

Пушкинский научный центр Российской академии наук
Пушкинский государственный естественно-научный институт
Администрация города Пушкино

УДК 573.4; 574.6; 577.1; 577.2; 577.3; 577.4; 581.5; 591.1; 631.4

БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 17-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых (Пушкино, 21 – 26 апреля 2013 г.). Сборник тезисов.

Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» - научное мероприятие, проводимое для ознакомления молодых ученых с перспективами и новейшими достижениями в различных областях биологии.

Работа школы-конференции проводится по следующим направлениям: микробиология и вирусология; математическая биология и биоинформатика; биофизика и радиобиология; молекулярная биология; биохимия; почвоведение и агроэкология; биотехнология; физиология животных и биомедицина; физиология растений и фотобиология; экология; приборы и методы для биологии, биотехнологии и медицины.

В программу школы-конференции, кроме устных и стендовых докладов участников, входят лекции ведущих российских и зарубежных ученых, круглые столы, мастер-классы, тренинги, форсайты, экскурсии по институтам Пушкинского научного центра, научные и творческие конкурсы, насыщенная культурная и спортивная программа.

ISBN 978-5-9903901-3-3



**17-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых
«БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА»**

The 17th INTERNATIONAL PUSHCHINO SCHOOL CONFERENCE OF YOUNG SCIENTISTS
«BIOLOGY – THE SCIENCE OF THE XXI CENTURY»

**Россия, г. Пушкино, 21 – 26 апреля 2013 г.
www.biology21.ru**

Пушкино, 2013



мицелия. Полученные органогенные структуры картофеля в селективной питательной среде пересежены на среду для регенерации.

Использование местных штаммов гриба *Phytophthora infestans* позволит получить ценные формы картофеля, устойчивые к фитофторозу для Казахстана, которые будут идентифицированы и паспортизированы с помощью молекулярно-генетического анализа.

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАНТНОМУ ТРАНСКРИПЦИОННОМУ ФАКТОРУ SOX2

Секенова А.Е., Балтабекова М.Ж., Хасенов Б.Б., Огай В.Б.

РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Астана (Казахстан)

a.sekenova@mail.ru

Целью нашей работы было получение поликлональных антител к рекомбинантному транскрипционному фактору Sox2 человека и оценка их специфичности с помощью иммунохимических методов.

Для получения рекомбинантного антигена Sox2 использовался экспрессионный вектор рЕТ-28а, в котором целевой ген Sox2 был встроен по рестрикционным сайтам NdeI и XhoI под контролем промотора РНК-полимеразы бактериофага T7. Полученной конструкцией были трансформированы следующие штаммы *E. coli*: Artic Express(DE3) RP, BL21(DE3) pLysS и Rosetta(DE3) pLysS. Очистку белков проводили металлохелатной хроматографией на ионах никеля Ni²⁺ с последующим диализом. Для получения поликлональных антител, были использованы половозрелые кролики, которых иммунизировали подкожно рекомбинантным Sox2. После пяти циклов иммунизации, сыворотку выделяли и очищали с помощью диализа. Специфичность полученных антител оценивали с помощью ИФА, иммуноблота и иммуноцитохимии. В качестве контроля использовали коммерческие кроличьи поликлональные антитела к Sox2 (Invitrogen, США).

При анализе белковых фракций было выявлено, что наибольшая экспрессия Sox2 наблюдалась в штамме Rosetta(DE3) pLysS. Результаты, полученные с помощью белковой масс-спектрометрии показали, что исследуемые пептиды с высокой достоверностью относятся к пептидам человеческого Sox2. Перекрытие по пептидам составило более 50%. Иммунохимический анализ полученных поликлональных антител показал, что антитела обладают высокой специфичностью к рекомбинантному Sox2, что было подтверждено титрами в ИФА (1:12800) и иммуноблоте (1:1600). Кроме того, было обнаружено, что поликлональные антитела могут специфически реагировать с нативным транскрипционным фактором Sox2, экспрессирующимся в плюрипотентных стволовых клетках человека.

Таким образом, специфичность и иммунохимические характеристики полученных кроличьих поликлональных антител не уступают коммерческим аналогам, что позволяет использовать их для определения экспрессии транскрипционного фактора Sox2 в стволовых клетках.

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГИБРИДНОГО БЕЛКА ESC-C/LYSK В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Совгир Н.В., Голенченко С.Г., Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, Минск (Беларусь)

nata506b@mail.ru

Катионные антимикробные пептиды (АМП) перспективны для создания антибактериальных препаратов. Однако некоторые особенности строения АМП, такие как небольшой размер, малая молекулярная масса и относительно высокий положительный заряд молекул при физиологическом значении pH, препятствуют получению пептидов традиционным биотехнологическим путем в результате прямого клонирования и последующей экспрессии соответствующих генов в клетках *E. coli*. Кроме того, катионные пептиды обладают потенциальной способностью губительно действовать на штамм-продуцент, нарушая целостность мембраны клеток изнутри, а также подвержены протеолитической деградации. Использование системы экспрессии фьюжн-белков, содержащих АМП, позволяет преодолеть ряд описанных выше препятствий.



В качестве объектов исследования в работе выступали функциональный аналог АМП эскулентина-1b (*Rana esculenta*) – эскулентин-С (далее Esc-С) и эндолизин стафилококкового бактериофага К (далее LysK).

Esc-С – пептид из 47 аминокислотных остатков, по-видимому, не может быть получен в нативном виде в клетках *E. coli*, т.к. быстро деградируется клеткой.

Антистафилококковый белок LysK по размеру на порядок превосходит Esc-С (495 а.о.) и эффективно экспрессируется в клетках *E. coli* как в нерастворимой, так и в растворимой формах в зависимости от условий проведения индукции 1мМ ИПТГ в LB-среде: в течение 4 часов при 37°C формируются тельца включения, в течение 18-20 часов при 20°C образуется растворимый белок.

Синтезированный в результате двух последовательных ПЦР ген, кодирующий фьюжн-белок Esc-С/LysK, клонировали по сайтам рестрикции *Nde* I и *Eco* RI в составе вектора экспрессии pET24b(+) в клетках *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Для того чтобы получить белок Esc-С/LysK в нерастворимой и растворимой формах, индукцию проводили при вышеописанных условиях. После чего осажденные клетки лизировали ультразвуком, а лизат центрифугировали. Уровень экспрессии и наличие целевого продукта в осадке и супернатанте определяли электрофоретически в SDS/PAGE.

В отличие от LysK, фьюжн-белок не образуется в растворимой форме, поскольку наблюдался только в осадках, что может свидетельствовать об образовании им телец включения, что предохраняет фьюжн-белки от деградации. Получить растворимые формы фьюжн-белков, содержащих Esc-С (как с LysK, так и с рядом других партнёров) нам не удалось. Мы предполагаем, что Esc-С содержит сигнал, приводящий к деградации всего химерного полипептида. В дальнейшем планируется локализовать и проанализировать структуры, за счёт которых происходит деградация Esc-С-содержащих белков.

КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЕ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.) НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ

Сулейменов Р.М., Рашиденова Ж.А., Тагиманова Д.С., Райзер О.Б.

ТОО Научно-производственный центр зернового хозяйства им. А.И.Бараева,
Астана (Казахстан)

hapilina@biocenter.kz; rsuleimenov@mail.ru

Методы биотехнологии растений в большинстве случаев основаны на манипуляциях с изолированными органами, тканями или клетками *in vitro* на искусственных питательных средах. Успех клеточной селекции во многом определяется способностью культивируемых клеток к соматическому эмбриогенезу, в т.ч. и на селективных средах.

Изучение культуры тканей гороха проводилось в направлении выбора оптимальной концентрации селективного агента (биотического и абиотического) в индукционной среде для отбора устойчивых каллусных линий. Исследования проводились на 640 листовых эксплантах гороха, которые культивировались на селективных средах, содержащих различные концентрации селективных агентов (культуральный фильтрат, хлорид натрия и ПЭГ-6000). В качестве биотического стрессора использовали культуральный фильтрат гриба *F. oxysporum* штамм F29, выделенного из растений гороха, пораженных фузариозом.

Проведенные исследования показали, что наиболее токсичным из всех используемых стрессоров был культуральный фильтрат штамма F29, ЛД₅₀ которого наблюдали при использовании 10 %. Каллусные клетки гороха были относительно резистентными к воздействию ПЭГ-6000 и хлориду натрия, ЛД₅₀ которых были 30 и 20 %, соответственно.

Индукция каллусогенеза гороха на селективных средах с культуральным фильтратом наиболее интенсивно происходила на варианте с 5 %-ной концентрацией. Масса первичных каллусных тканей составляла в среднем 115,2±2,3 мг, на контрольном варианте - 135,4±3,9 мг. На селективных средах с ПЭГ-6000 и хлоридом натрия снижение каллусообразования происходило на вариантах, содержащих от 20 до 30 % стрессора. Наибольшее ингибирующее действие селективных агентов проявлялось в снижении прироста биомассы каллусов: снижение этого показателя на всех используемых стрессорах варьировало от 22,5 до 89,5 %.