

13 % ржаной среде с пониженной вязкостью, которая достигалась обработкой ржаного затора ферментными препаратами Амилекс 4Т и Вискоферм образуется до 24,02 г/л бутанола (исходный штамм продуцировал до 18 г/л бутанола). При этом суммарное количество растворителей составляло 37,22 г/л (для исходного штамма это значение не превышало 27 г/л).

Таким образом, в результате проведенного исследования был получен генно-модифицированный штамм *C. acetobutylicum* SGM с повышенной продукцией н-бутанола. На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. С использованием оптимизированных условий мутагенеза был отобран мутантный штамм *C. acetobutylicum* 5Н, продуцирующий на 20% больше бутанола, стабильно наследующий признак устойчивости к бутанолу в концентрации 2,5% и характеризующийся изменённым качественным и количественным составом липидов клеточной мембраны;

2. Получена генно-инженерная конструкция pSOLAMY, содержащая гены amy406 и groESL, детерминирующие соответственно утилизацию крахмала и синтез белков теплового шока. После предварительной модификации (с использованием индуцируемой системы экспрессии гена метилазы бактерий *C. acetobutylicum*) плазида pSOLAMY введена в клетки *C. acetobutylicum* 5Н;

3. Установлено, что генно-модифицированные бактерии *C. acetobutylicum* SGM продуцируют до 24,02 г/л бутанола, что на 33,44% выше, чем у исходного штамма. При этом суммарное количество растворителей составляло 37,22 г/л, что превышает исходный штамм на 37,85 %

Литература

1. Szulczyk, K. R. Which is a better transportation fuel—butanol or ethanol? // International Journal of Energy and Environment. 2010. Vol. 1. № 3. P. 501-512.
2. [https://experts.umn.edu/en/publications/separation-and-purification-of-biobutanol-during-bioconversion-of-biomass\(75a60300-df33-4105-b324-4a31aa48379c\).html](https://experts.umn.edu/en/publications/separation-and-purification-of-biobutanol-during-bioconversion-of-biomass(75a60300-df33-4105-b324-4a31aa48379c).html)
3. Bowring S.N., Morris J.G. Mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum* // J. Appl. Bacteriol. 1985. Vol. 58. № 6. P. 577–584.

РАЗВИТИЕ СИМПТОМОВ ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В КЛЕТКАХ КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОЛИАМИНОВ

А. А. Чичко, В. С. Мацкевич, В. В. Самохина, В. В. Демидчик

Ключевым триггером запрограммированной клеточной гибели (ЗКГ) у высших растений является повышенная концентрация активных форм

кислорода (АФК), генерация которых стимулируется в ответ на стрессовые воздействия различной природы [1]. Ключевыми стресс-протекторными агентами растений являются полиамины – низкомолекулярные водорастворимые алифатические соединения, содержащих две или более первичных аминогрупп ($\text{NH}_2\text{-R-NH}_2$). Повышение уровня полиаминов в тканях высших растений происходит в ответ на практически любые абиотические стрессовые воздействия. Наибольшее распространение и физиологическое значение в растениях имеют путресцин (диамин), спермидин (триамин) и спермин (тетрамин). Механизм влияния полиаминов на растения остается малоизученным. Некоторые литературные данные указывают на ослабление признаков окислительного стресса при сверхэкспрессии ферментов биосинтеза полиаминов. В то же время, полиамины выступают субстратом для полиамин-оксидазы, продуцирующей АФК в апопласте. Вероятнее всего, про- или антиоксидантная направленность влияния полиаминов зависит от конкретных физиологических условий и особенностей стрессовых воздействий [2]. В этой связи, представлялось актуальным протестировать влияние экзогенных полиаминов на уровень ЗКГ в тканях модельной растительной системы. Целью настоящей работы являлось выявление особенностей развития морфологических симптомов ЗКГ в клетках корня высших растений при воздействии основных природных полиаминов (спермина, спермидина, путресцина).

В экспериментах использовались корни 5-7-дневных проростков арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* L. Heynh экотипа WS-0 (Wassilewskija). Культура целых растений выращивалась вертикально из семян на чашках Петри (100% среды Мурашиге и Скуга, 0,25% фитогеля, 1% сахарозы, pH 6) с использованием стандартных протоколов. В работе использовались сертифицированные полиамины (спермин, спермидин, путресцин) (Sigma; США), а также антиоксиданты: 0,3% диметилсульфоксид (ДМСО),

1 ммоль/л тиомочевина и антиоксидантные ферменты: 600 ед/мл супероксиддисмутаза (СОД), 1000 ед/мл каталаза. Использовался инвертированный флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse TS100F и приложения среды NIS Elements Imaging Software (Nikon, США). Для выявления развития морфологических симптомов ЗКГ отбиралось 10-15 выборок по 50 клеток отдельно для трихобластов и атрихобластов. Тест на генерацию АФК (супероксида) осуществлялся с помощью флуоресцентного зонда диgidроэтидиума (10^{-6} моль/л; Sigma, США) [2].

В контрольных условиях доля клеток с симптомами ЗКГ составляла не более 10% (Рис. 1). Доля корневых волосков с симптомами ЗКГ начинала увеличиваться при введении 30 мкмоль/л спермина, 100 мкмоль/л

спермидина и путресцина (Рис. 1). Аналогичная тенденция была отмечена для атрихобластов. Для фармакологических тестов была использована концентрация 0,3 ммоль/л, которая достоверно увеличивала долю клеток с симптомами ЗКГ при обработке полиаминами в 5-8 раз.

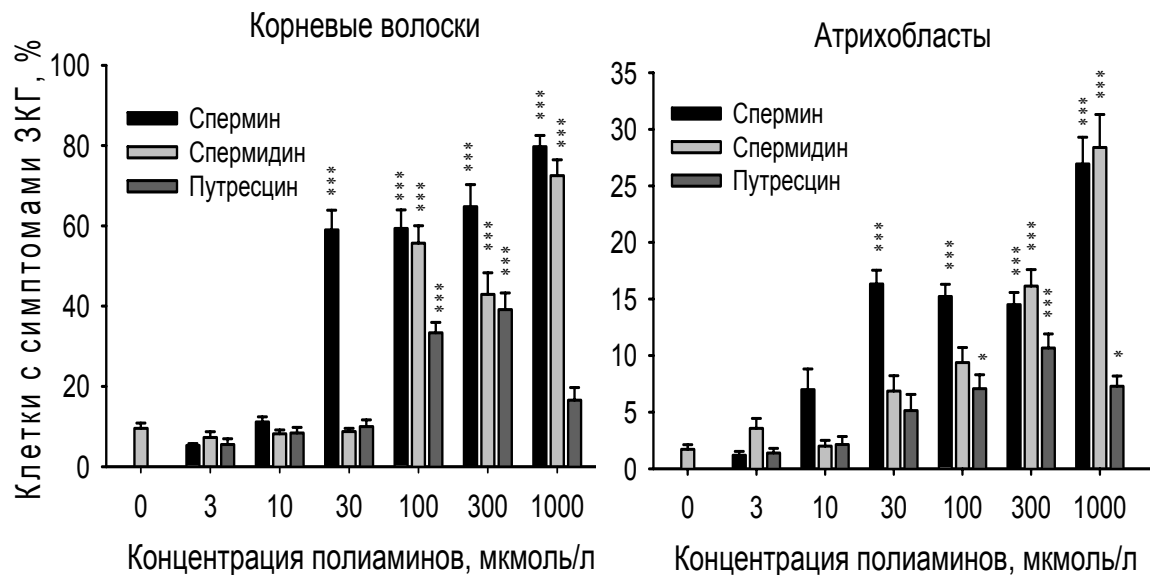


Рис. 1. Влияние различных уровней полиаминов на долю клеток с симптомами ЗКГ (корень *Arabidopsis thaliana*, обработка: 15 ч)

Достоверность различий (сравн. с контролем): * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,001$, *** - $p < 0,0001$.

Добавление в тест-растворы антиоксидантных агентов подавляло развитие ЗКГ, вызываемое 0,3 ммоль/л путресцина, но не изменяло характера влияния спермина. Эффект спермидина на ЗКГ был наиболее чувствителен к СОД и ДМСО. Доля клеток с симптомами спермидин-индуцируемой ЗКГ снижалась в 2–3 раза (Таблица). Тесты с АФК-чувствительным зондом дигидроэтидиум показали что, 0,3 ммоль/л спермина стимулирует генерацию супероксида в клетках корня, спермидин не влияет на данный процесс, а путресцин его значительно ингибирует.

В результате анализа полученных данных можно сделать следующие выводы: 1) обработка полиаминами в концентрации выше 0,1 ммоль/л вызывает увеличение доли клеток с симптомами ЗКГ; 2) индуцируемая полиаминами ЗКГ подавляется антиоксидантами, наиболее сильно, под действием СОД и ДМСО; 3) спермин стимулирует генерацию супероксида в клетках корня арабидопсиса, при этом спермидин не влияет на данный процесс, а путресцин вызывает его ингибирование.

Таблица

Доля клеток с симптомами ЗКГ при обработке корней арабидопсиса полиаминами (в контроле и на фоне антиоксидантов)

Клетки с симптомами ЗКГ, %					
Трихобласты		Контроль	Спермин	Спермидин	Путресцин
	Буфер	9,5±1,31	64,8±5,52***	42,9±5,40***	39,2±4,11***
	ДМСО	7,3±1,12	50,6±1,12***	21,9±2,55*a	7,6±1,27***a
	Тиомочевина	8,8±2,32	62,3±5,68***	31,6±5,37***	14,0±2,01***a
	Каталаза	8,1±1,24	77,3±3,64***	39,1±3,55***	6,2±1,22***a
	СОД	3,7±1,31	64,4±8,94***	11,1±3,50***a	1,8±1,08***a
Атрихобласты		Контроль	Спермин	Спермидин	Путресцин
	Буфер	1,7±0,41	14,5±1,07***	16,1±1,47***	10,7±1,24***
	ДМСО	5,0±1,90	19,9±1,47***	8,8±1,57	1,3±0,29***a
	Тиомочевина	3,6±1,34	24,7±2,01***,***a	11,6±1,99**	5,3±1,26
	Каталаза	5,9±1,65	41,0±3,31***,***a	23,6±3,06***	0,8±0,29***a
	СОД	1,5±0,50	29,8±1,89***,***a	10,0±1,89	0,6±0,62***a

Достоверность различий рассчитывали по отношению к контролю: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,001$, *** – $p < 0,0001$; к обработке полиаминами: *a – $p < 0,01$, ***a – $p < 0,0001$ (n=15).

Литература

1. V.V. Demidchik [et al.] Arabidopsis root K^+ -efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death // J. Cell Sci. 2010. Vol. 123. № 1. P. 1468–1479.
2. Pottosin I. [et al.] Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling // Front Plant Sci. 2014. Vol. 5. № 154. P. 1–16.

КЛОНИРОВАНИЕ ГИБРИДНОГО ГЕНА SUMO-ESC21A В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Д. М. Янушкевич, Н. В. Совгир

ВВЕДЕНИЕ

Развитие антибиотикорезистентности бактерий повышает интерес к антимикробным пептидам (АМП) как новым перспективным средствам борьбы с патогенами. Однако, несмотря на довольно высокую биологическую активность АМП, лишь некоторые из них нашли практическое применение, в связи с чем, актуальны исследования по разработке новых биотехнологических способов получения АМП.

Активность АМП эскулентина-1a [7] в отношении многих видов патогенных бактерий и грибов обусловлена его N-концевой областью длиной 21 аминокислотный остаток (Esc21a) [3]. Традиционно в клетках *E.*