

при дополнительной стимуляции *invitro* неспецифическими бактериальными липополисахаридами, в частности, лекарственным средством – пирогеналом. При первом исследовании на 5–7-е сутки заболевания у подавляющей части пациентов за счет повышения спонтанного показателя и снижения – стимулированного вариантов НСТ-теста регистрировалось значительное уменьшение средних величин индексов стимуляции, отражающих функциональный резерв микрофагоцитарной системы.

Более интенсивный рост индивидуальных параметров стимулированного бактериальным липополисахаридом варианта реакции у пациентов, получавших специализированный продукт питания, также сопровождался большим увеличением бактерицидного внутриклеточного резерва системы по сравнению с больными, находившимися на базисном лечении. Вместе с тем, в обоих случаях усредненные показатели не достигали даже нижнего нормативного уровня: $2,15 \pm 0,11$ и $1,50 \pm 0,09$ в опытной и контрольной группах соответственно, при значениях у доноров – $5,13 \pm 0,14$.

Результаты выполненных открытых испытаний разработанного специализированного продукта питания на плодовоовощной основе «Сергектік» позволили установить его положительный корригирующий эффект на основные звенья развивающейся у больных ожоговой болезнью дефектности функционально-метаболической активности микрофаго-цитарной системы.

Следовательно, предложенный нами новый продукт питания на плодовоовощной основе «Сергектік», предназначенный для нутритивной поддержки базисного комплексного лечения больных с ожоговой болезнью, оказывал достоверный положительный эффект на развитие нарушений в клеточном и гуморальном звеньях иммунологической реактивности, также функционально-метаболической активности клеточных факторов неспецифической резистентности организма.

Иммунокорригирующий эффект специализированного продукта на плодовоовощной основе «Сергектік», очевидно, обусловлен с уменьшением белкового дефицита за счет высокого содержания протеина и включения в его состав творога, а также мощными антиоксидантными свойствами, связанными с присутствием природных антиоксидантов, оказывающих модифицирующий эффект за счет нормализации структурно-функционального состояния иммунокомпетентных клеток.

Литература

- 1 Яковлев В.П., Крутиков М.Г., Елагина Л.В. Иммунодиагностика сепсиса у обожженных // «Межд. симпозиум «Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи». – Тула, 1996. – С.34.
- 2 Chin Ch., Lin T.Y., Bullard M.Y. Appraisal of criteria to identify febrile outpatient neonates at low risk for bacterial // *Pediatr. Infect. Dis.*, 1994. – V.11. – N 13. – P.946–949.
- 3 Peteiro-Cartelle F.J., Alvarez-Jorge A. Dynamic profiles of interleukin and soluble form of CD25 in burned patients // *Burns*, 1999. – V.25. – P.487–491.
- 4 Йегер Л. Клиническая иммунология и аллергология. – М., 1990. – Т.1–2. – 759 с.
- 5 Гуревич К.Я., Костюченко А.Л. Современные концепции применения методов эфферентной терапии при эндогенной интоксикации: тезисы докл. Международного симпозиума «Эндогенные интоксикации». – СПб., 1994. – С.90–94.
- 6 Гринин А.Н. Иммунный статус больных с ожоговой и гнойно-септической перитонеальной интоксикацией и его коррекция афферентными и эфферентными методами // автор... канд. мед. наук. – Саратов, 1998. – 27 с.
- 7 Sturk A., Janssen M., Cood K. et al. Endotoxin testing in blood // *New York.: Alan R. Liss*, 1987. – P.371–385.
- 8 Назаренко А.А., Ярмагомедов А.А., Лебедева Ю.Н. и др. Прогностическое определение плазменного фибронектина при эндотоксикозе // Тез. докл. междунар. симпозиума «Эндогенные интоксикации». – СПб., 1994. – С.80.

УДК 577.218

А.М. Смагулова*, А.С. Низкородова, Е.В. Полянская, Р.В. Крылдаков, Б.К. Исаков
Институт Молекулярной Биологии и Биохимии им. М.А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: ainur_smagulova.kz@mail.ru

Клонирование, экспрессия гена *AtUbp1b* и очистка кодируемого им белка

В клетках эукариотических организмов в ответ на стресс образуются гранулы матричных рибонуклеопротеидов, так называемые стрессовые гранулы. Эти гранулы образуются в результате таких стрессовых воздействий, как тепловой и окислительный шок, облучение ультрафиолетом, голодание по аминокислотам и нуклеотидам. Одним из видов реакций клетки на стресс является фосфорилирование альфа-

субъединицы фактора инициации трансляции 2 (eIF2) и последующее блокирование трансляции. Образование стрессовых гранул происходит с участием РНК-связывающих белков, среди которых идентифицированы белки TIA-1 и TIAR. Эти белки выступают в роли общих трансляционных репрессоров в клетках, подверженных стрессу. Аналогом этих белков в растительных клетках является белок AtUBP1, идентифицированный в *Arabidopsis thaliana*. В данной работе нами впервые был экспрессирован белок AtUBP1b в клетках *E.coli*. Этот белок был очищен с помощью аффинной хроматографии и последующего осаждения сульфатом аммония.

Ключевые слова: стрессовые гранулы, TIAR, AtUBP1b, аффинная хроматография.

A. Smagulova, A. Nizkorodova, E. Poliyanskaya, R. Kryldakov, B. Iskakov
Cloning, expression and purification of *A.thaliana* TIA-protein AtUBP1b

It is now widely accepted that cytoplasmic messenger ribonucleoproteins (mRNPs) granules in eukaryotic cells are formed in response to stress, so-called SGs (stress granules). The formation of these granules is initiated under stress conditions, e.g. heat stress, oxidative stress or UV stress, and directly connected with the block of translation initiation by phosphorylation of eIF2 α . The assembly of the SG depends on RNA binding proteins such as TIA-1 and TIAR. This proteins act as general translational repressors in stressed cells. AtUBP1b, which is identified in *Arabidopsis thaliana*, is plant cells analogue of stress granules proteins. In this study AtUBP1b was expressed in *E.coli* cells for the first time. Protein purification was based on affinity chromatography with usage of commercial nickel-nitrilotriacetate (Ni-NTA) agarose and subsequent ammonium sulfate precipitation.

Keywords: stress granules, TIAR, AtUBP1b, affinity chromatography.

А.М. Смағұлова, А.С. Низкородова, Е.В. Полянская, Р.В. Қрылдаков, Б.Қ. Исқаков
AtUbp1b генін клондау, экспрессиялау және ол кодтайтын белокты тазалау

Эукариоттық ағзалардың жасушаларында жағымсыз жағдайға жауап ретінде матрицалық рибонуклеопротеид гранулалары (жағымсыз жағдай гранулалары деп аталатын) пайда болады. Бұл гранулалар ыстық және тотықтандыру шоғы, ультрафиолетпен сәулелендіру, амин қышқылдары мен нуклеотидтер жетіспеуі әсерінен пайда болады. Жағымсыз жағдайға жауаптың біреуі – трансляция инициациясы факторы 2 (eIF2) фосфорильденуі мен кейін трансляцияның тежелуі. Жағымсыз жағдай гранулалары пайда болуы РНКмен байланысатын белоктар қатысуымен өтеді. Олардың ішінде TIA-1 и TIAR белоктары бар екені анықталды. Бұл белоктар жағымсыз жағдайға душар болған жасушаларда трансляцияның жалпы репрессорлары ретінде әрекет етеді. Өсімдік жасушаларында осы белоктардың іспеттесі болып *Arabidopsis thaliana*-да табылған AtUBP1 белогы. Осы жұмыста біз бірінші болып AtUBP1 белогын *E.coli* жасушаларында экспрессияладық. Ол белок аффинды хроматография көмегімен және кейін аммоний сульфатымен тұнбаланып тазаланды.

Кілт сөздер: жағымсыз жағдай гранулалары, TIAR, AtUBP1b, аффинды хроматография.

В клетках высших эукариот были обнаружены стрессовые гранулы, образующиеся в результате теплового шока, аминокислотного или кислородного голодания, облучения ультрафиолетом [1]. В данных гранулах был идентифицирован ряд РНК-связывающих белков, в частности TIA-1 и TIAR [2]. В группу TIA-1-подобных белков (T-cell-restricted intracellular antigen-1) входят белки, функционирующие как посттранскрипционные регуляторы экспрессии генов [3].

TIA и TIAR (TIA-related) – РНК-связывающие белки семейства рибонуклеопротеидов, имеющие РНК-распознающие мотивы, вовлеченные в клеточный апоптоз в качестве эффекторов [4]. Оба белка TIA/TIAR связываются с уридин-богатыми последовательностями РНК и способствуют образованию стрессовых гранул.

Было показано, что белки TIA и TIAR обнаруживаются в стрессовых гранулах в комплексе с 5'ТОР-РНК (terminal oligourimidine tract) [4]. 5'ТОР представляет собой кэп-структуру, содержащую от 4 до 15 нуклеотидов последовательности «CU» [5]. 5'ТОР-мРНК кодируют белки, относящиеся к группе факторов транскрипции, трансляции, а также структурные рибосомальные белки [4]. В настоящее время проводятся исследования по изучению свойств и механизмов ингибирования трансляции этими белками.

Аналогом белков группы TIA/TIAR в растительных клетках является белок AtUBP1b, идентифицированный в *A. thaliana* [3]. Свойства растительных TIA/TIAR -подобных белков фактически не изучены [6], но было показано, что этот белок также локализуется в стрессовых гранулах. Для определения функций AtUBP1b в клетках необходимы дальнейшие исследования, что предполагает наличие высокоочищенного и функционального белка.

Задачей данного исследования была разработка методики получения в лабораторных условиях нативного высокоочищенного белка AtUBP1b.

Материалы и методы

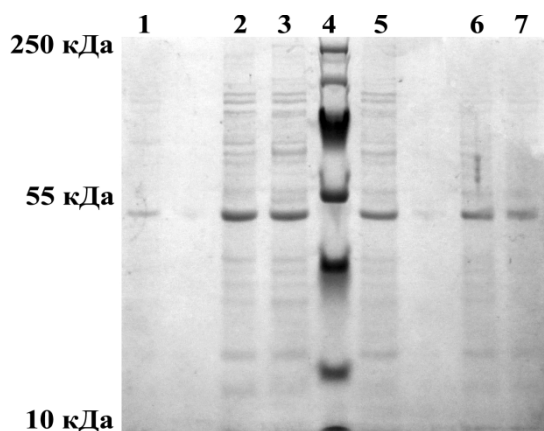
Получение плазмид. Последовательность гена *AtUbp1b* была клонирована в экспрессионный вектор pQE-30 (“QIAGEN”) по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Sal*I таким образом, чтобы на N-конце белка AtUBP1b при экспрессии синтезировалась последовательность гекса-His-tag. Экспрессия гена была поставлена под контроль T5-промотора и терминатора транскрипции и последовательности Шайн-Далгарно.

Экспрессия и очистка белка. Индукция экспрессии белка в клетках *E.coli* M15 осуществлялась добавлением в среду Лурия-Бертани 1 мМ IPTG, инкубирование проводилось 5 часов при +37°C. Очистка белка производилась на Ni-NTA-агарозу (“5PRIME”). Получение клеточного лизата проводили согласно [7]. Очистку белка на Ni-NTA-агарозе осуществляли согласно рекомендациям [8], все операции проводились при +10°C. Связывание белка с Ni-NTA-агарозой проводили при аккуратном перемешивании в течение часа. Промывку колонки осуществляли трижды буфером (50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, pH = 8.0). Элюцию белка с колонки проводили ступенчато 0,5 объёмами буфера (50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 300 мМ имидазол, pH = 8.0) от начально взятого объёма Ni-NTA-агарозы. Высаливание белка проводилось следующими концентрациями (NH₄)₂SO₄ – 25%, 40%, 60%.

Белковый электрофорез и иммунодетекция. Денатурирующий белковый электрофорез проводился в трис-трициновой системе согласно [9]. Перенос белков и последующая детекция проводились на PVDF-мембране с использованием коммерческих антител anti-His HPR Conjugate (“5PRIME”) согласно инструкции производителя. Детекция проводилась Transcend Chemiluminescent Substrate (“Promega”).

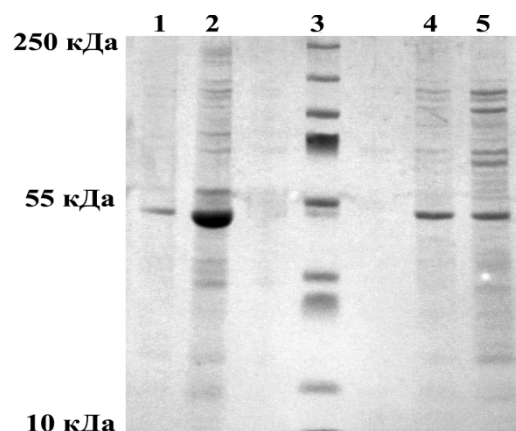
Результаты и их обсуждение

AtUBP1b – белок с молекулярной массой 47 кДа, состоящий из 419 аминокислот [3]. Экспрессионная конструкция была получена на основе плазмиды pQE-30.



1-3, 5-7 – образцы белка, элюированного возрастающей концентрацией имидазола, 4 – белковый маркер Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (“Fermentas”)

Рисунок 1 – Электрофореграмма результатов элюции белков



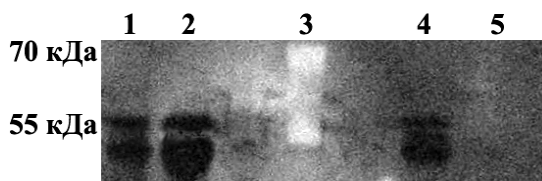
1 – препарат элюатов 1 и 6; 2 – белок, осажденный 25% (NH₄)₂SO₄; 3 – белковый маркер Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (“Fermentas”); 4, 5 – белки, осажденные 40% и 60% (NH₄)₂SO₄ соответственно

Рисунок 2 – Электрофореграмма белков, осажденных сульфатом аммония

Проведенная экспрессия и последующий электрофоретический анализ не выявили наличие целевого белка, однако, вестерн-блот с антителами на последовательность гекса-His-Tag показал наличие белка AtUBP1b. С полученным экстрактом белков *E.coli* была проведена очистка посредством аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (рисунок 1).

В результате элюции (150-300 мМ) имидазолом было получено шесть белковых фракций. Во фракциях 1 и 6 (дорожки 1 и 7 рисунок 1) наблюдалось минимальное количество контаминирующих белков; дан-ные фракции были объединены. Все остальные фракции также были объединены и подверг-нуты следующей ступени очистки – ступенча-тому осаждению (NH₄)₂SO₄ (рисунок 2).

С препаратами белков, осажденных $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, был проведен вестерн-блот анализ с антителами на последовательность His-Tag (рисунок 3). Проведенный анализ выявил наличие белка AtUBP1b во всех фракциях, кроме фракции, осажденной 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (дорожка 5, рисунок 3).



1 – препарат объединенных элюатов 1 и 6; 2 – белок, осажденный 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
3 – белковый маркер; 4, 5 – белки, осажденные 40% и 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ соответственно

Рисунок 3 – Результаты вестерн-блотинга

По электрофореграмме, представленной на рисунок 2, был проведен денсиметрический анализ (ImageJ 1.42q). Было установлено следующее содержание целевого белка AtUBP1b в препаратах: во фракции белков, неосажденных $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 57.84%, во фракции белка, осажденного 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 69.01%, в белковой фракции, осажденной 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 29.86%. Таким образом, из 50 мл исходной суспензии бактерий было получено 0.51 мг белка AtUBP1b, причем чистота белкового препарата превышала 50%.

Литература

- 1 Kedersha N, Cho M.R., Li W., Yacono P.W., Chen S., Gilks N., Golan D.E., Anderson P. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules // *J Cell Biol.* – 2000. – Vol. 151. – P. 1257-1268.
 - 2 Damgaard C.K., Lykke-Andersen J. Translational coregulation of 5' TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR // *Genes Dev.* – 2011. – Vol. 25. – P. 2057-2068.
 - 3 Weber C., Nover L., Fauth M. Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules // *The Plant Journal.* – 2008. – Vol. 56. – P. 517-530.
 - 4 Ivanov P., Kedersha N., Anderson P. Stress puts TIA on TOP // *GENES & DEVELOPMENT.* – 2011. – Vol. 25. – P. 2119-2124.
 - 5 Iadevaia V, Caldarola S, Tino E, Amaldi F, Loreni F.. All translation elongation factors and the e, f, and h subunits of translation initiation factor 3 are encoded by 5'-terminal oligopyrimidine (TOP) mRNAs // *RNA.* – 2008. – Vol. 14. – P. 1730-1736.
 - 6 Lorkovic, Z.J., Barta, A. Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – P. 623-635.
 - 7 Vorackova I., Suchanova S., Ulbrich P., Diehl W.E., Ruml T. Purification of proteins containing zinc finger domains using immobilized metal ion affinity chromatography // *Protein Expression and Purification.* – 2011. – Vol. 79. – P. 88-95.
 - 8 Wingfield P.T. Preparation of soluble proteins from *Escherichia coli* // In: *Current protocols in protein science.* – 1995. – Vol. 1, New York: Wiley and Sons. – P. 6.2.1-6.2.15.
- Schägger H. Tricine-SDS-PAGE // *National Protocols.* – 2006. – Vol. 1. – P. 16-22.

УДК632.937 (574.51)

¹Ш.Б. Смагулова*, ¹Е.М. Макаров,¹ Е.Ж. Баймагамбетов,¹С.Б. Аманов,
¹А.М. Успанов, ²М.В. Левченко,²Г.Р. Леднев

¹ТОО «Казахский НИИ защиты и карантина растений», г. Алматы, Казахстан,

²Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, г. Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: sholpan.smagulov@mail.ru

Поиск насекомых с признаками микоза и выделение новых изолятов энтомопатогенных грибов в Южном Казахстане

Из 28 образцов собранных в августе 2013 года было выделено 18 новых изолятов. Установлено, что нововыделенные изоляты относятся к роду *Beauveria*.

Ключевые слова: Биопрепарат, микозы насекомых, микромицеты, изолят, грибок.