

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**ФЛАГЕЛЛИН ПОЛЯРНЫХ ЖГУТИКОВ БАКТЕРИЙ ШТАММА
*AZOSPIRILLUM BRASILIENSE SP245***

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТРСКОЙ РАБОТЫ

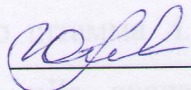
Студента 2 курса 241 группы

Направления 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Шатерникова Андрея Николаевича

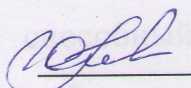
Научный руководитель
зав. кафедрой генетики,
д.б.н., доцент

 22.06.2017 О.И.Юдакова

Научный консультант
Руководитель ЦКП «Симбиоз»
ИБФРМ РАН, к.б.н.

 22.06.2017 А.А. Широков

Зав. кафедрой генетики,
д.б.н., доцент

 22.06.2017 О.И.Юдакова

Саратов 2017

Введение. Бактерии рода *Azospirillum* являются ассоциативными микроорганизмами, для которых успешность взаимодействия с растениями во многом определяется особенностями строения мембран, клеточной стенки и жгутиков. Представители вида *Azospirillum brasilense* имеют нечасто встречающееся у бактерий смешанное жгутикование: в вязких и на плотных средах на их клетках, кроме полярной флагеллы, которая требуется для активного плавания, появляются многочисленные латеральные жгутики, необходимые для роения бактерий по влажным поверхностям. Работа полярных жгутиков может влиять как на направленность перемещения отдельно взятых бактерий в толще почвы [1] и ризосферы, так и на адаптивный характер социальной подвижности коллективных групп микроорганизмов [2]. Адгезивные способности жгутиков необходимы для осуществления контакта бактерий с корневой системой растения-хозяина [3]. Изучение строения, функций и механизмов взаимодействия жгутиков с клетками растений может способствовать созданию новых эффективных ростостимулирующих биоудобрений для сельскохозяйственных культур [4]. Кроме того, полярные жгутики являются модельными объектами для изучения поверхностных антигенов азоспирилл, в частности флагеллина.

Экспериментальных данных о строении жгутиков азоспирилл очень мало. Установлено, что у типового штамма *A. brasilense* Sp7 флагеллин с кажущейся молекулярной массой ~100 кДа является гликопротеином (Беляков, 2010), углеводная часть которого представлена О-связанным полисахаридом, состоящим из разветвленных тетрасахаридных звеньев. Бактерии штамма *A. brasilense* Sp7 способны колонизировать только поверхность корня, тогда как для практического использования и для различного рода фундаментальных исследований наиболее перспективным является штамм *A. brasilense* Sp245 – факультативный эндофит, способный к эндосимбиозу. Флагеллин бактерий данного штамма крайне слабо изучен. Одной из причин тому являются определенные методические сложности выделения чистого флагеллина из полярных жгутиков клеток штамма *A. brasilense* Sp245.

Целью данной работы являлась оптимизация метода выделения флагеллина полярных жгутиков бактерий штамма *A. brasilense Sp 245* и изучение некоторых его свойств.

Для реализации данной цели были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) осуществить подбор наиболее оптимальных условий очистки жгутиков от поверхностных полисахаридов и получения мономеров флагеллина;
- 2) определить молекулярную массу электрофоретически чистого гликозилированного флагеллина;
- 3) изучить термостабильность гликозилированного флагеллина.

Основное содержание работы. В данном разделе магистерской работы приводится анализ литературы по вопросам свойств компонентов поверхностных структур бактериальных клеток (Freer, 1985, Smit, 1992, Westphal, 1966), особенностей строения клеточной стенки и липополисахаридов грамотрицательных бактерий (Коннова, 2005, Liang-Takasaki, 1982, Reitschel, 1982, Книрель, 1993), формы проявления биологической подвижности (Метлина, 2001), строения полярного жгутика бактерий (Leifson, E, 1960), структуры нити бактериального жгутика (Honda, S, 2001, Mimori-Kiyosue, 1998) и гликозилирования флагеллина (Moens, 1995, Doig, 1994).

В разделе «Материалы и методы» описываются использованные для проведения исследования методы радиального иммунодиффузного анализа (Mancini, 1965), просвечивающей электронной микроскопии, денатурирующего электрофореза в ПААГ (Laemmli, 1970), окрашивания электрофоретического геля раствором цитрата серебра, осаждения белков в трихлоруксусной кислоте, гетерогенного непрямого неконкурентного иммуноферментного анализа (Егоров, 1991). А также методики исследования характера подвижности бактерий, получения жгутиковых филаментов и раствора мономеров флагеллина.

В результате проведения радиального иммунодиффузного анализа на взаимодействие клеточного экстракта с антителами на ЛПС бактерий штамма

A. brasilense Sp245 были получены окрашенные линии преципитации, свидетельствующие о взаимодействии антигенных структур (присутствующих в экстракте ЛПС-детерменант данного штамма) и специфичных к ним антител. В области пересечения потоков молекул антигенов и антител, диффундирующих в геле навстречу друг к другу из своих лунок, образовались комплексы антиген-антитело. В результате их концентрации в области взаимодействия связавшийся с антителами краситель Coomassie R-250 обеспечил визуализацию узких линий преципитации. Поскольку линии не пересекаются, можно утверждать об идентичности антигенов в каждой из лунок, чистоте анализируемой бактериальной культуры и, следовательно, об идентификации изучаемого штамма, как *A. brasilense* Sp245.

В стандартных методиках для очистки полярных жгутиков от капсульных полисахаридов, как правило, используют однократное центрифугирование в фосфатном буфере (Беляков, 2010). Однако, даже после трехкратного центрифугирования суспензии клеток штамма *A. brasilense* Sp245 изменений в поведении и характере движения бактерий не наблюдалось. Это свидетельствовало о неполной очистке клеток от полисахаридов. Небольшие и редкие агрегаты клеток формировались после двухкратного центрифугирования только в образцах с наибольшей концентрацией антител (50 и 100 мкг/мл), после третьего центрифугирования при концентрации 10 мкг/мл. После третьего этапа центрифугирования некоторые бактерии двигались значительно медленнее или вовсе находились на одном месте. Начиная с четвертого этапа, агрегированные скопления стали появляться и при концентрации 1 мкг/мл, малоподвижных бактерий становилось больше (в образцах с концентрацией от 10 мкг/мл), а сами агрегаты в поле зрения объектива микроскопа встречались чаще.

В группе образцов, которые центрифугировали 6 раз, микроскопический анализ раствора бактерий и антител в концентрации 1 мкг/мл показал, что половина клеток стали неподвижными, большинство из них образовывало небольшие скопления; бактерии, проявлявшие активность, не могли покинуть

свои агрегаты, а немногочисленные свободные клетки очень медленно передвигались; некоторые бактерии вращались вокруг оси своих жгутиков.

При концентрации антител 5 мкг/мл кроме выше описанных особенностей поведения бактерий также встречались малые группы агрегированных друг с другом клеток, которые медленно вращались вокруг общих центров их скоплений.

В образце с 10 мкг/мл антител агрегаты бактерий отличались большими размерами и встречались чаще по сравнению с вышеописанными образцами.

При концентрации антител 50 мкг/мл размер бактериальных скоплений не изменялся, но частота их встречаемости значительно возрастала. Практически все немногочисленные одиночные клетки перестали перемещаться.

В образце с самой большой концентрацией антител (100 мкг/мл) наблюдались массивные скопления клеток, все одиночные бактерии не проявляли признаков активной подвижности.

В контрольном образце, в котором антитела были специфичны к ЛПС бактерий штамма *Sp7*, бактерии свободно перемещались и не собирались в агрегаты.

Таким образом, для наиболее эффективного очищения бактериальных клеток штамма *A. brasilense sp245* необходимо шестикратная отмывка в PBS центрифугированием.

После обнаружения нитей жгутиковых филаментов методом просвечивающей электронной микроскопии приступали к выделению мономеров флагеллина ультрацентрифугированием. Придерживаясь гипотезы (Беяков, 210), что флагеллин полярных жгутиков *A. brasilense Sp245* как и у других штаммов может быть гликозилирован, препарат флагеллина, очищенный от примесных белков, получали при помощи варьирования кислотности среды. Сначала первым ультрацентрифугированием в осадке концентрировали флагеллиновые филаменты (рис. 1) и прочие белковые макромолекулы. Затем осадок растворяли и понижали его pH до 2.0, что способствовало диссоциации белковых макромолекул и филаментов флагеллина на мономерные

полипептиды. Далее, избавившись от осадка не растворившихся примесей ультрацентрифугированием, повышали pH до 7.0. Негликозилированные белковые молекулы в созданной нейтральной среде обратно реассоциировали в тяжёлые макромолекулы, в то время как искомым флагеллин продолжал оставаться в мономерном состоянии, не покидая фазу супернатанта; что подтвердилось после третьего ультрацентрифугирования при денатурирующем электрофоретическом анализе (рис. 2).

Для определения молекулярной массы гликозилированного флагеллина строили калибровочный график зависимости вычисленных значений относительной электрофоретической подвижности (R_f) полос стандартных белковых маркеров электрофореграммы от десятичных логарифмов молекулярных масс ($\lg M_r$) этих маркеров (рис. 3). Далее находили значение R_f полосы флагеллина, определяли по нему значение $\lg M_r$ флагеллина и вычисляли молекулярную массу, которая оказалась равной примерно 100000 M_r (100 кДа).

Кроме того, на электрофоретический анализ брали пену, появившуюся после обработки суспензии блендером и ультразвуком. Однако на электрофореграмме каких-либо полос, свидетельствующих о присутствии в пене флагеллина, обнаружено не было.

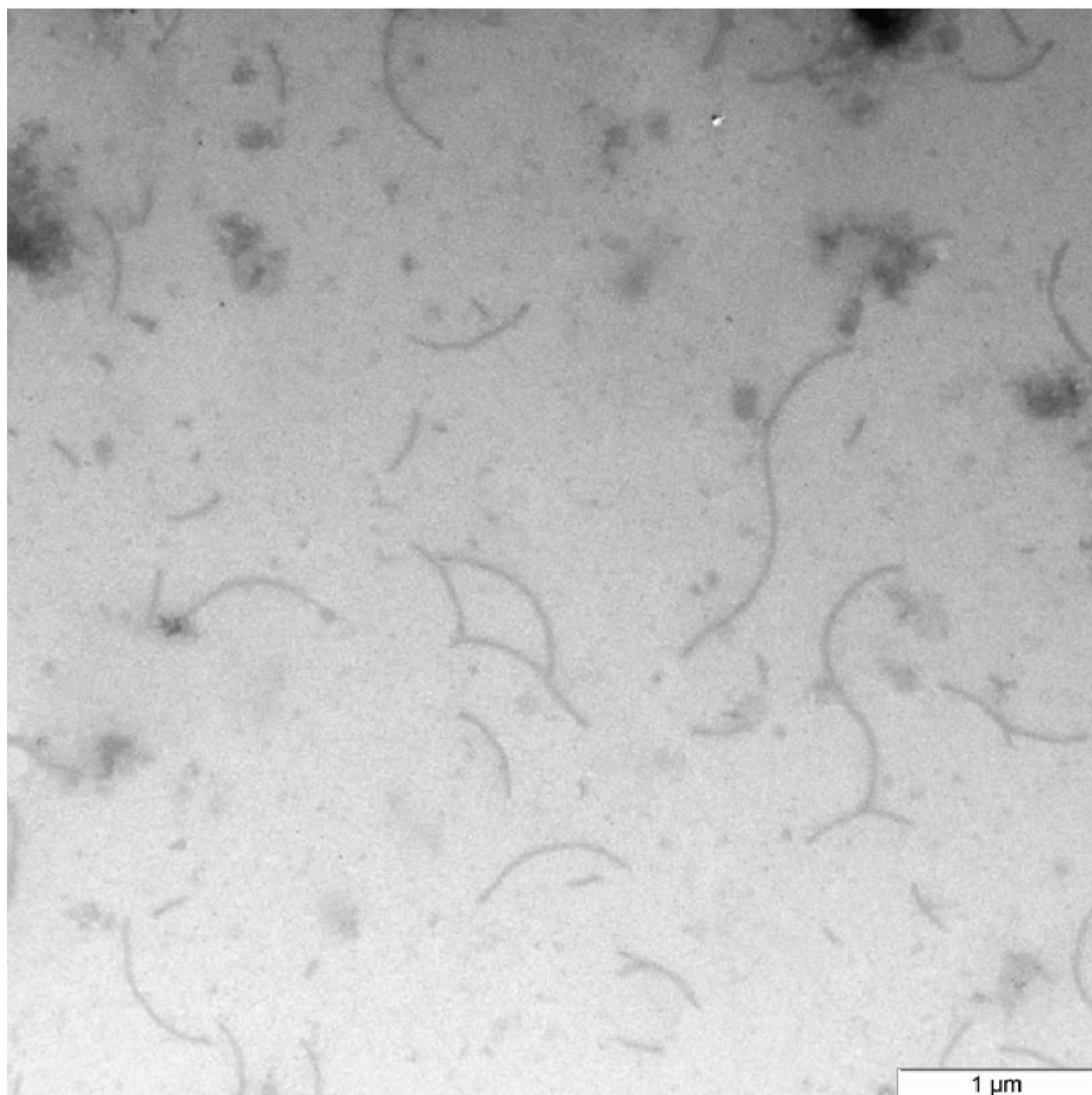


Рисунок 1 – Сконцентрированный осадок после первого ультрацентрифугирования, содержащий филаменты флагеллина

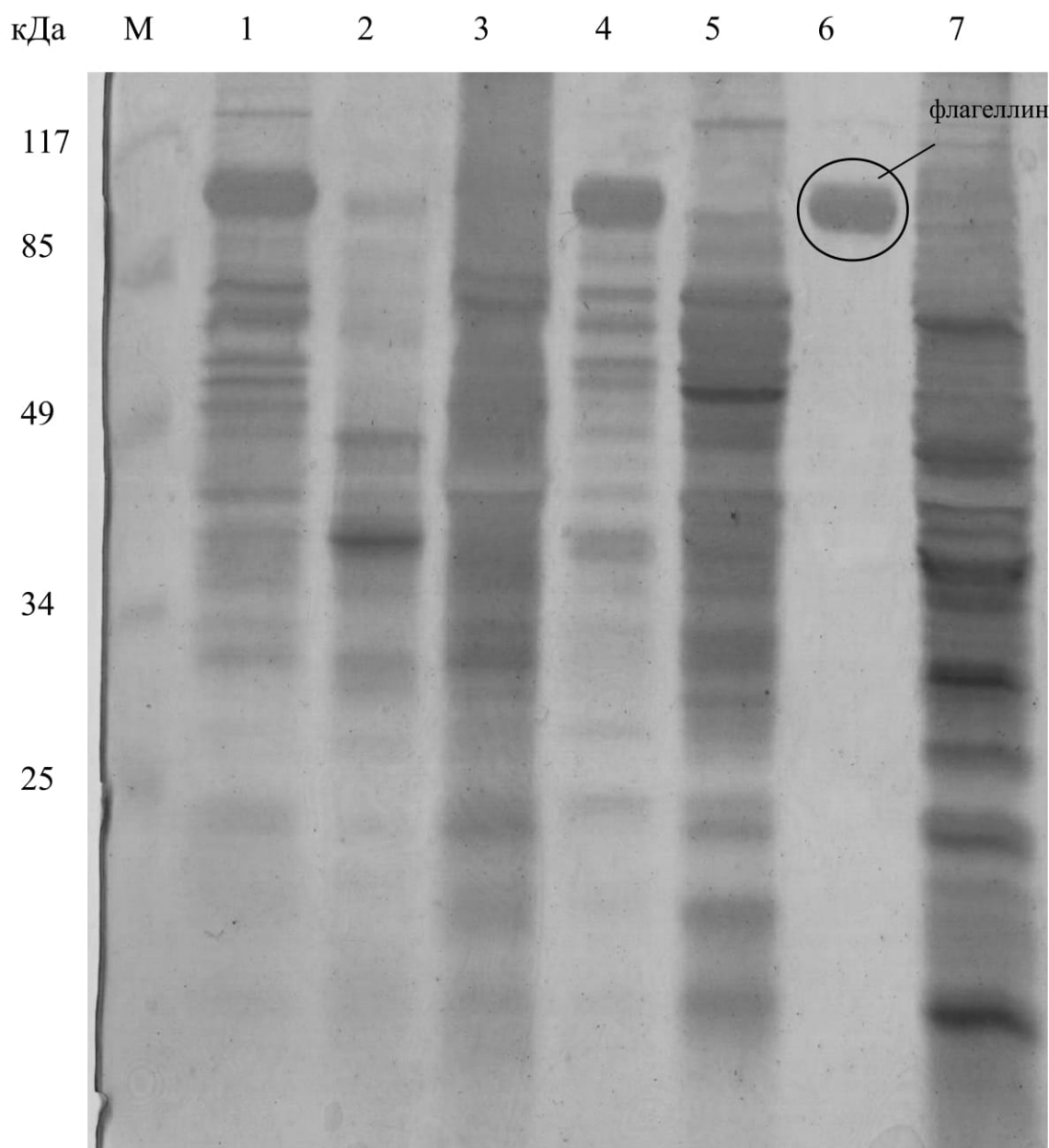


Рисунок 2 – Электрофореграмма с результатами денатурирующего электрофореза в ПААГ, окрашенная нитратом серебра. М – маркер, 1 – осадок после первого ультрацентрифугирования, 2 – супернатант после первого ультрацентрифугирования, 3 – осадок после второго ультрацентрифугирования, 4 – супернатант после второго ультрацентрифугирования, 5 – осадок после третьего ультрацентрифугирования, 6 – супернатант после третьего ультрацентрифугирования, 7 – пена после обработки блендером и ультразвуком. IgMr

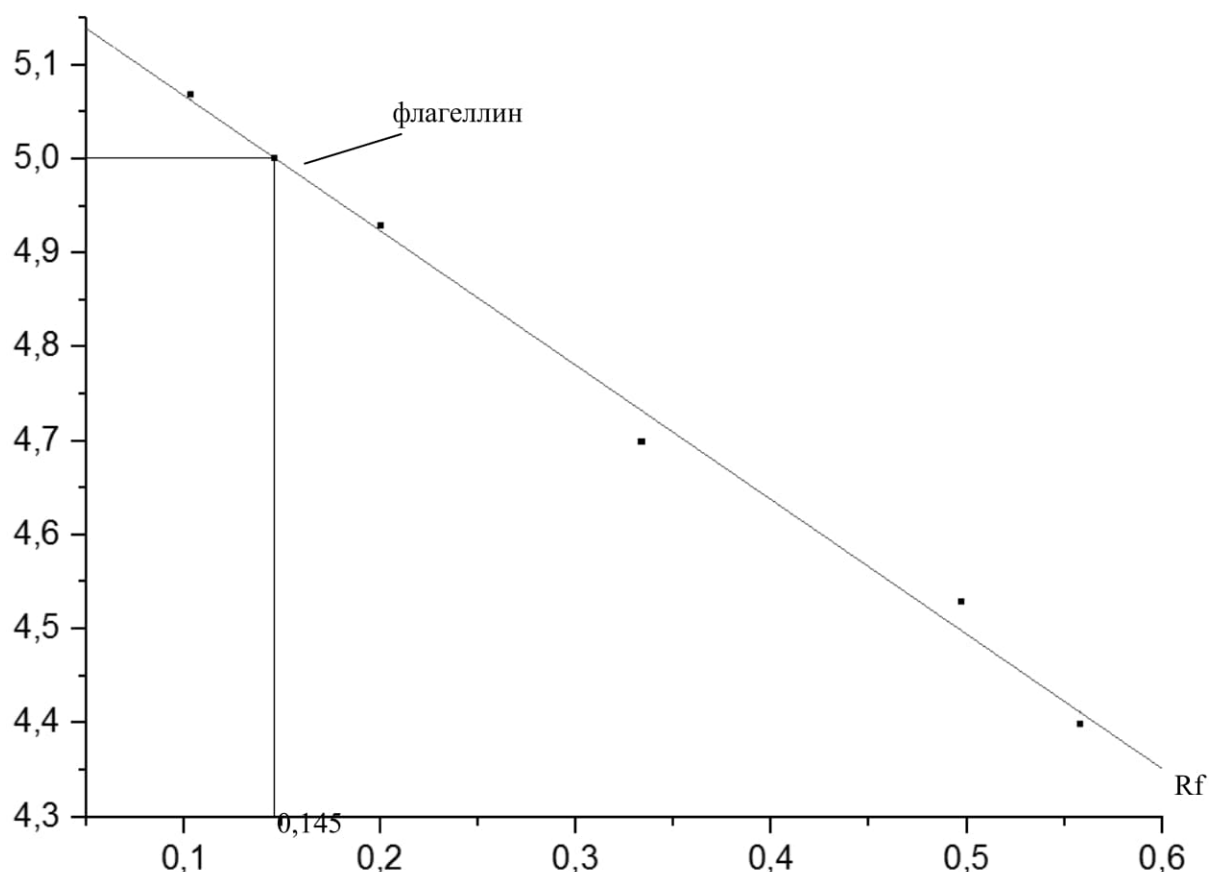


Рисунок 3 – Зависимость Rf от lgMr для полос белковых маркеров и искомого флагеллина

Для изучения термостабильности флагеллина бактерий штамма *A. brasilense Sp245*, раствор данного белка, очищенный осаждением в ТХУ супернатанта (полученного после третьего этапа ультрацентрифугирования), подвергался термической обработке кипячением в течение 10 мин. В качестве контроля использовали термически необработанный флагеллин того же штамма бактерий. Наличие и концентрацию флагеллина в исследуемых образцах оценивали с помощью иммуноферментного анализа. Оптическая плотность растворов термически обработанного флагеллина снижалась по сравнению с данным показателем раствора интактного флагеллина. Однако эта разность была не значительной (с $0,674 \pm 0,003$ нм до $0,624 \pm 0,003$, с $0,635 \pm 0,002$ до $0,581 \pm 0,002$ и т.д.) (рис. 4). Это свидетельствует о том, что при кипячении происходят незначительные потери флагеллиновых детерминант, и в целом белок является термостабильным.

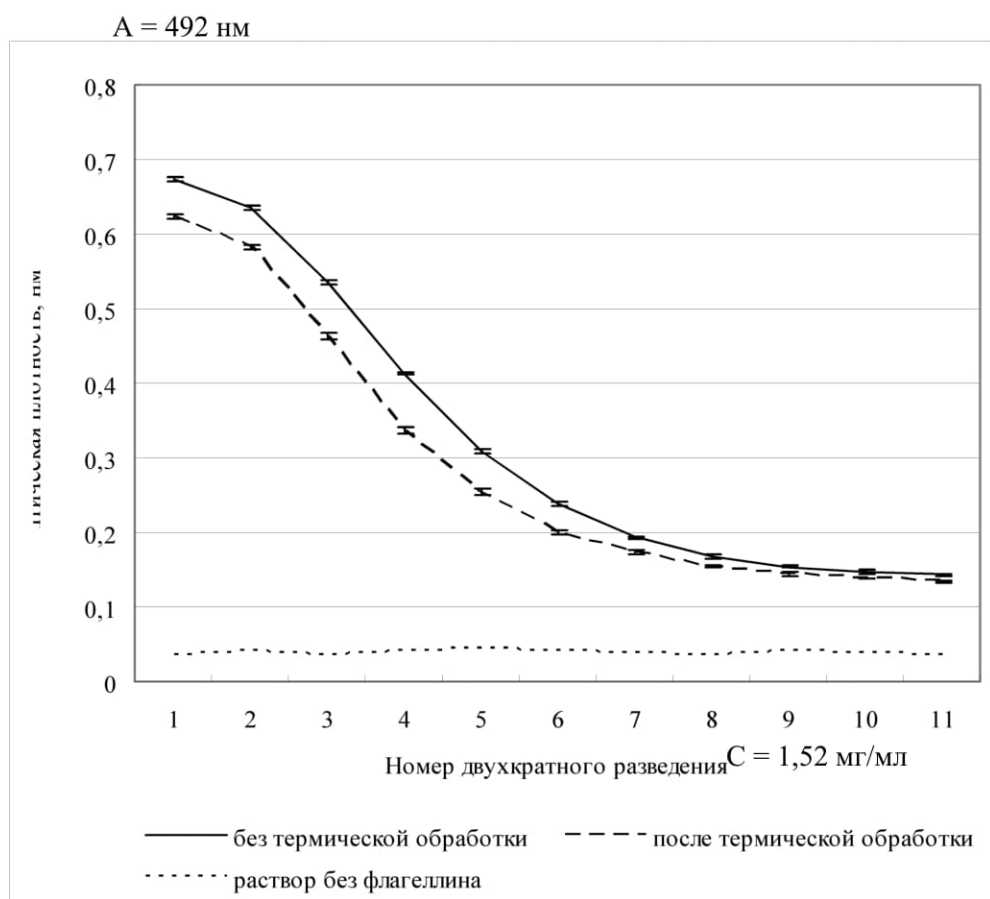


Рисунок 4 – Результаты иммуноферментного анализа флагеллина после воздействия на него температурой 100°C в течение 10 мин

Закключение. Результаты проведенного исследования свидетельствует о некотором сходстве флагеллина бактерий штамма с изученным ранее флагеллином штамма *A. brasilense* Sp7. Так, их гликозилированные мономеры имеют одинаковую молекулярную массу, которая составляет 100 кДа, что может указывать на высокую консервативность структурной организации флагеллина у разных штаммов *A. brasilense*. Гликозилированные мономеры флагеллина обоих штаммов также характеризуются высокой термостабильностью. Как известно, термостабильность белков бактерий создается за счет значительного числа малых изменений в их первичной структуре и добавочных слабых связей, определяющих укладку молекул. Вероятно, термостабильность гликозилированного флагеллина обусловлена присутствием полисахаридных фрагментов в составе данного гликопротеина.

Выводы:

1. Высокая степень очистки жгутиков от поверхностных полисахаридов у бактерий штамма *A. brasilense Sp245* достигается только после шестикратного центрифугирования в буфере PBS. Для получения мономеров флагеллина реассоциацию примесных белков необходимо проводить при pH=7,0 в течение 8 ч.

2. Молекулярная масса электрофоретически чистого гликозилированного флагеллина бактерий штамма *A. brasilense Sp 245* составила 100 кДа.

3. Незначительное снижение оптической плотности растворов флагеллина штамма *A. brasilense Sp 245*, обработанного температурой 100°C в течение 10 мин, по сравнению с данным показателем раствора интактного флагелина свидетельствует о высокой термостабильности белка.