

Как видим, по отдельным параметрам микробиологического исследования содержимого толстого кишечника после проведенного комплексного лечения нами также был установлен протективный эффект специализированного продукта «Сергектік» в отношении развития выраженных нарушений микроэкологии толстого кишечника у больных с термической травмой.

Полученные данные отражают полифункциональность разработанного на плодовоовощной основе специализированного продукта для нутритивной поддержки базисного лечения больных ожоговой болезнью, позволяющего достаточно эффективно корригировать на наиболее важные патогенетические звенья заболевания, тем самым, ускоряя обратное развитие основных симптомов и синдромов, а также повышая общую эффективность лечения.

Литература

1. Лифшиц Р.И. Экспериментальное обоснование клинического применения нового белкового препарата крови в лечении ожоговой болезни: матер. республ. научно-практ. конф. по проблеме термических повреждений. - Горький, 1990.- С.82–83.
2. Повстаной Н.Е., Козинец Г.П. и др. Применение различных методов детоксикации при ожоговой болезни: матер. I республ. научно-практ. конф. по проблеме термических повреждений. - Горький, 1990.- С.95.
3. Кардовский А.Г., Макин В.П., Домнина А.Д. Применение плазмозаменителей на основе оксиэтилкрахмала в трансфузионной терапии ожогового шока: матер. республ. научно-практ. конф. по проблеме термических повреждений. - Горький, 1990.- С.73–74.
4. Кузин М.И., Заец Т.Л. Нарушения метаболических процессов в патогенезе ожоговой болезни и пути ее коррекции // Хирургия.- 1981.- № 5.- С.35-43.
5. Рябинин В.Е., Лифшиц Р.И. Состояние и возможные механизмы нарушений кислородозависимых процессов при ожоговой болезни (обзор) // Вопросы мед. химии, 1990. - № 1. - С.7–13.
6. Сачко А.А. Мофогенез и патологическая анатомия раны и органов – исполнителей иммунной системы в условиях лечебного применения белков КОН-1У-1 и альфа-1-кислого гликопротеина: автореф... канд. мед. наук.- М., 1996. - 20 с.
7. Львовская Е.И. Нарушение процессов липидной пероксидации при термической травме и патогенетическое обоснование терапии антиоксидантами из плазмы крови: автореф... докт. мед. наук.- Челябинск, 1998. -41 с.
8. Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И. Человек и противовоспалительные вещества.- Л., 1985.- 230.
9. Пылаева С.И., Гординская Н.А., Кувакина Н.А. Микробиологическая характеристика внутрибольничной инфекции у тяжело обожженных: материалы VII съезда Всероссийского общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов.- М., 1997.- Т.2, С.- 186.
10. Меньщикова Е.Б., Линкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты.- М.: Слово, 2006.-556 с.

УДК 577.216.3, 577.218

Р.В. Крылдаков*, О.В. Карпова, Г.Э. Станбекова, Б.К. Исаков
Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан
*e-mail: kryldakov@mail.ru

Клонирование кДНК-фрагментов геномной рнк

М-вируса картофеля, кодирующих потенциальные супрессоры РНК-интерференции

В настоящей работе амплифицированы 3'-проксимальные открытые рамки считывания (ОРС25К, ОРС12К, ОРС7К, ОРС34К и ОРС11К) геномной (г)РНК М-вируса картофеля (PVM). Проведено клонирование амплифицированных фрагментов с использованием Gateway-технологии сначала в бактериальном (pDONR207), а затем в растительном (pMDC32) векторе под контролем двойного 35S промотора.

Этот этап работы посвящён амплификации целевых фрагментов гРНК PVM и их клонированию для последующей трансформации агробактерий и ко-инfiltrации растений, с целью идентификации вирусных белков – супрессоров RNAi.

Ключевые слова: М-вирус картофеля (PVM), РНК-интерференция (RNAi), клонирование ОРС гРНК PVM, PVM белки - супрессоры RNAi.

Р.В. Қырылдақов, О.В. Карпова, Г.Э. Станбекова, Б.Қ. Ысқақов

РНҚ-интерференцияның ықтимал басқыштарын кодтайтын картоп М-вирусының геномдық РНҚ-ның кДНК-бөліктерін клондау

Осы жұмыста кері транскрипция (КТ) және полимераздық тізбекті әрекеті (ПТӘ) көмегімен 3'-ұшына жақын ашық оқылатын PVM геномдық (г)РНҚ бөліктері (ОРС25К, ОРС12К, ОРС7К, ОРС34К и ОРС11К) көбейтілді. Gateway-технологияны пайдаланып көбейтілген бөліктер қосарланған 35S промоторы бақылауымен бастапқыда бактерия (pDONR207), одан кейін өсімдік векторында (pMDC32) клондалды. Жұмыстың бұл кезеңі кейін вирус белоктары арасында ықтимал RNAi супрессорларын айқындау мақсатымен өсімдіктерді агробактериялармен трансформациялауға және со-инфильтрациялауға арналған.

Түйін сөздер: картоптың М-вирусы (PVM), РНК-интерференция (RNAi), PVM гРНҚ АОБ клондау, PVM RNAi басқыш белоктары.

R. Kryldakov, O. Karpova, G. Stanbekova, B. Iskakov

Cloning of cDNA fragments of potato virus m genomic RNA that encode of potential suppressors of RNA-interference

With the help of the methods of reverse transcription and polymerase chain reaction (PCR) open reading frames of RNA of Potato virus M (ORF25K, ORF12K, ORF7K, ORF34K, ORF11K) were amplified. Amplified fragments were cloned into bacterial (pDONR207) and plant (pMDC32) vectors with using of Gateway-technology. Virus suppressor proteins should be identified on the following step of the work.

Keywords: Potato virus M (PVM), RNA interference (RNAi), cloning of open reading frames of RNA of PVM, RNA silencing suppressor proteins.

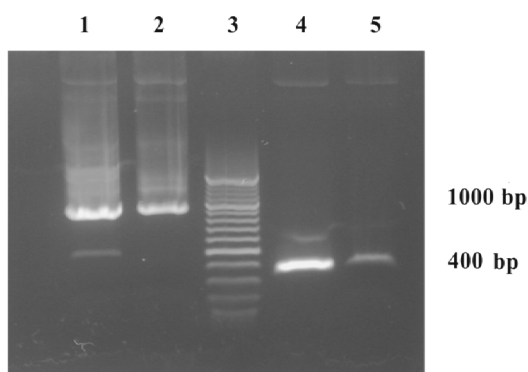
В настоящее время РНК-интерференция (RNAi) признана одним из важных клеточных механизмов, участвующих в метаболизме РНК. RNAi играет важную роль не только в процессах модуляции стабильности и деградации мРНК, но также в регуляции процессов трансляции мРНК, транскрипции генов, поддержании структуры хроматина и целостности генома [1]. У растений этот механизм первоначально получил название пост-транскрипционного молчания генов или PTGS (от Post-Transcriptional Gene Silencing) и рассматривался как основной клеточный механизм защиты от вирусов [2]. Было также установлено, что многие вирусные белки способны подавлять (супрессировать) клеточный процесс RNAi (RSS-белки – от RNA silencing suppressor proteins) и тем самым обеспечивать преимущество вирусов при размножении в клетках растений [2, 3]. К настоящему времени для некоторых растительных вирусов RSS-белки установлены и показаны молекулярные механизмы их функционирования [3-5]. Однако для большинства других вирусов и в частности для М-вируса картофеля (PVM) RSS-белки и механизмы их действия остаются мало исследованными.

М-вирус картофеля (PVM от potato virus M) является фитовирусом, относящимся к роду *Carlavirus* семейства *Flexiviridae* [6]. Частицы этих вирусов имеют вид гибких палочек и состоят из единственной однонитевой плюс - цепи геномной (г)РНҚ с мол. массой $2,4 \times 10^6$ Да (8534 нуклеотида) и множества одинаковых субъединиц капсидного белка с мол. массой 34 кДа, которые упаковывают гРНҚ в виде спирали [7-9]. Вирионы PVM длиной 650 нм и 12-13 нм в диаметре имеют коэффициент седиментации ($S_{20, w}$) около 176 S.

Вирус PVM может передаваться при механическом контакте между растениями, а также непersistентно тлями. Круг хозяев является достаточно узким, тем не менее, PVM распространен повсеместно и, особенно, в областях с умеренным климатом, где произрастает картофель (*Solanum tuberosum*). Вирус PVM является экономически важным, т.к. потери урожая, вызванные инфекцией растений картофеля PVM, обычно составляет около 20 %, но в сочетании с другими вирусами могут быть значительно выше (до 50 %).

Целевые кДНК-фрагменты гРНҚ PVM были амплифицированы с помощью реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров (рисунок 1, 2). Для удобства клонирования праймеры содержали на концах короткие последовательности, необходимые для дальнейшего встраивания в плазмидный вектор и клонирования в бактериях.

ВР реакция с использованием Gateway технологии [10, 11]. ДНК донорного вектора имеет в своем составе специфические последовательности, т.н. *attP1* и *attP2*, которые комплементарны к районам *attB1* и *attB2*, находящимся на 5'- и 3'-концах олигонуклеотидных праймеров. Все олигонуклеотидные праймеры несли на своем 5'-проксимальном конце последовательность *ggggacaagttgtgacaataaagcaggctatg*, а на 3'-проксимальном – последовательность *ggggaccactttgtaacaagaagctgggtc*. В результате ВР реакции происходит рекомбинация этих двух участков между собой, с участием фермента ВР Clonase.



Амплификация кДНК-фрагментов генома PVM, кодирующих белки 34К и 11К: 1 и 2 – ПЦР-продукт с OPC34К; 3 – маркеры; 4 и 5 – ПЦР-продукт с OPC11К.

Рисунок 1 – Результаты электрофореза продуктов обратной транскрипции и сопряженной полимеразной цепной реакции с участием гРНК PVM и специфических праймеров

Таким образом, был получен промежуточный вектор pENTR207, несущий в своем составе амплифицированные фрагменты гРНК PVM.

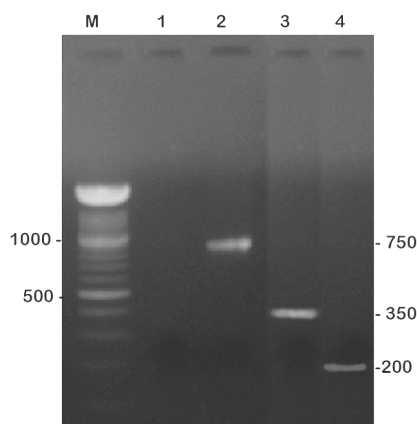
LR реакция с использованием Gateway технологии [10, 11]. Целевые кДНК-фрагменты гРНК PVM, заклонированные в последовательность Entry-вектора pENTR207, имеют на своих фланговых участках специфические последовательности - так называемые *attL1* и *attL2*, образовавшиеся в результате ВР-рекомбинации. Таким образом амплифицированные фрагменты могут быть клонированы в Destination-вектор pMDC32. Для этого проводилась реакция с участием Entry-вектора pENTR207, Destination-вектора pMDC32, в присутствии LR-Clonase, белков рекомбинации (Int, IHF, Xis). В результате рекомбинации между участками *attL* Entry-вектора pENTR207 и участками *attR* Destination-вектора pMDC32, целевые кДНК-фрагменты гРНК PVM были клонированы в составе Destination-вектора pMDC32 под контролем двойного 35S-промотора.

Реакция рестрикции по уникальным сайтам проводилась по стандартной методике. Были подобраны оптимальные условия реакции для каждого кДНК-фрагмента гРНК PVM. Так как каждая рестриктирующая эндонуклеаза (*SacI*, *KpnI*) лучше всего функционировала в разных по ионному составу буферных системах, был подобран оптимальный буфер для обеих рестриктаз – Tango-буфер. При двукратном значении этой буферной системы, активность обеих рестриктирующих эндонуклеаз составляла около 50%. Анализ результатов рестрикции проводили в 1% агарозном геле.

Трансформация компетентных клеток бактерий *Escherichia coli* штамма DH5 α методом теплового шока, реакция лигирования, электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле, выделение и очистка ДНК, определение концентрации ДНК проводили по стандартным методикам [12].

Таким образом, необходимые кДНК-фрагменты гРНК PVM встраивались в векторную кассету с необходимыми промотором, терминатором и геном устойчивости к селективному антибиотику. Клонирование происходило по рекомбинационным сайтам *attP* и *attB*, с помощью фермента ВР-клоназы. Далее, с использованием реакции LR рекомбинации целевые фрагменты гРНК PVM были клонированы в вектор назначения pMDC32 под контролем двойного 35S промотора. Канамицин использовался как селективный антибиотик. Корректность клонирования после каждого этапа была проверена рестрикционным и ПЦР анализом, а также секвенированием. Проведен электрофоретический анализ фрагментов ДНК.

Таким образом, все амплифицированные кДНК-фрагменты гРНК PVM были клонированы в бактериальных и растительных векторах.



Амплификация кДНК-фрагментов генома PVM, кодирующих белки 25К, 12К и 7К: 1 – маркеры, 2 – отрицательный контроль реакции, 3 – ПЦР-продукт для OPC25К, 4 – ПЦР-продукт для OPC12К, 5 – ПЦР-продукт для OPC7К.

Рисунок 2 – Результаты электрофореза продуктов обратной транскрипции и сопряженной полимеразной цепной реакции с участием гРНК PVM и специфических праймеров

На следующем этапе работы предстоит идентифицировать вирусные белки – супрессоры клеточного процесса RNAi путем транзитной экспрессии клонированных ОРС гРНК РММ в индикаторных растениях табака *Nicotiana benthamiana* линии 16С.

Литература

- 1 Baulcombe D. RNA silencing in plants // Nature. - 2004. - V. 431. - P. 356-363.
- 2 Voinnet O. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility // Curr. Opin. Plant Biol. - 2008. - V.11. - №4. - P.464-470.
- 3 Ruiz-Ferrer V., Voinnet O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses // Annual Review of Plant Biology. - 2009. - V. 60. - P. 485-510.
- 4 Alvarado V., Scholthof H.B. Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens // Semin.Cell. Dev. Biol. - 2009. - V.20. - №9. - P.1032-1040.
- 5 Омаров Р.Т., Берсимбай Р.И. Биохимические механизмы супрессии РНК-интерференции вирусами растений // Биохимия. - 2010. - Т. 75, Вып. 8. - С. 1062-1069.
- 6 Zavriev S.K., Kanyuka K.V., Levay K.E. The genome organization of potato virus M RNA // J. Gen. Virol. - 1991. - V. 72. - P. 9–14.
- 7 Proll E., Leiser R.M., Ostermann W.D., Spaar D. Some physicochemical properties of potato virus M // Potato Res. - 1981. - V. 24. - P. 1–10.
- 8 Flatken S., Ungewickell V., Menzel W., Maiss E. Construction of an infectious full-length cDNA clone of potato virus M // Arch. Virol. - 2008. - V. 153. - P. 1385–1389.
- 9 Tavantzis S.M. Physicochemical properties of potato virus M // Virology. - 1984. - V. 133. - P. 427-430.
- 10 Hartley J.L., Temple G.F., Brasch M.A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination // Genome Res. - 2000. - V.10. - P. 1788-1795.
- 11 Katzen F. Gateway recombinational cloning: a biological operating system // Expert Opin. Drug Discov. - 2007. - V. 2(4). - P. 571-589.
- 12 Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning . A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. - 3 vol. – 245 p.

УДК 577.152.321

А. Кулонов, Д. Мирзарахметова*

Национальный университет Узбекистана, г.Ташкент, Узбекистан

*e-mail: divya_shakti@hotmail.com

Возможность получения функциональных соков на основе ферментативного гидролиза инулина

Исследована кинетика ферментативного гидролиза инулина, выделенного из топинамбура сорта Файз барака. Изучена ферментативная гидролизуемость инулина дрожжевой инвертазой. Выявлено, что инулин гидролизуется инвертазой при pH 4,0, температуре 30°C и времени инкубации 1 час и исходной концентрации инулина 0,5-2,0%. Вышеуказанные результаты открывают возможности для получения функциональных соков и различных напитков, обогащенных фруктозанами.

Ключевые слова: ферментативная конверсия, инвертаза, инулин, функциональные соки, полисахариды.

A. Kulonov, D. Mirzarakhmetova

The opportunity of functional juices production on the basis of inulin enzymatic hydrolyses

The kinetic characteristics of enzymatic hydrolysis of inulin isolated from topinambur Fays baraka was studied. The hydrolysis opportunity of unulin was investigated by application of yeast invertase. It was determined that unulin can be hydrolysed by invertase at pH 4,0, 30°C , during one hour, and initial inulin concentration of 0,5-2,0%. Above mentioned results open up the opportunity for the production of functional juices and various beverages enriched with fructozanes.

Keywords: enzymatic conversion, invertase, inulin, functional juices, polysaccharides.

Исследование биологических факторов, влияющих на процесс ферментативного гидролиза (осахаривания) инулина до моносахаридов является актуальной задачей современной биотехнологии. Одно из направлений этих исследований связано с поиском ферментных препаратов, которые с наибольшей эффективностью способны осуществлять глубокий гидролиз инулина.

Другое – с изучением влияния физико-химических свойств применяемого фермента на ход биоконверсии.