

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики**

ДУДКО
Дарья Николаевна

**Амплификация и клонирование кластера *acdRS* - генов
бактерий *Pseudomonas putida* В-37 в вектор широкого круга
хозяев pAUC31**

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
доцент кафедры генетики,
кандидат биологических наук
Е.А. Храмцова

Минск, 2015

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 42 с., 19 рис., 2 табл., 33 источника.

Pseudomonas putida В-37, АСДС-ГЕН, АСДР-ГЕН, АЦК-ДЕЗАМИНАЗА.

Объект исследования: ризосферные бактерии вида *P. putida* В-37.

Цель: амплификация и клонирование фрагмента, содержащего *acdS* и *acdR*-гены бактерий *P.putida* В-37 в вектор широкого круга хозяев.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов), генетические (трансформация), молекулярно-генетические (выделение ДНК, полимеразная цепная реакция рестрикционный и электрофоретический анализ) и статистические методы.

Актуальность темы: загрязнение почвы и низкая продуктивность сельскохозяйственных культур являются актуальными проблемами сельского хозяйства. Ризобактерии способствуют увеличению продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных культур к неблагоприятным условиям, осуществляя синтез 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазы (АЦК-дезаминазы). В настоящее время предложена модель, согласно которой существует три гена, участвующих в этом процессе: *acdB*, *acdR* и *acdS*.

В результате исследования оптимизированы условия ПЦР и амплифицирован фрагмент ДНК размером 1700 п.н., соответствующий генам *acdR* и *acdS* у бактерий *P. putida* В-37. Полученный ПЦР-фрагмент клонирован в составе вектора pTZ57R/T в клетки бактерий *Escherichia coli* XL1-blue. Отобраны клоны, несущие фрагмент ДНК размером 1700 т.п.н., соответствующий генам *acdR* и *acdS*, в составе Т-вектора (pTZ57R/T). Получена плазмида pRS37, осуществлен её ПЦР - анализ. Переклонированы *acdRS*-гены бактерий *P. putida* В-37 из плазмиды pRS37 в вектор широкого круга хозяев pAYC31. Получена плазмида pTRS и осуществлен её рестрикционный анализ.

Также установлено, что увеличение копийности *acdR*-гена приводит к значительному повышению активности фермента АЦК-дезаминазы (в 2,2 раза) у бактерий *P. putida* В-37.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 42 с., 19 мал., 2 табл., 33 крыніцы.

Pseudomonas putida В-37, ACDS-ген, ACDR-ген, АЦК-ДЭЗАМІНАЗА.

Аб'ект даследавання: рызасферныя бактэрыі віду *P. putida* В-37.

Мэта: ампліфікацыя і кланаванне фрагмента, які змяшчае *acdS* і *acdR*-гены бактэрыі *P. putida* В-37 у вектар шырокага круга гаспадароў.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў), генетычныя (трансфармацыя), малекулярна-генетычныя (вылучэнне ДНК, рэстрыкцыйны і электрофарэтычны аналіз, ПЦР) і статыстычныя метады.

Актуальнасць тэмы: забруджванне глебы і нізкая прадуктыўнасць сельскагаспадарчых культур з'яўляюцца актуальнымі праблемамі сельскай гаспадаркі. Рызабактэрыі спрыяюць павелічэнню прадуктыўнасці і ўстойлівасці сельскагаспадарчых культур да неспрыяльных умоў, ажыццяўляючы сінтэз 1-амінацыклапрапан-1-карбаксілатдэзаміназы (АЦК-дэзаміназы). На сённяшні дзень прапанавана мадэль, паводле якой існуюць тры гена, якія ўдзельнічаюць у гэтым працэсе: *acdB*, *acdR* і *acdS*.

У выніку даследавання былі аптымізаваны ўмовы ПЦР і ампліфікаваны фрагмент ДНК памерам 1700 п.н., адпаведны генам *acdR* і *acdS* у бактэрыі *P. putida* В-37. Гэты ПЦР-фрагмент *P. putida* В-37 быў кланаваны ў складзе вектара pTZ57R / T у клеткі *Escherichia coli* XL1- blue. Былі адабраны клоны, якія нясуць фрагмент ДНК памерам 1700 т.п.н., адпаведны генам *acdR* і *acdS*, у складзе T-вектара (pTZ57R / T). Была атрымана плазмід рRS37, ажыццяўлён яе ПЦР - аналіз. Былі перакланаваны *acdRS*-гены бактэрыі *P. putida* В-37 з плазміды рRS37 у вектар шырокага круга гаспадароў pAYC31. Была атрымана плазмід рTRS і ажыццяўлён яе рэстрыкцыйны аналіз.

Таксама вызначана, што павелічэнне капійнасці *acdR*-гена прыводзіць да значнага павелічэння актыўнасці фермента АЦК-дэзаміназы (у 2,2 разы) у бактэрыі *P. putida* В-37.

ABSTRACT

Thesis 42 p., 19 fig., 2 tab., 33 references.

Pseudomonas putida B-37, ACDS-GENE, ACDR-GENE, ACC-DEAMINASE.

Object of study: rhizobacteria *Pseudomonas*.

Purpose: to PCR amplify and clone the fragment containing *acdS* and *acdR*-genes of the bacteria *P. putida* B-37 into the broad host range vector.

Methods: microbiological (cultivation of microorganisms), genetic (transformation), molecular-genetic (DNA isolation, restriction and electrophoretic analysis, polymerase chain reaction) and statistical analysis.

Relevant Issues: soil contamination and low crop productivity are urgent problems in agriculture. The enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC- deaminase) produced by rhizobacteria can help to increase the productivity and sustainability of crops to adverse environmental conditions. A model of ACC-deaminase synthesis regulation which involves three genes (*acdB*, *acdR* and *acdS*) has been proposed recently.

In this work, PCR conditions for amplification were optimized and the target DNA fragment of 1700 bp corresponding to the *acdR* and *acdS* -genes of bacteria *P. putida* B-37 was synthesized. The PCR fragment within the vector pTZ57R/T was introduced into the *Escherichia coli* XL1- blue. Clones carrying target DNA construction were selected and a PCR-analysis of the recombinant plasmid was performed. The plasmid obtained was designated pRS37. Then *acdRS*-genes of bacteria *P.putida* B-37 from plasmid pRS37 were recloned into the broad host range vector pAYC31. Restriction analysis of this recombinant plasmid pTRS was carried out.

The increased abundance of the *acdR*-gene was determined to lead to a significant rise in the ACC-deaminase activity (2.2 times) in bacteria *P.putida* B-37 as well.