

ПОЛУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПОЛИРИБОСОМ

Брилькова М.Е., Широков В.А.

ФГБУН Институт белка РАН, Пушкино, Россия

brilkova@vega.protres.ru

В литературе описано несколько подходов к флуоресцентному мечению рибосом. Эти подходы можно разделить на мечение индивидуальных рибосомных белков с последующим их встраиванием в рибосому, мечение определенных участков рибосомной РНК путем отжига на них меченых олигонуклеотидов, химическое присоединение флуоресцентной метки к реакционным группам на поверхности рибосомы. Наша задача не требовала сайт-направленного введения флуоресцентной метки в рибосому, поэтому мы использовали путь химической модификации аминокислот рибосомных белков с помощью сукцинимидных эфиров двух флуоресцентных красителей Alexa 488 и Alexa 647. Рибосомы для модификации флуоресцентными метками были получены путем выделения из экстракта зародышей пшеницы. Оптимизированный по соотношению трансляционной активности и удельной флуоресценции уровень модификации при использовании Alexa 488 составлял 10-12 молекул флуоресцентного красителя на одну рибосому, при модификации Alexa 647 одна рибосома содержала примерно 6-7 молекул красителя. Следует отметить, что преимущественно модификации подвергалась малая 40S субчастица рибосомы. В реконструированной пшеничной бесклеточной системе трансляции рибосомы меченые Alexa 488 обладали трансляционной активностью, сопоставимой с активностью исходных немеченых рибосом. Модификация красителем Alexa 647 привела к незначительному снижению трансляционной активности рибосом. Такой результат можно объяснить тем, что молекула красителя Alexa 647 имеет больший размер, что может вызывать большую интерференцию с функциональными центрами рибосомы. Седиментационный анализ в сахарозном градиенте показал, что меченые рибосомы образуют в процессе трансляции полисомы размером от трех до шести рибосом. Протестирована возможность визуализации индивидуальных рибосом в меченых полисомах с помощью флуоресцентной микроскопии высокого разрешения.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 13-04-40213-N и 15-04-99702.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ЭКСПАНСИНА И РАМНОГАЛАКТУРОНАНЛИАЗЫ В ВИРУЛЕНТНОСТИ ФИТОПАТОГЕНА *PECTOBACTERIUM ATROSEPTICUM*

Бункевич Е.Ю.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Dark_lunx@inbox.ru

Pectobacterium atrosepticum – грамотрицательные бактерии, вызывающие различные заболевания у растений. Попадание данного фитопатогена в стебли растений картофеля, как правило, приводит к развитию заболевания «черная ножка», а при инфицировании клубней развиваются мягкие гнили. Данные бактерии обладают широким набором факторов вирулентности. *P. atrosepticum* синтезируют и секретируют большое количество гидролитических ферментов, способных разрушать клеточную стенку растений. К таким ферментам можно отнести и секретируемые посредством системы секреции второго типа продукты генов ECA2220 и ghiE – экспансин и рамногалактуронанлиазу соответственно. Предполагается, что экспансин может участвовать в нарушении связей между матрицей гемицеллюлозы и целлюлозы микрофибрилл, а рамногалактуронанлиаза в расщеплении полисахарида рамногалактуронана до простых сахаров, тем самым улучшая усвоение питательных веществ за счет размягчения тканей растения.

Целью данного исследования является выяснение роли экспансина и рамногалактуронанлиазы в вирулентности фитопатогена *P. atrosepticum*. Для клонирования генов ECA2220 и ghiE из *P. atrosepticum* были сконструированы специфические праймеры к концам фрагментов данных генов. Используя в качестве матрицы ДНК *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043, удалось получить ПЦР-продукты фрагментов генов ECA2220 и ghiE с размерами 704 и 1745 п.н. соответственно. Оба ПЦР-продукта были клонированы по сайтам