

Для получения гаплоидных линий донорные растения выращивали до стадии бутонизации и собирали соцветия с бутонами размером 2,0-3,5 мм. Для изоляции микроспор из пыльников и получения суспензионной культуры использовали питательную среду NLN с добавлением L-серина, L-глутамина, глутатиона и 13% сахарозы. Для индукции эмбриогенеза изолированную культуру микроспор подвергали тепловому шоку при +32°C, +33°C и +35°C в течение 24, 48 и 72 ч в темноте. Далее чашки Петри с образцами культивировали в темноте при +25°C. Через 21 день после изоляции микроспор эмбриониды переносили на агаризованную питательную среду, состоящую из ½ MS – Murashige и Skoog для формирования семядольных листьев и корневой системы. Через 3 недели культивирования на твердой питательной среде хорошо развитые растения-регенеранты адаптировали к почвенным условиям. Определение уровня пloidности растений проводили с помощью подсчета числа хромосом в меристеме корня и подсчета числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Для получения удвоенных гаплоидных линий использовали колхицин. В результате были получены удвоенные гаплоидные линии, устойчивые к TuMV.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект №14-08-31353).

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАНТНОМУ ДОМЕНУ ТЕЛОМЕР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА TRF2

Ильичева Н.В.¹, Воронин А.П.^{1,2}

¹ФГБУН Институт цитологии РАН; ²ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

nad9009@yandex.ru

Теломеры – сложные ДНК-белковые комплексы, находящиеся на концах хромосом эукариотических организмов. На сегодняшний день предметом многочисленных исследований является роль теломер в клеточном старении. Теломер-связывающий белок TRF2 имеет в своём составе домен, функции которого неизвестны. Предполагается, что этот домен отвечает за взаимодействие TRF2 с ядерной мембраной. Основным инструментом для изучения механизмов этого взаимодействия, а также для изучения функций данного домена в целом, являются антитела к нему.

Целью настоящей работы было получение антител к рекомбинантному полипептиду udTRF2, соответствующему домену белка TRF2 с неизвестными функциями.

Рекомбинантный полипептид udTRF2 получали из лизата бактериальной культуры, выращенной в среде LB объемом 0,6 л. Клетки *E. coli RosettaBlue(DE3)*, несущие экспрессионную конструкцию pET32a-udTRF2, выращивали в термостате при 37°C и непрерывном перемешивании (200 об/мин). Для индукции экспрессии в среду добавляли IPTG до концентрации 0,4 мМ и продолжали культивирование в течение 3,5 часов. Полипептид udTRF2 выделяли из лизата бактериальной культуры с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с последующей экстракцией из геля и очищали путем осаждения смесью метанола с хлороформом. Концентрация белка после выделения составила около 10 мкг/мл.

Для иммунизации использовали морских свинок (самцы массой 400-500г). Полипептид вводили трехкратно с перерывами в 8–10 дней по 20 мкг полипептида на одну дозу инъекции. Иммунную сыворотку получали на 10 сутки после последней инъекции. Наличие в сыворотке антител к udTRF2 определяли методом иммуноблоттинга. Для проверки был использован лизат ядер, выделенных из клеток печени мыши *Mus musculus*, и лизат бактерий, экспрессирующих udTRF2. По данным иммуноблоттинга, антитела полученной иммунной сыворотки взаимодействуют с одним из белков ядерного лизата. Кажущаяся молекулярная масса этого белка составляет примерно 70 кДа, что соответствует молекулярной массе белка TRF2. Среди белков бактериального лизата антитела сыворотки взаимодействуют с двумя белками, одним из которых является полипептид udTRF2.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта РФФИ (№ 15-04-01857).