

СКРИНИНГ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ СИНТЕЗ ФЕНАЗИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ, СРЕДИ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

А. И. Семашко, Е. Г. Веремеенко

3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтаза (ДАГФ-синтаза) (КФ 2.5.1.54) – фермент, катализирующий первую реакцию ароматического биосинтетического пути, в ходе которого происходит образование ароматических аминокислот, а так же сидерофоров, убихинона, хинолонов и феназиновых соединений у бактерий [1,2]. В настоящее время выделяют два гомологичных типа ДАГФ-синтаз [3]. Большинство представителей царства Бактерии обладают ДАГФ-синтазой I-го типа, которая контролирует реакции первичного метаболизма (синтез ароматических аминокислот). ДАГФ-синтазы второго типа первоначально были обнаружены в хлоропластах растений, потом в дрожжах и микроорганизмах. У ризосферных бактерий флуоресцирующей группы ДАГФ-синтаза II типа кодируется геном *phzC*, который входит в состав феназинового оперона. В то же время, у ряда феназин-синтезирующих бактерий данный ген отсутствует, что свидетельствует о возможном существовании у них альтернативных путей синтеза феназиновых соединений [1, 2].

Цель работы – ПЦР-скрининг *phzC*-гена в геноме штаммов флуоресцирующих *Pseudomonas*, а также амплификация и клонирование в составе Т-вектора для последующего секвенирования *phzC*-гена бактерий *P. aurantiaca* В-162.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись штаммы *P. aurantiaca* В-162 (ВКМВ-162), *P. chlororaphis* В-1393 и В-1246, *P. mendocina* ВКМВ1299, *P. putida* КБМЦ4307, *P. fluorescens* ВКМВ1407, *P. aeruginosa* (клинический изолят). В молекулярно-генетических экспериментах использовали штамм *E. coli* XL-Blue.

Культивирование бактерий осуществляли в стандартных питательных средах [4].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в смеси стандартного состава [5] с использованием программируемого амплификатора ThermoHybaib PX2. Параметры циклов амплификации были следующими: первичная денатурация – 2 мин при 94 °С; затем 30 циклов: денатурация – 94 °С, 1 мин; отжиг – 59 °С, 30 с; элонгация – 72 °С, 1 мин; заключительная достройка – 72 °С, 10 мин. Праймеры для ПЦР кластера гена *phzC* был сконструирован на основе нуклеотидных последователь-

ностей GeneBank. Последовательность прямого праймера: **cggatccccctcgtgagagtgat**; обратного – **cggatcccaactccagtcgcaaaagga**. Оба праймера содержат навески из сайтов рестрикции *Vam*HI.

Электрофоретический анализ осуществляли общепринятым методом [6]. Выделение ПЦР-продуктов из геля осуществлялось при помощи GeneJET Gel Extraction Kit. Реакции лигирования и рестрикции проводили согласно протоколам, рекомендованным фирмой производителем. Трансформацию бактерий проводили по стандартной методике [4]. Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса (Birnboim-Doly) [7], а также при помощи GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Все вышеуказанные реактивы производства «МБИ Fermentas» (Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы была проведена проверка 7 штаммов рода *Pseudomonas* на способность продуцировать феназиновые соединения. Установлено, что в среде ПСА феназины образуют три из семи штаммов: *P. aeruginosa*, *P. aurantiaca* В-162 и *P. mendocina* ВКМВ1299.

Поскольку отсутствие продукции антибиотика не является свидетельством отсутствия феназинового оперона был проведен ПЦР-скрининг на наличие *phzC*-гена в геномах всех 7 штаммов. Размер предполагаемого продукта ПЦР должен был составлять около 1235 п.о.

Как видно из рисунка 1 высокая концентрация необходимого ПЦР-продукта наблюдается лишь у пяти штаммов. Вероятной причиной низкого выхода ПЦР-продукта у *P. putida* и *P. fluorescens*, по-видимому, является невысокое сродство разработанных праймеров в силу изменчивости данного участка у этих видов.

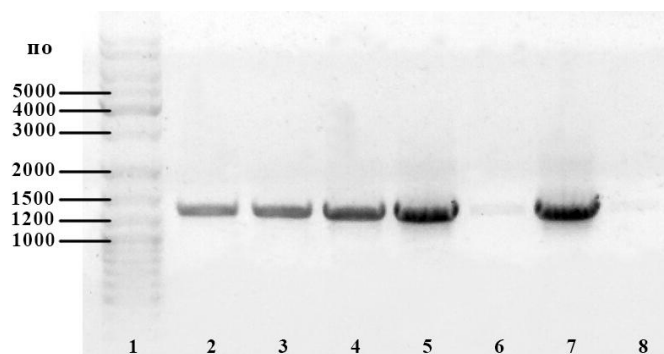


Рис. 1. Продукты ПЦР различных видов бактерий рода *Pseudomonas*

1 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Long Range 10kb DNA,
ПЦР-продукты: 2 – *P. aurantiaca* В-162, 3 – *P. chlororaphis* В-1246,
4 – *P. chlororaphis* В-1391, 5 – *P. aeruginosa*, 6 – *P. putida* KBMЦ4307,
7 – *P. mendocina* ВКМВ1299, 8 – *P. fluorescens* ВКМВ1407

На следующем этапе работы было осуществлено клонирование полученного ПЦР-фрагмента бактерий *P. aurantiaca* В-162 в составе

pTZ57R/T-вектора. Для доказательства наличия вставки необходимого размера был проведен рестрикционный анализ полученного рекомбинантного вектора в присутствии рестриктаз BamHI и HindIII, Полученные результаты представлены на рисунке 2.

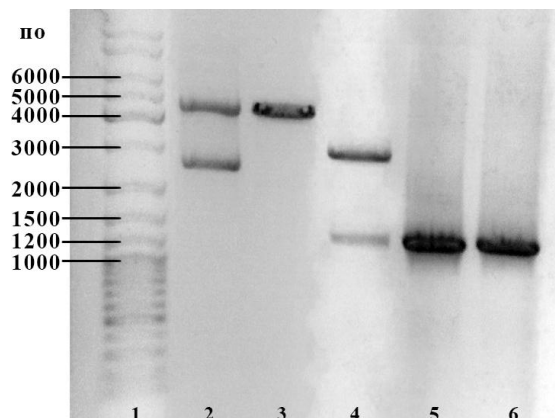


Рис. 2. Доказательство наличия вставки

1 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Long Range 10kb DNA, 2 – кольцевая форма плазмиды pTZ57R/T со вставкой, 3 – линейризованная по HindIII плазида pTZ57R/T со вставкой, 4 – плазида pTZ57R/T со вставкой, обработанная рестриктазой BamHI, 5 – ПЦР-продукт плазмиды pTZ57R/T со вставкой, 6 – ПЦР-продукт тотальной ДНК штамма B-162

Для проверки полученных ПЦР-продуктов на их соответствие *phzC*-гену проведен рестрикционный анализ полученных фрагментов, учитывая данные рестрикционной карты бактерий *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* StFRB508 и *P. chlororaphis subsp. chlororaphis* GP72 [8].

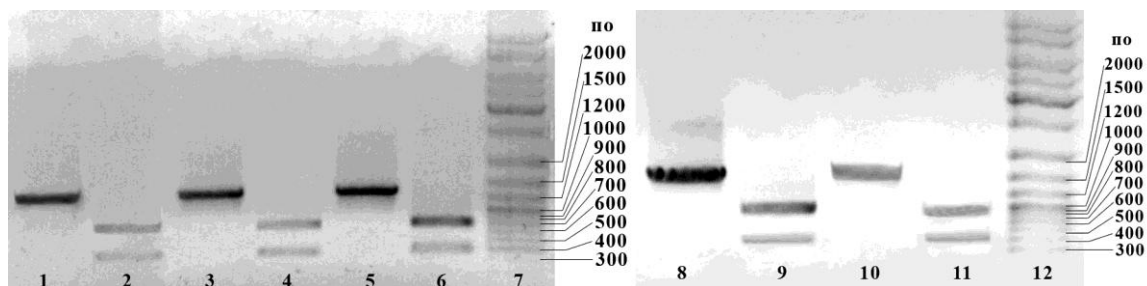


Рис. 3. Результат рестрикции по SmaI

Продукты ПЦР: 1 - *P. aurantiaca* B-162, 3 - *P. chlororaphis* B-1246, 5 - *P. chlororaphis* B-1391 8 – *P. aeruginosa*, 10 - *P. mendocina* ВКМВ1299
 Результат рестрикции по SmaI: 2 - *P. aurantiaca* B-162, 3 - *P. chlororaphis* B-1246, 6 - *P. chlororaphis* B-1391 9 – *P. aeruginosa*, 11 - *P. mendocina* ВКМВ1299
 7 и 12 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Long Range 10kb DNA

Для анализа была выбрана рестриктаза SmaI, которая разрезает *phzC*-ген на два фрагмента: 770 и 470 п.о. Как видно из рисунка 3, получены рестрикционные фрагменты ожидаемого размера, однако для окончательной идентификации амплифицированного фрагмента необходимо его секвенирование.

Таким образом, ПЦР-скрининг показал наличие *phzC*-гена у бактерий *P. aurantiaca* В-162, *P. chlororaphis* В-1393, *P. chlororaphis* В-1246, *P. aeruginosa*, *P. mendocina* ВКМВ1299. Способностью синтезировать феназиновые соединения на среде ПСА обладают *P. aurantiaca* В-162, *P. aeruginosa*, *P. mendocina* ВКМВ1299. Осуществлено клонирование ПЦР-продукта, соответствующего *phzC*-гену по размеру и расположению сайтов рестрикции, в составе рTZ57R/Г вектора.

Литература

1. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway / D.V. Mavrodi, T.L. Peever, O.V. Mavrodi, J.A. Parejko, J.M. Raaijmakers, P. Lemanceau, S. Mazurier, L. Heide, W. Blankenfeldt, D.M. Weller, L.S. Thomashow // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76, № 3. – P. 866-879.
2. Pierson III, L.S. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes / L.S. Pierson III, E.A. Pierson // Appl. Microbiol. Biotech. – 2010. – Vol. 86, № 6. – P. 1659-1670.
3. Genome-wide identification, domain architectures and phylogenetic analysis provide new insights into the early evolution of shikimate pathway in prokaryotes / X.-Y. Zhi, J.-C. Yao, H.-W. Li, Y. Huang, W.-J. Li // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2014. – P. 154-164.
4. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; под ред. А.А. Баева. – Москва: Мир, 1984. – 480 с.
5. Current protocols in molecular biology / F.M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl // New York: John Wiley & Sons Inc. – 2nd ed. – 1993. – Vol. 1.
6. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, D.W. Russel. – 3rd ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. – 2344 p.
7. Birnboim, H.C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA / H.C. Birnboim, J. Doly // Nucleic Acids Res. – 1979. – Vol. 24, № 7. – P. 1513-1523.
8. Phenazine antibiotic production and antifungal activity are regulated by multiple quorum-sensing systems in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508 / T. Morohoshi, W.Z. Wang, T. Suto, Y. Saito, S. Ito, N. Someya, T. Ikeda // Biosci. Bioeng. – 2013. - Vol. 116, № 5. – P. 580-584.

ВОЗДЕЙСТВИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КАТИОННЫХ КАНАЛОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК КОРНЯ ПШЕНИЦЫ

Д. Е. Стрельцова, П. В. Чикун

Брассиностероиды (БС) – группа гормонов растений стероидной природы, обладающих различными физиологическими функциями. Благодаря высокоаффинному связыванию с рецептором плазматической мембраны BRI1, приводящему к запуску специализированных