

разнастайных субстратах: на глебе, пры аснове ствалоў і на ствалах дрэваў, радзей на камянях, што пакрыты гумусам. Пераважная частка адносіцца да мезафітаў.

Да мезатрофаў належыць 17 відаў, што звязаны з абедненымі харчовымі элементамі субстратамі. Паказчыкам мезатрофнасці месца пражывання з'яўляецца рост *Hylocomium splendens*, *Ptilium crista-castrensis*, *Rhytidiadelphus scuroorrosus*.

Алігатрофы прадстаўлены 4 відамі – *Hedwigia ciliata*, *Polytrichum piliferum*, *Schistidium apocarpum*, *S. strictum* якія з'яўляюцца ксерафітамі ці ксерамезафітам і растуць на вельмі бедных субстратах.

Алігамезатрофы характарызуюцца большай амплітудай талерантнасці ў адносінах да трофнасці, чым віды папярэдняй групы. Да іх належыць 13 відаў (*Brachythecium albicans*, *Bryum argenteum*, *Ceratodon purpureus*, *Dicranella cerviculata*, *D. heteromalla*, *Dicranum polysetum*, *Leucobryum glaucum*, *Orthodicranum montanum*, *Pleurozium schreberi*, *Pohlia nutans*, *Polytrichum commune*, *P. juniperinum*, *P. strictum*).

Такім чынам большая частка вывучаных відаў (56%) аддае перавагу субстратам, якія больш-менш багатыя гумусам і мінеральнымі рэчывамі.

Невялікая колькасць алігатрофаў, на нашу думку, абумоўлена перш за ўсе асаблівасцямі прыродных умоў раена: невялікай колькасцю вярховых балот (0,8% ад агульнай плошчы раена), нешматлікасцю камяністага субстрату, адносна высокай натуральнай урадлівасцю глебы.

Літаратура

1. Черный А. П., Доктуровский В. С. Исследование болот и лугов в долине р. Лани. Материалы по организации и культуре кормовой площади / Под ред. В. Н. Штейна. Петроград, 1915.
2. Лазаренко А.С. Определитель листовных мхов БССР. Мн., 1951.
3. Мельничук В.М. Определитель листовных мхов средней полосы и юга Европейской части СССР. Киев, 1970.
4. Рыковский Г.Ф., Масловский О.М. Флора Беларуси. Т. 1: Мохообразные. Мн, 2004.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСПОРТА ХИМЕРНЫХ КСИЛОЗОИЗОМЕРАЗ СИСТЕМОЙ СЕКРЕЦИИ III ТИПА *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA*

А. В. Клемантович

При искусственном культивировании микроорганизмов с целью получения какого-либо продукта (в подавляющем большинстве – белка) встает вопрос о выделении и очистке целевого продукта от нескольких тысяч других клеточных белков. Если необходимый белок выделяется бакте-

риями в среду, то это значительно облегчает процесс очистки, а значит, снижает производственные затраты. Однако количество секретируемых микроорганизмами за пределы клетки белков ограничено, а системы секреции белков действуют крайне специфично, не обеспечивая транспорта даже гомологичных белков бактерий одного рода. Определение сигнальных последовательностей и механизмов узнавания системами секреции своих субстратов и создание на их основе химерных белков может помочь решить такую важную биотехнологическую задачу, как секреция гетерологичных белков посредством бактериальных секреторных систем.

В данной работе была сделана попытка получить бактериальный штамм, обеспечивающий секрецию внутриклеточного фермента ксилоизомеразы *Arthrobacter* sp. в культуральную жидкость. На основе анализа имеющихся на сегодняшний день данных литературы о секреции гетерологичных белков, был сделан вывод, что для этих целей наиболее подходит система секреции III типа. Для нее показана наименьшая специфичность в отношении секретируемых субстратов и точная локализация сигнала секреции в N-концевой части белков в пределах первых 10-15 аминокислотных остатков [4,5,6]. Применимость системы секреции III типа для этих целей подтверждается большим количеством примеров секреции и транслокации ею гетерологичных белков.

В качестве объекта исследований, потенциально секретирующего ксилоизомеразу *Arthrobacter* sp. в культуральную жидкость, были выбраны бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* JN42.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные в работе бактериальные штаммы и плазмиды приведены в *таблице 1*.

Штамм *Escherichia coli* XL1– blue выращивали при температуре 37 °С в полноценной питательной среде LB, штаммы *Erwinia carotovora* выращивали при 28 °С в среде А со сниженным содержанием азота для индукции секреции [2].

Измерение активности ксилоизомеразы проводилось по стандартной методике, этапы молекулярного клонирования, такие как рестрикция, лигирование, электрофорез по метоликам, описанным в руководстве Т. Маниатис и др. (1984) [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований создавались конструкции, в которых ген *хylA* «сшивался» с секреторным сигналом системы секреции III типа (ССТТ), что должно было привести к образованию химерных белков,

способных секретироваться из клеток. Для их создания использовались предполагаемые сигналы секреции трех субстратов ССТТ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* JN42 – DspE, HrpN и HrpJ.

Таблица 1

Бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник/ссылка
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	F ⁻ <i>proAB lacI^q lacZΔM15</i> Tn10(Tet ^r)/ <i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17(r⁻_k m⁺_k)supE44 relA1 lac</i>	Коллекция НИЛ при кафедре молекулярной биологии Белгосуниверситета
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 3-2 JN 42	Rif ^r , Tn9(Cm ^r)	Коллекция НИЛ при кафедре молекулярной биологии Белгосуниверситета
<i>Erwiniacarotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 3-2 TA 5	Rif ^r , Tn9(Cm ^r), <i>hrpL⁻</i>	Т. А. Овчинникова
Плазмиды	Маркерные гены	Источник/ссылка
pUC 19	Ap ^r , <i>lacZ'</i> ΔM15	Коллекция НИЛ при кафедре молекулярной биологии Белгосуниверситета
pZH420	Ap ^r , <i>lacZ'</i> ΔM15, <i>hrpJ</i>	Е.А. Николайчик
pZH430	Ap ^r , <i>lacZ'</i> ΔM15, <i>dspE</i> , <i>hrpW</i>	
pZH437	Ap ^r , <i>lacZ'</i> ΔM15, <i>HrpN</i>	
pVL430S	Ap ^r , <i>lacZ'</i> ΔM15, <i>dspE</i>	Л.Н. Валентович
pXylΔ15	pSD4, делеция 8 п.н.	Данная работа
pXylA1.3	pZH430:: <i>xylA</i> , содержит гибрид <i>dspE-xylA</i>	
pXylA4.7	pZH430S:: <i>xylA</i> , содержит гибрид <i>dspE-xylA</i>	
pXylA2.1	pXylΔ15:: 3' <i>hrpN</i> , содержит гибрид 3' <i>hrpN-xylA</i>	
pXylA3.5	pXylΔ15:: 3' <i>hrpJ</i> , содержит гибрид 3' <i>hrpJ-xylA</i>	

Первый вариант гибридной конструкции создавался путем объединения нуклеотидной последовательности гена *xylA* и 3'-конца гена *dspE* размером

436 пар оснований. Для этого ген *xylA* был вырезан из плазмиды pXylΔ15 рестриктазами *Hind*II и *Eco*RI и клонирован в плазмиду pZH430 и ее укороченный вариант pVL430S по сайтам для *Eco*RI и *Eco*RV. Полученные конструкции были обозначены pXylA1.3 и pXylA4.7 соответственно.

Второй вариант химерного белка конструировался на основе плазмиды pXylΔ15 в которую по сайтам для ферментов *Pst*I и *Hind*II был клонирован 3'-концевой фрагмент *hrpN* из плазмиды pZH437 размером 850 нуклеотидных пар, ограниченный сайтам рестрикции *Pst*I и *Eco*RV. Полученная конструкция была обозначена pXylA2.1

Третий вариант гибридной конструкции содержал 3'-концевой фрагмент (420 пар оснований) гена *hrpJ* из плазмиды pZH420, ограниченный сайтами рестрикции *Hind*III и *Eco*RV. Фрагмент был встроен в плазмиду pXylΔ15 перед геном *xylA* по сайтам рестрикции для *Hind*II и *Hind*III. Полученная конструкция была обозначена pXylA3.5. Правильность всех полученных конструкций была подтверждена с помощью рестрикционного анализа, а плазмиды pXylA3.5 – также с помощью определения нуклеотидной последовательности.

Вслед за тем, как все описанные конструкции были получены и проверены, проводили определение активности химерных белков в клетках *E. coli* XL1-Blue после индукции IPTG. Для этого измерялось количество фруктозы, образующейся из ксилозы под действием ксилозоизомеразы. Данные об активности фермента представлены в таблице 2.

Таким образом все проверенные варианты химерной ксилозоизомеразы оказались функционально активны.

Следующим этапом работы стало исследование способности клетками *Erwinia* секретировать полученные химерные белки в культуральную жидкость. С этой целью плазмидами pXylA4.7, pXylA2.1, pXylA3.5 были трансформированы клетки *E. carotovora* subsp. *atroseptica* JN42. Культуру клеток выращивали в течении 8 часов на среде А с лимитом по азоту. Недостаток азота индуцировал секрецию белков с помощью ССТТ. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 2

**Активность химерных вариантов ксилозоизомеразы
в клетках *E. coli* XL1-Blue**

Плазида	Активность после индукции (ед/мл)	Активность без индукции (ед/мл)
pXylA4.7 (DspE)	2.47×10^{-4}	0.6×10^{-4}
pXylA2.1 (Hrp N)	2.22×10^{-4}	0.52×10^{-4}
pXylA3.5 (Hrp J)	10.15×10^{-4}	1.15×10^{-4}

Таблица 3

**Активность химерных вариантов ксилозиомеразы в клетках
E. carotovora subsp. *atroseptica* JN42 и культуральной жидкости**

Плазмида	Активность в клетках (ед/мл)	Активность в супернатанте (ед/мл)	Доля белка в супернатанте
Без индукции IPTG			
G	1.2×10^{-4}	0.16×10^{-4}	26.7%
pXylA2.1 (HrpN)	4.6×10^{-4}	0.15×10^{-4}	3.3%
pXylA3.5 (HrpJ)	4.4×10^{-4}	0.009×10^{-4}	0.21%
После индукции IPTG			
pXylA4.7 (DspE)	0.55×10^{-4}	0.23×10^{-4}	40.9%
pXylA2.1 (HrpN)	1.85×10^{-4}	0.09×10^{-4}	2.3%
pXylA3.5 (HrpJ)	4.26×10^{-4}	0.08×10^{-4}	0.94%

Исходя из полученных результатов можно предположить секрецию химерных белков, несущих сигнал секреции DspE, поэтому в дальнейшей работе использовались плазмиды pXylA4.7 и pXylA1.3. Чтобы показать, что активность ксилозиомеразы в культуральной жидкости обуславливается именно секрецией белка, а не клеточным лизисом, сравнивалась активность фермента в супернатанте для штаммов JN42 и TA5 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. Последний штамм имеет инсерционную мутацию в гене *hrpL* и не способен секретировать белки с помощью ССТТ. В качестве положительного контроля использовались клетки штамма JN42, трансформированные плазмидой pXylA3.5, так как они показывали высокую внутриклеточную активность в предыдущих экспериментах. Для проверки наличия собственной ксилозиомеразной активности *E. carotovora* JN42 клетки трансформировались плазмидой pUC19. Условия культивирования применялись те же, что и в предыдущем эксперименте, результаты отражены в *таблице 4*.

Таблица 4

**Активность химерных вариантов ксилозиомеразы в
клетках *E. carotovora* subsp. *atroseptica* штаммов JN42 и TA5**

Плазмида	Активность в клетках (ед/мл)	Активность в супернатанте (ед/мл)
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> JN42		
pXylA4.7 (DspE)	$0,61 \times 10^{-4}$	0.3×10^{-4}
pXylA1.3 (DspE)	активность не обнаружена	активность не обнаружена
pXylA3.5 (HrpJ)	1.6×10^{-4}	активность не обнаружена
pUC19	активность не обнаружена	активность не обнаружена
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> TA5		
pXylA4.7 (DspE)	$0,55 \times 10^{-4}$	0.04×10^{-4}
pXylA1.3 (DspE)	активность не обнаружена	активность не обнаружена

Как и предполагалось, ксилоизомеразной активности в культуральной жидкости и в клетках исходного штамма JN42 *E. carotovora* не было обнаружено. То, что для штамма *E. carotovora* TA5 не было идентифицировано существенной активности фермента в культуральной жидкости, доказывает, что секрция химерного белка DspE-XylA зависит от системы секрции третьего типа.

Литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование / М.: Мир, 1984. 479 с.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / М.: Мир, 1976. 436 с.
3. Lloyd S. A., Norman M., Rosqvist R. and Wolf-Watz H. Yersinia YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals // Molecular Microbiology, –2001. –V. 39. –p. 520–531.
4. Miao, E. A., and Miller S. I. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by Salmonella typhimurium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, –2000. –V. 97. p. –7539–7544
5. Petnicki-Ocwieja, T., et. al. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 // PNAS –2002, – V. 99. –P.7655

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ

А. С. Оснюк

Характерной особенностью растительных организмов являются их колоссальные биосинтетические возможности. В области обмена соединений азота это проявляется прежде всего в необычайном разнообразии аминокислот, синтезируемых растительными организмами, причем многие из них не входят в состав белков (эти соединения называются непротеиногенными аминокислотами). Обычно в цитоплазме растений содержатся свободные аминокислоты как протеиногенные, так и непротеиногенные. В настоящее время обнаружено около 300 свободных аминокислот, которые в значительной степени определяют специфику азотного обмена того или иного растения [1]. Многие из них широко распространены, другие встречаются лишь у отдельных видов. Некоторые небелковые аминокислоты просто накапливаются в виде промежуточных продуктов обмена, другие представляют типичные вещества вторичного происхождения [2].

Некоторые свободные аминокислоты выступают в роли первичных акцепторов соединений минерального азота и регуляторов процессов внутриклеточного метаболизма. Их содержание в цитоплазме клеток за-