

совершенствования способов сохранения здоровья детей с ОВЗ и др.), а также общепедагогические и профессиональные умения и навыки (организаторские, аналитические, проектировочные, коммуникативные, оценочные, коррекционные).

В заключение следует отметить, что только единство когнитивного, личностного и деятельности компонентов, их взаимосвязь и взаимодействие с другими компетенциями будут являться условием успешной деятельности бакалавра в области психолого-педагогического

сопровождения детей с ограниченными возможностями здоровья в коррекционном и инклюзивном образовании.

Список литературы

1. Федеральный государственный образовательный стандарт высшего профессионального образования по направлению подготовки 050400 «Психолого-педагогическое образование» (квалификация (степень) «Бакалавр»). URL: http://www.mgppu.ru/foreign_affairs.

«Профессиональное образование и рынок труда», Индия (Гоа), 16-27 февраля, 2011 г.

Биологические науки

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ АДАПТАЦИИ К РОСТУ ПРИ ВЫСОКИХ ЗНАЧЕНИЯХ pH У ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ДРОЖЖЕЙ YARROWIA LIPOLYTICA

^{1,2,3}Гусева М.А., ³Эпова Е.Ю.,
^{1,3}Осипенкова О.В., ⁴Елагина Е.М.,
^{1,2,3}Шевелев А.Б.

¹ФГУ «Федеральный центр
токсикологической и радиационной
безопасности животных», Казань;
²Учреждение РАМН Институт
полиомиелита и вирусных энцефалитов
им. М.П. Чумакова РАМН,
Московская обл.;
³ФГОУ ВПО «Московская
государственная академия
ветеринарной медицины
и биотехнологии им. К.И. Скрябина»,
Москва;
⁴ГОУ ВПО «Смоленский
государственный университет»,
Смоленск,
e-mail: osipenkova.olga@mail.ru

В настоящей работе было изучено изменение уровня экспрессии гена α -кетоглутаратде-

гидрогеназы *Y. lipolytica* при росте на средах с pH 5.0 и 8.5. с целью выявления степени универсальности клеточного ответа именно по отношению к pH проводилось варьирование состава среды по солевому составу и набору усвояемых органических веществ. Для облегчения решения поставленной задачи была создана и введена в геном *Y. lipolytica* репортёрная конструкция на основе гена *lacZ* с промотором гена *KGDH*. Для сравнения были получены и охарактеризованы аналогичные конструкции без промотора и с промоторами гена Na-зависимой АТФазы *ENA1* и синтетического производного промотора гена щелочной протеазы *HP4d*. Для изучения активности промоторов генов *ENA* и *KGDH* мы разработали репортёрную систему на основе β -галактозидазы *E. coli*. Преимущество репортёрной конструкции с геном *lacZ* заключается в возможности использования общедоступных и высокочувствительных хромоформных субстратов X-gal и o-фенолгалактозид. β -галактозидаза обладает высокой устойчивостью в клетках различных организмов, что позволяет избежать влияния на результаты измерения протеолитической деградации, которая, в свою очередь, проявляет высокую физиологическую вариативность. Использование удобного для измерения репортёрного фермента позволяет исследовать значительное число экспериментальных точек в каждой серии, что создает возможность изучать работу промоторов в широком диапазоне значений pH среды, детально характеризовать их чувствительность к изменению количественного и качественного состава среды по таким параме-

трам, как доступность пептидов, сахаров, солей. Созданные конструкции pQE-KGDH-LacZ, pQE-ENA-LacZ и pQE-hp4d-LacZ использовали для введения в геном модельного штамма *Y. lipolytica* PO1f, несущего маркер ауксотрофности Ura3. Подобно своим генетическим предшественникам, штамм PO1f обладает высокой способностью к росту при щелочных значениях pH среды. Конструкции не способны к автономной репликации в клетках *Y. lipolytica*, и приобретают способность к стабильному наследованию в них только в результате интеграции в хромосому путем гомологичной рекомбинации. При этом ожидается два варианта геномной локализации – по геномному локусу URA 3 и по локусу, служившему источником исследуемого промотора ENA или KGDH. В случае локализации конструкции по локусу ENA, возникает такая комбинация генов, в которой ген Na-зависимой АТФазы находится под влиянием клонированного промотора, усеченного на расстоянии 758 п.н. от старта трансляции. При наличии регуляторных сайтов выше указанного адреса в геноме *Y. lipolytica*, в этом случае профиль регуляции промотора окажется изменен, что может сказаться на синтезе Na-зависимой АТФазы, и поставить под вопрос сам факт выживания дрожжей на щелочных значениях pH внешней среды. Для изучения значимости этого эффекта конструкции pQE-KGDH-LacZ и pQE-ENA-LacZ в момент введения в геном *Y. lipolytica* линейаризовались по двум различным сайтам, что стимулировало интеграцию конструкций в различные сайты. В случае сайта PstI, расположенного в гене URA3, ожидалась преимущественная интеграция конструкций в локус URA3, а при линейаризации по сайту EcoRI, расположенного на фланге исследуемых промоторов – в сайты KGDH и ENA1, соответственно. Необходимо отметить, что штаммы, полученные при использовании различных схем интеграции, имели одинаковую жизнеспособность и скорость роста, хотя частота образования колоний трансформантов в случае использования для линейаризации сайта PstI в 10-20 раз превышала аналогичный показатель для плазмид pQE-KGDH-LacZ и pQE-ENA-LacZ, линейаризованных по сайту EcoRI (данные не приведены). В случае конструкций pQE-hp4d-LacZ и pQE-LacZ линейаризацию проводили только по сайту PstI, поскольку в их составе не имелось сайтов, пригодных для интеграции в геном *Y. lipolytica*

помимо URA3. Рекombинантные клоны на основе штамма PO1f с введенными репортёрными конструкциями отбирали с помощью трехкратного пассирования на минимальной среде, не содержащей урацила, после чего переносили на полноценную питательную среду. Полученные трансформанты высевали на полноценную жидкую среду III для получения инокулята. После этого проводили физиологический эксперимент. Активность LacZ определяли с использованием хромогенного субстрата X-gal, нормируя ее на содержание общего белка в клеточном лизате, что позволяло получать достоверные результаты вне зависимости от эффективности дезинтеграции клеточной культуры. Каждое измерение проводили в иммунологических планшетах в трех повторностях, определяя стандартную ошибку измерения pH среды, в которой проводилась ферментативная реакция, указан в заголовках столбцов.

Таким образом, при сопоставлении данных по величине репортёрного сигнала отрицательного контроля pQE-LacZ и положительного контроля pQE-HP4d-LacZ можно сделать вывод об отсутствии в предложенной нами репортёрной системе факторов фона, существенно влияющих на выводы из эксперимента. При исследовании конструкций на основе промотора ENA1 вне зависимости от сайта интеграции в геном *Y. lipolytica* можно сделать вывод о том, что индукция синтеза Na-зависимой АТФазы в клетках *Y. lipolytica* в ответ на защелачивание среды культивирования происходит лишь при росте на синтетической среде с глицерином и сукцинатом в качестве источников энергии и углерода, но не на полноценных средах с глюкозой и пептоном (среды III-VI). С использованием конструкции pQE-KGDH-LacZ впервые показана высокая pH-индуцибельность промотора гена α -кетоглутаратдегидрогеназы *Y. lipolytica*. При сопоставлении транскрипционной активности конструкции pQE-KGDH-LacZ, интегрированной в геном *Y. lipolytica* по локусу URA3 и по локусу KGDH, можно сделать вывод о том, что эффективность и pH-индуцибельность промотора α -кетоглутаратдегидрогеназы зависит от его локализации в геноме.

Настоящее исследование было выполнено при поддержке Государственных контрактов №№ 14.740.11.0123, 16.740.11.0027, 14.740.11.0184, 14.740.11.0254, 16.740.11.0196, 14.740.11.0631, 16.740.11.0198.