

слабо зависит от pH. Анализ мутантных вариантов Gfh1-фактора *D. radiodurans* показал, что замена его активного центра на последовательность *T. thermophilus* не приводит к изменению его свойств, в то время как замены ключевых аминокислотных остатков на аланины ведут к потере ингибирующей активности. Нами показано, что оба Gfh-фактора *D. radiodurans* повышают значения констант Михаэлиса для инициаторных нуклеотидов, причем сильнее действуют на связывание 5'-концевого субстрата (хотя и находятся в активном центре РНКП ближе к 3'-концевому нуклеотиду). Полученные данные позволяют предполагать, что ингибирующий эффект исследуемых факторов определяется не непосредственным взаимодействием с субстратами реакции, а воздействием на конформацию активного центра РНКП и/или на связывание каталитических ионов металла.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-14-01074.

## ПОЛУЧЕНИЕ БЫЧЬЕГО ПРЕПРОХИМОЗИНА В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Акишев Ж.Д., Хасенов Б.Б.

<sup>1</sup>РГП Национальный центр биотехнологии КН МОН РК, Астана, Казахстан

zhigerakishev@gmail.com

Бычий химозин является особым членом группы аспарагиновых протеаз, синтезируемых в четвертом желудке новорожденных телят. Этот фермент секретируется клетками слизистой оболочки желудка в виде зимогена, известный как препрохимозин. Химозин содержит два остатка аспарагиновой кислоты в активном центре, Asp32 и Asp215, которые катализируют селективное расщепление Phe105-Met106 пептидной связи в молекуле карра-казеина, которые в свою очередь стабилизируют мицеллы молока. Химозин используется в пищевой и медицинской промышленности. В последние годы в связи с недостатком сырья для получения сычужного фермента существует проблема поиска альтернативных источников химозина. Один из путей ее решения в использовании рекомбинантных форм фермента.

В качестве исходной нуклеотидной последовательности для гена прохимозина теленка были использованы данные GenBank (j00003.1). Сборка фрагментов гена проводилась методом ПЦР. Были использованы 19 олигонуклеотидов протяженностью 80 оснований, которые имели область перекрытия в 20 нуклеотидов. Синтез проходил в два раунда. На первом этапе замешивали все внутренние 80-мерные олигонуклеотиды, и проводилась ПЦР для их отжига друг на друга. Второй раунд состоял в ПЦР с использованием полученного ПЦР-продукта первого раунда в качестве матрицы и фланкирующих фрагмент праймеров. В результате была осуществлена сборка двух фрагментов гена I (602 п.о.) и II (564 п.о.) и осуществлено их клонирование в вектор рGEM-T. С использованием данных двух плазмид и фланкирующих олигонуклеотидов была осуществлена окончательная сборка гена *preprochymB*. Далее проводилось клонирование цельного гена (ПЦР-продукта) в плазмидный вектор рGEM-t. Было проведено секвенирование плазмидной ДНК клонов по M13 региону на правильность сборки и наличия мутаций. В результате анализа нуклеотидной последовательности выявлено 10 нуклеотидных мутаций, которые ведут к 7 аминокислотным мутациям. Устранение мутаций проводилось методом сайт-направленного мутагенеза по протоколу Quick Change. После окончательной сборки полноразмерного гена и удаления всех мутаций, ген препрохимозина В был клонирован в составе экспрессионного бактериального вектора рЕТ-28с(+).

Вектором рЕТ-28с(+)/prochymB были трансформированы компетентные клетки штаммов Rosetta(DE3). В результате был создан штамм, обеспечивающий внутриклеточное накопление рекомбинантного белка препрохимозина В в форме телец включения. Выделение рекомбинантного препрохимозина В проводилось путем растворения белка в 7 молярной мочеvine с последующей очисткой методами хроматографии.

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ФОСФОЛИПИДОВ ХРОМАТИНА КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС К *IN VIVO* ВОЗДЕЙСТВИЮ ЦИСПЛАТИНА

Акопян Н.Р., Явроян Ж.В., Оганесян А.Г., Саркисян Э.Г., Геворкян Э.С.

Ереванский Государственный Университет, Ереван, Армения

nunehakobyan@rambler.ru

В настоящее время считается доказанным, что примерно 10% ядерных липидов входит в состав хроматина. Известно, что хроматиновые липиды участвуют в регуляции важнейших функций ядра, как репликации и транскрипции. Регуляторная активность хроматиновых липидов имеет дозо-зависимый характер. Не исключено участие хроматиновых фосфолипидов в механизмах проявления противоопухолевых эффектов цисплатина (цис-диаминдихлорплатин), основной мишенью которого является молекула ДНК. Цисплатин может проявлять свои цитостатические, антинеопластические и проапоптотические эффекты путем количественных изменений содержания отдельных липидов внутриядерных структур.

Исследовано 24-часовое *in vivo* воздействие цисплатина на суммарное содержание фосфолипидов хроматина клеток головного мозга крыс. Полученные результаты свидетельствуют о том, что суммарное

содержание фосфолипидов хроматина клеток крыс снижается на 24% после воздействия цисплатина. Известно, что цисплатин способен угнетать метаболизм липидов. По всей вероятности значительное сокращение суммарного содержания фосфолипидов хроматина обусловлено именно способностью цисплатина подавлять метаболизм липидов. Количественный анализ фракционированных методом микротонкослойной хроматографии фосфолипидов хроматина клеток головного мозга крыс показал, что все пять фракции фосфолипидов проявляют высокую чувствительность к воздействию цисплатина. Так, зарегистрировано максимальное сокращение абсолютного количества фосфатидилэтаноламина на 34,4%. Абсолютное количество кардиолипина по сравнению с контрольным вариантом уменьшается на 15%. Содержание остальных трех фосфолипидов – сфингомиелина, фосфатидилинозитола и фосфатидилхолина сокращается соответственно на 20,25%, 22,2% и 23,2%.

Результаты свидетельствуют о глубоких и разных трансформациях метаболизма липидов в ядре, и, в частности, в хроматине при *in vivo* воздействии противоопухолевого препарата. Обсуждается возможная роль количественных изменений фосфолипидов в механизмах проявления противоопухолевого эффекта цисплатина.

### **КАРТИРОВАНИЕ РАЙОНОВ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА И ТЕЛОМЕРНЫХ ПОВТОРОВ НА ХРОМОСОМАХ МОЛЛЮСКА *LITTORINA SAXATILIS* ИЗ КОМПЛЕКСА КРИПТИЧЕСКИХ ВИДОВ**

**Алешкина Д.Д., Галкина С.А., Михайлова Н.А.**

ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*alyoshkina\_darya@list.ru*

Существенные хромосомные перестройки могут приводить к постзиготической изоляции особей из отдельных популяций и служить маркером появления новых видов и, таким образом, играть важную роль в процессе эволюции. Одним из наиболее интересных примеров формирования комплекса близкородственных видов в процессе репродуктивной изоляции и конвергентной эволюции являются криптические виды. Как правило, эти виды морфологически сходны, однако отличаются структурой геномов.

Морские моллюски рода *Littorina* – один из ярких примеров комплекса криптических видов. Комплекс “*saxatilis*” включает в себя три близкородственных вида (*L. saxatilis*, *L. compressa* и *L. arcana*), среди которых два – *L. saxatilis* и *L. arcana* – виды-двойники. Идентификацию видов-двойников можно надежно проводить по морфологии гонады самок, поскольку *L. saxatilis* – вид живородящий, самки *L. arcana* откладывают кладки.

Для поиска цитогенетических различий в комплексе близкородственных видов проведен анализ кариотипа *L. saxatilis* с помощью картирования теломерных и центромерных районов хромосом, а также мест локализации ядрышкового организатора (18S рДНК) (ЯО). В работе использован метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Особи *L. saxatilis* были собраны из двух географически удаленных друг от друга популяций – побережье Шотландии и побережье Баренцева моря (пос. Дальние Зеленцы, Россия). Метафазные пластинки получены на препаратах из тканей эмбрионов моллюсков. Охарактеризовано 28 полных кариотипов *L. saxatilis*, каждый из которых содержит 17 пар хромосом (2n=34). Особи из разных географических популяций не различались по числу хромосом. Результаты FISH с зондом к теломерному повтору (TTAGGG)<sub>n</sub> показали, что теломерный повтор локализуется только на концах хромосом и не содержится в интерстициальных районах хромосом у особей из обеих популяций. FISH с зондами к 18S рДНК позволил локализовать район ядрышкового организатора (ЯОР). Мы обнаружили вариабельность в количестве ЯОР: идентифицированы от 2-х до 7-х пар ядрышкообразующих хромосом. FISH с зондами к центромерному повтору морского моллюска *Conus magus* не выявил флуоресцентного сигнала в перичентромерных и центромерных районах хромосом *L. saxatilis*. Полученные данные позволят провести сравнение кариотипов близкородственных видов группы “*saxatilis*” для выявления видоспецифичных различий на хромосомном уровне.

Работа выполнена с использованием приборной базы кафедры зоологии беспозвоночных и ресурсного центра “Хромас” СПбГУ (<http://chromas.spbu.ru/>), при поддержке гранта РФФИ 15-04-08210.

### **СОЧЕТАННОЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS PUMILUS* И ДОКСОРУБИЦИНА НА КЛЕТКИ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА А549**

**Амутбаева А.И., Зеленихин П.В.**

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*luntik051995@gmail.com*

В последние десятилетия частота возникновения злокачественных опухолей легких у людей значительно возросла, данный тип онкопатологий уверенно держит первое место среди причин смерти от раковых заболеваний. В связи с этим поиск новых методов и способов терапии малигнизированных опухолей легких чрезвычайно актуален. В качестве перспективных агентов противоопухолевой терапии