чашки Петри в перевернутом виде помещали в термостат (37°С) на 18 час [Николенко, 2003].

2.8. Подготовка компетентных клеток *Bacillus subtilis* и трансформация

Трансформацию проводили по методу, описанному Zeigler в 2002 году [Zeigler, 2002].

1. Вырастить штамм-реципиент в течение ночи при 37С на качалке при 170 об/мин на жидкой LB-среде.

2. Внести 150 мкл ночной культуры в 10 мл среды А. Инкубировать на качалке при 37С, 170 об/мин до OD 0,6-0,9. Затем

инкубировать еще 90 мин. (Для штамма 26Д общее время инкубации 3 ч 45 мин.)

3. Перенести 50 мкл культуры в 450 мкл заранее подогретой среды В.

4. Инкубировать 90 мин. при 37С, 170 об/мин.

5. Добавить 30 мкг плазмидной ДНК, инкубировать при 37С, 170 об/мин 45 мин.

6. Отцентрифугировать культуру в эппендорфе при 3000 об/мин, 5 мин. Слить надосадочную жидкость, оставить примерно 100 мкл, ресуспендировать бактерии.

7. Рассеять бактерии на агаризованной LB-среде с 5 мкг/мл хлорамфеникола

Среда А 10Х (на 1 л)

Дрожжевой экстракт 10 г

Казаминовые кислоты 2 г

Дистиллированная вода 900 мл

Проавтоклавировать и добавить 100 мл 50% автоклавированного раствора глюкозы

Соли для *Bacillus* 10Х (на 1л)

(NH₄)₂SO₄ 20 г

K₂HPO₄·3H₂O 183г

KH₂PO₄ 60 г

Na+citrate 10 г

MgSO₄·7H₂O 2г

Вода 1000 мл

Среда А

Стерильная вода 81 мл

Среда А 10X 10 мл

Соли для *Bacillus* 9 мл

На 10 мл: 8,1 мл воды ,1 мл 10х среды А , 9 мл солей

Среда В

Среда А 10 мл

50 mM CaCl₂·2H₂O 0.1 мл

250 mM MgCl₂·6H₂O 0.1 мл

На 450 мкл: 365 мкл воды, 45 мкл 10х среды А, 40,5 мкл солей, по 4,5 мкл р-ров CaCl₂ и MgCl₂

Среда LB (на 1 л)

Дрожжевой экстракт 5 г

Триптон 10 г

NaCl 9 г

Агар-агар 10г.

2.9. Микрокопирование

Флуоресцентно окрашенные бактерии наблюдали на:

1. флуоресцентном микроскопе Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия). Для детекции GFP использовали набор светофильтров №10 (полоса возбуждения BP 450–490, испускания BP 515–565).

2. флуоресцентном микроскопе Biozero BZ-8100 (Keyence, Япония). Для детекции GFP использовали набор светофильтров BZ FILTER GFP (полоса возбуждения 480/30, поглощения 510-).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день научно-технический прогресс стал причиной многих проблем, одна из которых – угроза здоровью человечества. Наш организм находится под ежедневным негативным давлением био-, техно-и социогенных факторов, степень влияния которых, во многих случаях, превосходит компенсаторные возможности микробиоценоза человека [Бондаренко и др, 2004]. Нормофлора является неотъемлемым составляющим жизнедеятельности организма, и какие – либо изменение в ее количественном и качественном составе оказывают значительную роль в патогенезе многих заболеваний различной этиологии, вследствие этого проблема коррекции дисбиозов должна рассматриваться как общемедицинская [Циммерман, 2005]. Данное обстоятельство обуславливает потребность в снабжении практического здравоохранения широким спектром доступных препаратов на основе микроорганизмов - пробиотиков, которые будут оказывать не только поддерживающий, но и восстанавливающий эффект по отношению к нормальным обитателям человеческого организма [Roberfroid, 2000].

Многие пробиотики в своем составе содержат бактерии рода *Bacillus*. До недавнего времени штаммы этих бактерий для пробиотических препаратов получали методом селекции, при котором отбираются наиболее подходящие под определенные требования штаммы. На сегодняшний день с помощью генно-инженерных методов подобные штаммы можно создавать. Например, при испытании пробиотических бактерий важно иметь возможность отслеживания их и проведения количественных оценок на всех участках пищеварительного тракта. Решение подобной задачи может сильно облегчить возможность маркирования бактериальных клеток. Наиболее удачным вариантов в этом

случае является использование для метки флуоресцентных белков, поскольку они позволяют проводить прижизненную маркировку бактериальных клеток. Большое разнообразие подобных белков, отличающихся спектрами световозбуждения/испускания, дает возможность дифференциально маркировать одновременно несколько объектов. Нами была сделана работа по получению меченого GFP штамма пробиотической бактерии *Bacillus subtilis* 3Н.

При создании генно-инженерной конструкции для маркирования зеленым флуоресцентным белком *B.subtilis* 3Н использовали плазмиду pDG1662 [Guerout-Fleury, 1996], которая была расщеплена эндонуклеазами рестрикции BamHI и EcoRI по их уникальным сайтам (рис.2).

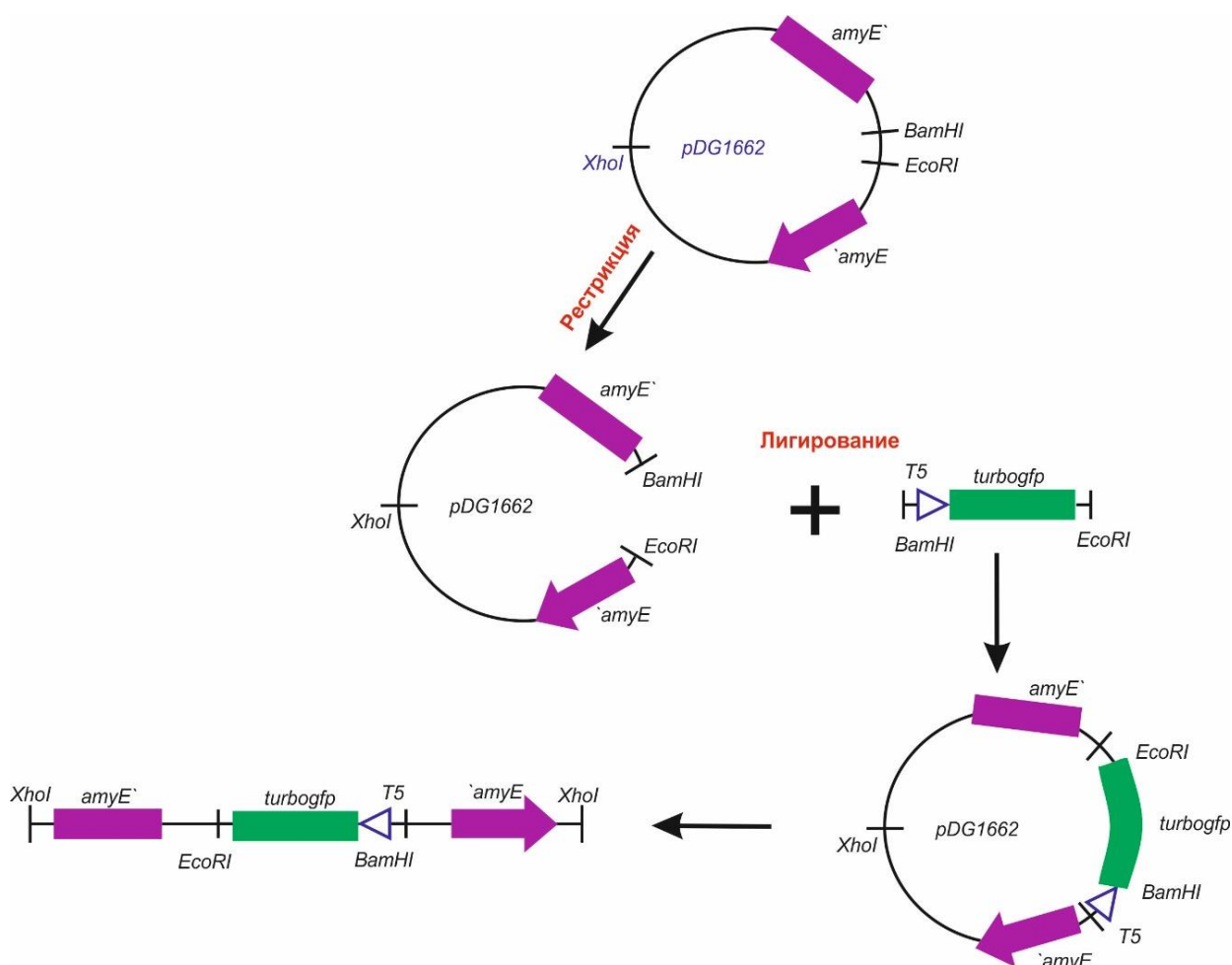


Рисунок. 2. Схема создания генно-инженерной конструкции с геном устойчивости к антибиотику хлорамфениколу для трансформации *Bacillus*

Затем по ним же в плазмиду pDG1662 был встроили ген зеленого флуоресцентного белка под управлением промотора фага T5 *E.coli*.

При создании векторных конструкций был использован ген белка серии Turbo. TurboGFP обладает улучшенными характеристиками по сравнению с ранними вариантами подобных белков, которые так же используются для маркирования живых клеток [Shagin, 2004].

Дело в том, что организм, из которого изначально был выделен зеленый флуоресцентный белок, медуза *Aequorea victoria*, является обитателем холодных вод Тихого океана, из-за этого оптимальная температура для образования зрелого белка находится в пределах ниже 37°C. Неправильное сворачивание молекулы влечет за собой агрегацию в виде телец включения, мешая образованию хромофора и явлению флуоресценции.

К тому же влияние на эти процессы оказывает и карбонильный углерод Ser65, который находится на недостаточном близком расстоянии от амидного азота Gly67 для протекания автокаталитической циклизации. Таким образом, чтобы расширить возможности использования GFP, были получены варианты данного белка из других источников со способностью к эффективному фолдингу при более высоких градусах цельсия [Зубова, 2006]. Таким белком оказался TurboGFP, выделенный из копеподы *Pontellina plumata*.

Кроме того, синтез зеленого флуоресцентного белка дикого типа влечет за собой свечение только спустя определенное время, составляющее от 90 минут до 4 часов. Методами направленного мутагенеза удалось ускорить созревание. Так, например, TurboGFP, созревает в течение нескольких минут [Зубова, 2006].

Далее полученная конструкция была переведена в линейную форму за счет расщепления его по сайту рестрикции XhoI (рис.2). Данный этап

был необходим для ее введения в клетки *Bacillus subtilis* 3Н по механизму естественной трансформации. Благодаря фланкированию целевого гена последовательностями, соответствующими начальному и конечному участкам гена амилазы (AmyE), целевой фрагмент ДНК имеет возможность по механизму эктопической рекомбинации встроиться в бактериальную хромосому в состав гена амилазы (рис.3).

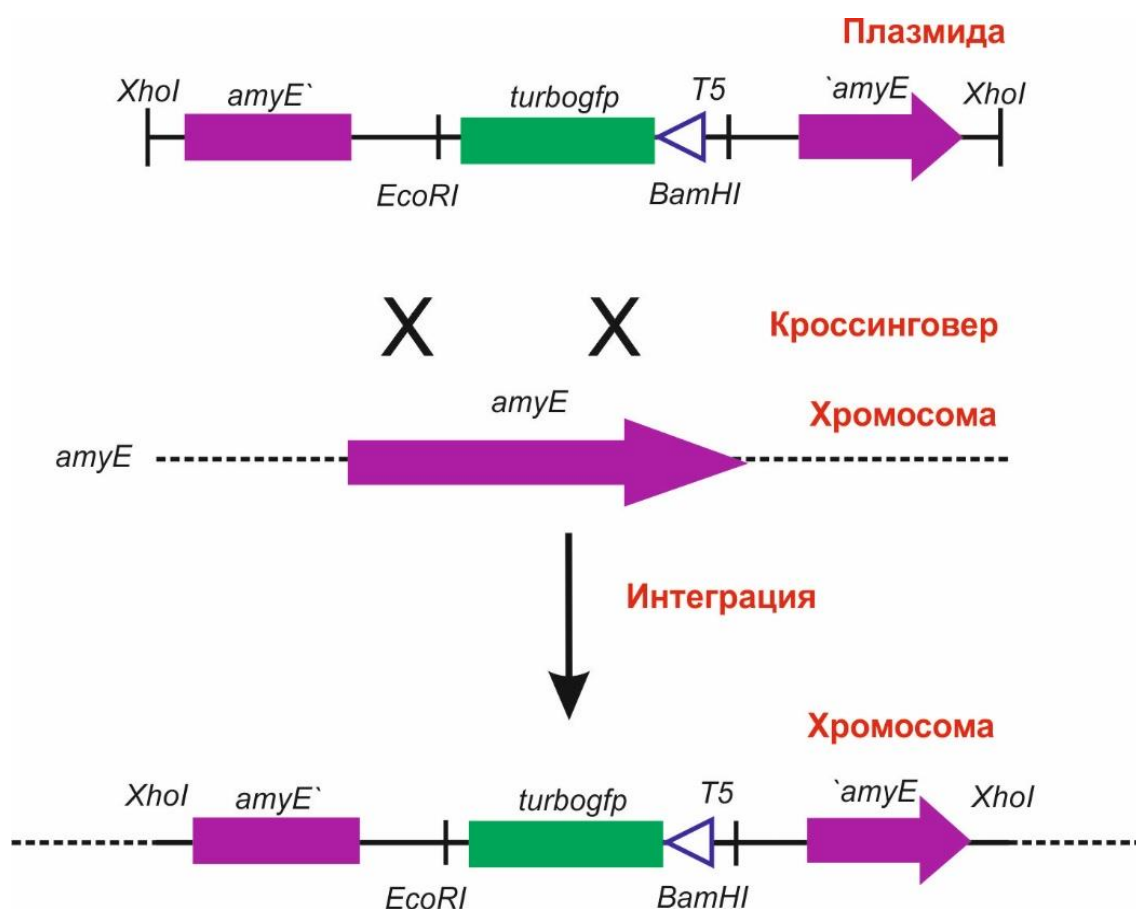


Рисунок. 3. Встраивание целевого гена в хромосому бактерии - реципиента путем эктопической рекомбинации.

Вообще, имеется два наиболее используемых способа маркирования бактериальных клеток, у которых, естественно, имеются свои преимущества и недостатки. Один из них таких способов - встраивание маркерного гена в состав хромосомы, отличительным свойством которого является стабильность получаемых мутантных форм. А к минусам стоит отнести однокопийность встраиваемого гена, и, как следствие, низкая

наработка целевого белка, а также случайность встраивания в геном, что приводит к изменениям характеристик анализируемых объектов.

В основе другого варианта получения меченных бактерий лежит экспрессия гена флуоресцентного белка с плазмиды. При нем не наблюдаются такие недостатки, но зато возможны случайные элиминации экспрессирующей конструкции в отсутствие селектирующего маркера, в результате этого маркирование приобретает нестабильный характер. При использовании системы эктопической рекомбинации можно избежать случайных мутационных процессов, поскольку ген встраивается по заведомо известному сайту, который выбирает сам исследователь.

Процедура по трансформации клеток *Bacillus subtilis* проводилась по методу, описанному Zeigler, принцип которого заключается в стимуляции естественной способности грамположительных микроорганизмов к захвату экзогенной ДНК, путем последовательного пересева бактерий на среды. Каждая такая среда отличается от предыдущей внесенным в ее состав определенным набором солей. [Zeigler, 2002].

В результате проведенных экспериментов были получены рекомбинантные клоны *Bacillus subtilis* 3Н, имеющие зеленое флуоресцентное свечение. Однако сравнительное исследование интенсивности свечения рекомбинантных клонов *B. subtilis* 3Н и клеток *E.coli*, несущих тот же ген под управлением промотора фага Т5, было отмечено, что у рекомбинантных *B.subtilis* 3Н интенсивность свечения была существенно ниже (рис. 4).

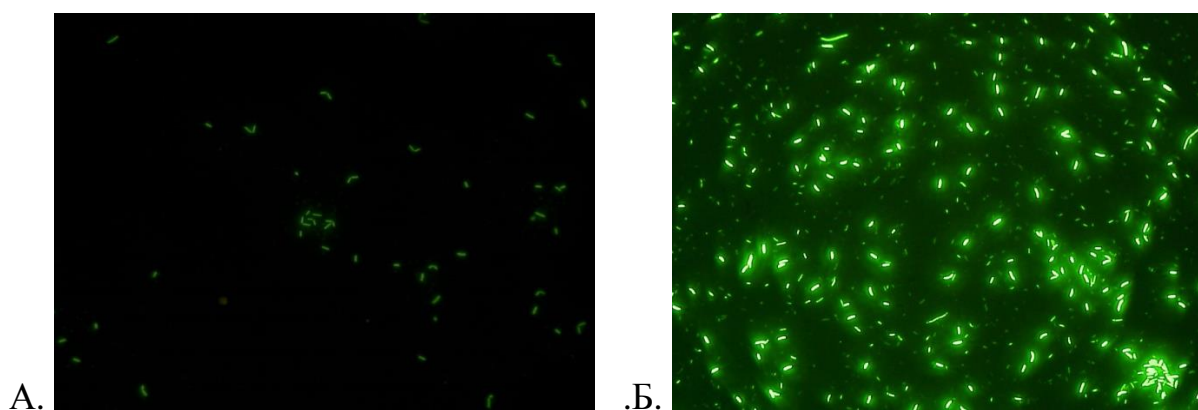


Рисунок 4. Клетки *B.subtilis* 3Н (А) и *E.coli* (Б), маркированные зеленым флуоресцентным белком. Снимки сделаны при одинаковой интенсивности возбуждающего облучения.

Таким образом, нами было получено производное штамма *B.subtilis* 3Н, несущий ген зеленого флуоресцентного белка в составе хромосомы, что делает признак, кодируемый привнесенным геном, устойчивым в ряду поколений. Недостаточная интенсивность флуоресцентного свечения, скорее всего, связана с неправильным выбором регуляторного участка гена, и может быть исправлена за счет применения других промоторных участков для регуляции гена-маркера. Кроме того, клетки *B.subtilis* несущие ген GFP на хромосоме имеют меньшую копийность целевого гена, по сравнению взятыми в анализ клетками *E.coli*, у которых данный ген находится в составе высококопийной плазмиды.

Наиболее часто используемыми системами экспрессии в *B.subtilis* являются системы индуцируемой экспрессии, включающие индуктор-специфичные промоторы, например, такие как промотор фага T7; промотор *grac*; индуцируемый изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом промотор *spac*; индуцируемый ксилозой промотор *xylA*; индуцируемый сахарозой - *SacB* и крахмалом – промотор α -амилазы, [Chen, 2010]. Указанные системы обеспечивали приемлемый уровень экспрессии клетками *B.subtilis* как гомологичных, так и гетерологичных белков, однако, отмечается, что для этого необходим изначально высокий уровень

экспрессируемых белков, кроме того - избыточное содержание индуктора в культуральной среде, исключаящее вероятность снижения его концентрации в результате естественной ферментации. Недавно предложены субтилин-регулируемая (SURE) и LiaRS-контролируемая (LIKE) системы экспрессии *B.subtilis* [Toymmentseva, 2012].

В последние годы появились достаточно интересные данные, свидетельствующие о том, что интенсивность экспрессии белков, в частности, рекомбинантными клонами *B.subtilis*, определяется не только генетическими механизмами, обусловленными, например, типом промоторов, но может во-многом определяться наряду с типом индукторов и рядом других факторов. При этом эффекты индуктора не всегда сводятся к классическим субстрат-зависимым механизмам. Так, совсем недавно удалось сконструировать на основе плазмиды систему, включающую промотор *srf* оперона и экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок. Однако было показано, что интенсивность экспрессии флуоресцентного белка определялась плотностью бактериальных клеток, была минимальной в раннюю экспоненциальную фазу и наоборот максимальной – в позднюю экспоненциальную фазу роста. При этом глюкоза если и влияла на интенсивность экспрессии данного белка, то только опосредованно, через изменение концентрации бактерий в культуре [Guan, 2015].

Указанное, расширяя возможности флуоресцентного маркирования *B.subtilis*, вместе с тем формирует целый пул новых вопросов, касающихся возможности использования флуоресцентно-маркированных культур для изучения их экологии в богатых питательными веществами средах или в условиях *in vivo*, когда условия жизнедеятельности микроорганизмов могут изменяться под влиянием целого ряда неконтролируемых факторов.

ВЫВОДЫ

1. На основе плазмиды pDG1662 создана генно-инженерная конструкция, несущая ген *turbogfp* под управлением промотора фага T5, предназначенная для переноса целевого гена в клетки *B.subtilis* по механизму естественной трансформации.
2. С применением полученной конструкции получены витально маркированные GFP клоны *B.subtilis* 3Н.
3. Интенсивность флуоресцентного свечения клеток полученного рекомбинантного штамма *B.subtilis* 3Н уступает интенсивности свечения *E.coli*, несущих тот же ген зеленого флуоресцентного белка, что может быть следствием как отличающейся активности промотора фага T5 в разных бактериях, так и отличий в копийности целевого гена у этих бактерий.
4. Использование промотора фага T5 в конструкциях для маркирования бактерий *B.subtilis* зеленым флуоресцентным белком является нецелесообразным из-за низкой индукции управляемого им гена в данных микроорганизмах, что приводит к низкой интенсивности флуоресценции клеток, недостаточной для их детекции в ЖКТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипов В.А., Субботин В.М. Эффективность и перспективы применения пробиотиков // Ветеринария. - 1980. - № 12. - С. 56-57
2. Антипов В.А., Ермакова Т.И. Новые отечественные пробиотики // Актуальные проблемы ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции: тез. докл. междунар. науч.- практ. конф. – М., 1995 – С. 71-72
3. Баймиев Ан.Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченных штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* //Молекулярная биология. 2011; 45(6): 684-991
4. Бакулина Л. Ф., Тимофеев Н. Г. Перминова А. Ф. Полушкина Н. И. Печоркина Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии // Биотехнология. - 2001. - № 2. - С. 48-56
5. Белов А.Д., Воронин Е.С. Изучение коррекционного воздействия лактобактерий на биоценоз кишечника при диареях новорожденных телят -М.: Мир, 1991. - С. 9-10
6. Белоусов В.И. Совершенствование технологии промышленного производства ветеринарных биопрепаратов // Актуальные проблемы ветеринарной медицины в России: Сб. науч. тр. – Новосибирск, 1998. - С. 35
7. Блат С.Ф., Хавкин А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет. // Российский Вестник перинатологии и педиатрии, 2011, № 1
8. Бессарабов Б.Ф., Л.М. Обухов, И.Л. Шпильман Методы контроля и профилактики незаразных болезней птиц– М.: Росагропромиздат, 1988
9. Бессарабов Б.Ф., Г.М. Урюпин Уровень естественной резистентности птиц при различных кормовых добавках. Повышение

естественной резистентности сельскохозяйственной птицы: сб. науч. тр. Моск.вет. академия. - М., 1983

10. Бондаренко В.М. Дисбиоз - современные возможности профилактики и лечения. - М., 1995. - С. 5-10

11. Бондаренко В. М. О совершенствовании пробиотических препаратов Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты – 2007. – № 1-2. – С. - 24.

12. Бондаренко В. М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты спробиотической функцией // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2004. – № 1. – С. 84–92

13. Воложанцев Н.В. Данилович В.П. Смирнов С.П. Голуб Е.И. Встраивание транспозона устойчивости к ампициллину в хромосому *Escherichia coli* K-12 и плазмиды // Генетика. - 1979. тХУ, N 2& с. 209-219

14. Данилевская, Н. В. Физиологическая роль основных представителей нормальной микрофлоры мелких домашних животных // Российский ветеринарный журнал: мелкие домашние и дикие животные. - 2008. -№ 1. -С. 28-31.

15. Запруднов А.М., Мазанкова Л.Н. / Микробная флора кишечника и пробиотики // Методическое пособие. -М., 2001

16. Зубова Надежда Николаевна. Изучение структуры и свойств желтого флуоресцирующего белка zFP538 из кораллов: Дис. ... канд. хим. наук: 03.00.04 Москва, 2006 172 с. РГБ ОД, 61:06-2/467

17. Красочко П.А., Серяков И.С., Дуктов А.П., Коломиец Э.И., Еремец В.И., Албулов А.И., Ломако Ю.В., Романовская Т.В., Еремец Н.К. Применение пробиотического препарата "Бацинил" и биополимера "Хитозан" для цыплят-бройлеров, 2010

18. Коршунов В.М., Смеянов В.В, Ефимов Б.А. Рациональные подходы к проблеме коррекции микрофлоры кишечника // Вестник РАМН. – 1996. - № 2.- С. 60-65

19. Коршунов В.М., Володин Н.Н., Ефимов Б.А. и др Микроэкология желудочно-кишечного тракта, // Коррекция микрофлоры при дисбактериозах кишечника - М., 1999
20. Кузьмина Н.А. «Основы биотехнологии». // Учебное пособие для студентов биологического факультета. Омск, 2006
21. Кульчицкая М.А. Разработка аппаратных методов совместного культивирования кишечных бактерий, применяемых при производстве окарина // Вест. ун-та Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. – 2001. – №1(3).
22. Лазебник Л.Б., Ли И.А., Дроздов В.Н., Сильвестрова С.Ю. Нарушения микробиоценоза кишечника и метаболизма липидов после гемиколэктомии. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2010. №3
23. Николенко А.Г. Состояние генофонда башкирской популяции *Apis mellifera mellifera* L. и пути его сохранения // дис... д.б.н.: 03.00.09, 03.00.15. - Санкт-Петербург, 2003. - 272 с.
24. Ноздрин Г.А, Иванова А.Б, Шевченко А.И., Шевченко С.А. Пробиотики и микронутриенты при интенсивном выращивании цыплят кросса Смена. – Новосибирск: // НГАУ, 2009. – 207 С.
25. Подгорная О.И., Галактионов Н.К. Мобильные элементы как потенциальные векторы горизонтального переноса генетической информации в системах паразит-хозяин. Труды зоологического института РАН – 2009.
26. Резник С.Р. Смирнов В.В., Вьюницкая В.А Перспективы использования бактерий рода *BACILLUS* в качестве основы лечебно-профилактических препаратов. //.: Колонизационная резистентность и химиотерапевтические антибактериальные препараты /ред. Шендеров Б.А./ – М., 1988. – Ч. 2.
27. Решетников А.С. Синтез эктоина аэробными метилотрофными бактериями: биохимические и генетические аспекты: дис... к.б.н. : 03.00.04 Пущино, 2006.- 130 с.

28. Сабиржанов Б. Е. Промоторные области рДНК пшеницевых : дис ... к. б. н. : 03.00.03.- Уфа, 2003.- 123 с.
29. Садунова А.В. Общая характеристика бактерий рода *Bacillus*, Электронный научный журнал «Международный студенческий научный вестник», 2014
30. Сидоров М.А., Субботин В.В., Данилевская Н.В. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками // Ветеринария. – 2000. - № 11. - С. 17-21
31. Смирнов, В.В., Резник, С.Р., Выюницкая, В.А., Соокулова, И.Б., Литвин, В.П. Влияние комплексного пробиотика споролакта на микробиоценоз кишечника теплокровных // Микробиол. ж. – 1995. – Т. 57, № 4. – С. 42–49
32. Сорокулова И.Б., Бежавская В.А, Масычева В.И., Смирнов В.В. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования в медицине и ветеринарии / // Вестн. РАМН. – М.: Медицина. – 1997. - № 3. – С. 46-49.
33. Тараканов Б.В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных // Ветеринария. – 2000. - № 1. – С. 47-54
34. Урсова Н. И. Нарушения микрофлоры и дисфункции билиарного тракта у детей: руководство для практикующих врачей/под ред. Г. В. Римарчук. М.: Прототип, 2005
35. Хавкин А. И. Микрофлора пищеварительного тракта. М., 2006
36. Циммерман Я.С. Дисбиоз («дисбактериоз») кишечника и/или «синдром избыточного бактериального роста» // Клин. мед. — 2005. — № 4. — С. 14-22.
37. Шевелева С.А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса // Вопросы питания. 1999. № 2
38. Шендеров Б. А, Манвелова М. А. Функциональное питание и пробиотики: микрoэкологические аспекты. – М., 1997.;

39. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. В 3 т. Т 1. Микрофлора человека и животных и ее функции. — М.: Грантъ, 1998.
40. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия: учебно-справочное пособие // - Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010 г
41. Янов С.Н., Дармов И.В., Маракулин И.В. Способ введения чужеродных генов в геномы грамотрицательных микроорганизмов, плазмидный вектор ркс47м для введения чужеродных генов в геномы грамотрицательных микроорганизмов, способ конструирования плазмидного вектора ркс47м, 1997
42. Bmer G.W., Me Farland L.W., Surawicz CM Biotherapeutic Agents and Infection Diseases. // Human Press. 1999
43. Clewell D.B., Helinski D.R. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1969. – V. 62, N 4. – P. 1159–1166.
44. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C., Green fluo-rescent protein as a marker for gene expression. // Science. 1994; 263: 802–805
45. Chen P.T., Shaw J.F., Chao Y.P., David Ho T.H., Yu S.M. Construction of chromosomally located T7 expression system for production of heterologous secreted proteins in *Bacillus subtilis* // The Journal of Agricultural and Food Chemistry. -2010; V58(9), P.5392–5399
46. Chen J., Gai Y., Fu G., Zhou W., Zhang D., Wen J. Enhanced extracellular production of alpha-amylase in *Bacillus subtilis* by optimization of regulatory elements and over-expression of PrsA lipoprotein. // *Biotechnology Letters*. 2015; -V.37(4): -P.899–906.
47. Cohen S., Chang A., Hsu L. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria – Genetic Transformation of *E. coli* by R-factor DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1972. – V. 69. – P. 2110–2114.

48. Eberl G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism // Nature publishing group: *Mucosal Immunology*; online publication 5 May 2010. doi: 10.1038/mi.2010.20
49. Godic Torcar K., Matijašić B.B. Partial Characterisation of Bacteriocins Produced by *Bacillus cereus* Isolates from Milk and Milk Products // Food Technol. and Biotechnol. – 2003. – Vol. 41, N 2. – P. 121–129
50. Guan C., Cui W., Cheng J., Zhou L., Guo J., Hu X. et al. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in *Bacillus subtilis*. // *Microbial Cell Factories*. 2015; 14: 150. DOI 10.1186/s12934-015-0341-2
51. Guerout-Fleury A.M., Frandsen N., Stragier P. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. // Gene. 1996; -V.180(1-2), -P.57-61
52. Hosoi, T., Kiuchi, K. Natto – A food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto) // Handbook of Fermented Functional Foods / Farnworth E.R. (editor). – Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2003. – P. 227–245
53. Inouye S., Tsuji F.I. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. // FEBS Letters. 1994; -V. 341, -P. 277–280.
54. Kailasapathy K.A., Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. // Immunol Cell Biol 2000, -V. 78, -P. 80-8.
55. Kilaru S., Schuster M., Studholme D., Soanes D., Lin C., Talbot N.J. et al. A codon-optimized green fluorescent protein for live cell imaging in *Zymoseptoria tritici*. // Fungal Genetics and Biology; 2015, -P. 79125–79131
56. Lu Y., Lin Q., Wang J., Wu Y., Bao W., Lv F. et al. Overexpression and characterization in *Bacillus subtilis* of a positionally nonspecific lipase from *Proteus vulgaris*. // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2010; -V. 37(9), -P. 919–925.

57. Marco M.L., Pavan S., Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. // *Current Opinion Biotechnology*. 2006; - V. 17, -P. 204–210
58. Neuman H., Debelius J.W., Knight R., Koren O. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiology Reviews*; Advance Access published February 19, 2015. doi: 10.1093/femsre/fuu010
59. Ouwehand A. C. Probiotics: an overview of beneficial effects / A.C. Ouwehand, S. Salminen, E. Isolauri // *J. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, №2. – P. 63-72
60. Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormie, M.J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. // *Gene*. 1992; -V. 111, -P. 229–233
61. Roberfroid M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods // *Am J Clin Nutr* 2000
62. Rowland, I.R. (1995) Toxicology of the colon: role of the intestinal microflora. In: Gibson G.R. and McFarlane, G.T., eds. *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*. (Boca Raton Fl: CRC Press), pp 155-174.
63. Salminen, S. and von Wright, A. `Current Human Pro-biotics and Safety Assured in Microbial Ecology in Health and Disease 1998, 10, 68 - 77;
64. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. // Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Cold Spring Lab., - 1989. – 1626 p.
65. Sanders, M. E., L. Morelli, and T. A. Tompkins (2003). Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*
66. Sealey P.G., Southern E.M. Gel electrophoresis of DNA / In: *Gel electrophoresis of nucleic acids. A practical approach*. IRL Press, Oxford. - 1982. – P. 3976.

67. Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers A., Nunez J.M., Widder E.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. 2004. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol Biol Evol.* **21**, 841-850
68. Sharp, R.J., Scawen, M.D., Atkinson, T. Fermentation and downstream processing of *Bacillus* // *Biotechnology Handbook: Bacillus* // Harwood C.R. (editor). – New York: Plenum Press, 1989. – P. 255–292.
69. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan Aequorea. // *Journal of Cellular and Comparative Physiology.* 1962; -V.59, -P. 223–239
70. Toymentseva AA, Schrecke K, Sharipova MR, Mascher T. The LIKE system, a novel protein expression toolbox for *Bacillus subtilis* based on the *lial* promoter. // *Microbial Cell Factories.* 2012; -V. 11, -P. 143
71. Van Zyl W.F., Deane S.M., Dicks L.M.T. Use of the mCherry fluorescent protein to study intestinal colonization by *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 in mice. // *Applied and Environmental Microbiology.* 2015; -V.81, -P. 5993–6002
72. Voss U., Larrieu A., Wells D.M. From jellyfish to biosensors: the use of fluorescent proteins in plants. *International Journal of Developmental Biology.* 2013; -V.57, -P. 525–533
73. Zeigler, *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains. Seventh Edition ed. Vol. Volume 4: Integration Vectors for Gram-Positive Organisms. 2002.
74. Zhang J., Kang Z., Ling Z., Cao W., Liu L., Wang M. et al. High-level extracellular production of alkaline polygalacturonate lyase in *Bacillus subtilis* with optimized regulatory elements. // *Bioresource Technology.* 2013; -V.146, -P. 543–548

ПРИЛОЖЕНИЕ

Справка об антиплагиате студентки МБ 401 А группы Симахиной А. С.

**Информация
о документе:**

Имя

исходного файла: ДИПЛОМ СИМАХИНА.docx

Имя

компаний: Башкирский государственный медицинский университет

Тип

документа: Прочее

Имя

документа: СИМАХИНА

Дата

проверки: 27.06.2016 12:17

Модули

поиска: Диссертации и авторефераты РГБ, Интернет (Антиплагиат), Кольцо вузов, Модуль поиска ЭБС "Лань", Башкирский государственный медицинский университет

Текстовые

статистики:

Индекс

читаемости: сложный

Неизвестные

слова: в пределах нормы

Макс. длина

слова: в пределах нормы

Большие

слова: в пределах нормы

Оригинальные блоки: 77.21%

Заимствованные блоки: 22.79%

Заимствование из "белых" источников: 0%

Итоговая оценка оригинальности: 77.21%



Отзыв о прохождении дипломной практики

Научного руководителя на студентку 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Симахиной Аделии Сергеевны по теме:

«Маркирование зеленым флуоресцентным белком пробиотического штамма
Bacillus subtilis 3Н для возможности быстрой его детекции в различных
отделах ЖКТ».

Студентка Симахина А.С. проходила дипломную практику в Башкирском государственном медицинском университете, на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии, в лаборатории ИБН УНЦ РАН. Она проявила себя как подготовленный специалист, при этом успешно применяла полученные за время учебы знания и навыки, продемонстрировала интерес к работе. Вежлива и корректна в отношении с коллегами. В рамках поставленной цели при выполнении дипломной работы студентка освоила новые молекулярно-биологические методы.

Результат дипломной практики Симахиной А.С. заслуживает отличной оценки.

Научный руководитель:

д.б.н., профессор

кафедры фундаментальной

и прикладной микробиологии



Баймиев А.Х.

РЕЦЕНЗИЯ

На дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Симахиной Аделии Сергеевны.

Тема дипломной работы «Маркирование зеленым флуоресцентным белком пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 3Н для возможности быстрой детекции указанных бактерий в различных отделах ЖКТ» является актуальной. Это обусловлено тем, что в условиях возрастающей потребности в новых пробиотических препаратах, надежные способы маркирования микроорганизмов обеспечивают возможность комплексной оценки их эффективности, в том числе и *in vivo*.

Дипломный проект представляет собой самостоятельное исследование и включает введение, 3 главы собственных исследований, выводы, список литературы и приложение. В первом разделе автором раскрываются общие вопросы по истории открытия пробиотиков и их значении, применении в составе таких препаратов штаммов *B.subtilis* и способах их маркирования. Во второй главе подробно освещены используемые методы исследования.

Научно-практическую ценность представляет основной результат работы, заключающийся в создании генно-инженерной конструкции, несущей ген *turbogfp*. Благодаря этому экспериментальным путем получены витально маркированные GFP клоны *B.subtilis* 3Н.

Работа очень хорошо иллюстрирована, что существенно облегчает восприятие представленной в ней информации. Большую ценность имеют авторские фотографии результатов, благодаря которым можно провести сравнение интенсивности флуоресцентного свечения различных маркированных клеток (*B.subtilis* 3Н и *E.coli*).

Дипломный проект написан на хорошем теоретическом и практическом уровне. Содержание работы говорит о том, что автор проявил себя грамотным специалистом, умеющим самостоятельно работать со специальной литературой, способным конкретизировать, формализовать поставленную задачу и решить ее практически.

Дипломная работа Симахиной А.С. удовлетворяет всем предъявляемым требованиям, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

д.м.н., профессор
зав. кафедрой фундаментальной
и прикладной микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ
Минздрава России



А.Р. Мавзютов

РЕЦЕНЗИЯ

На дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Симахиной Аделии Сергеевны.

Известно, что бактерии рода *Bacillus* являются составной частью многих пробиотических препаратов и успешно применяются для нормализации микробной флоры организма. Однако при оценке терапевтического эффекта необходимо получать данные об их локализации на всех участках пищеварительного тракта, и регистрация флуоресцентного свечения значительно облегчило бы такую задачу. В связи с этим маркирование зеленым флуоресцентным белком пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 3Н для возможности быстрой его детекции в различных отделах ЖКТ на сегодняшний день представляется исключительно актуальным.

Содержание работы полностью соответствует утвержденному плану. Текст состоит из введения, трех глав, выводов, а также из списка использованной литературы и приложения. Во введении четко сформулирована актуальность, цели и задачи исследования.

В первой главе дипломной работы автором проведен достаточно подробный и квалифицированный анализ необходимой литературы, включающей в себя как отечественные, так и зарубежные источники. Детально раскрыты такие понятия, как пробиотики и их влияние на организм, механизм, особенности получения меченых бактерий и многие другие.

В практической части Симахина А.С. детально описала все проделанные этапы, необходимые для осуществления поставленной цели,

начиная с метода выделения ДНК, заканчивая микрокопированием трансформантов. Студентка грамотно изложила основные итоги своей работы и привела полученные фотографии, наглядно иллюстрирующие результаты исследования.

В процессе написания проекта автор показал себя как подготовленный специалист, обладающий необходимыми теоретическими знаниями, и способный применять их на практике.

Дипломная работа Симахиной А.С. удовлетворяет всем предъявляемым требованиям, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

д.б.н., профессор зам. директора
по науке ФГБУН Института биохимии
и генетики УНЦ РАН



Чемерис А.В.