

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

ТАГИЛЬЦЕВА
Ксения Александровна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ САЙТ-
НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА С ПОМОЩЬЮ
СУИЦИДАЛЬНОГО ИНТЕГРАТИВНОГО ВЕКТОРА
PK18MOV ДЛЯ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS***

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
Ицент кафедры генетики,
к.б.н. Веремеенко Е. Г

Минск, 2016

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 47 страниц, 28 рисунков, 2 таблицы, 53 источника.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА С ПОМОЩЬЮ СУИЦИДАЛЬНОГО ИНТЕГРАТИВНОГО ВЕКТОРА pK18mob ДЛЯ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Объектом исследования являются коллекционные штаммы бактерий рода *Pseudomonas*

Целью исследования – подбор оптимальных условий для проведения сайт-направленного мутагенеза с использованием суицидального интегративного вектора pK18mob для бактерий рода *Pseudomonas*.

В работе использовались микробиологические, молекулярно-генетические и биохимические методы.

На первом этапе работы, на основе анализа нуклеотидной последовательности *psrA* гена бактерий рода *Pseudomonas* в базе данных NCBI Blast были разработаны специфические праймеры для поиска изучаемого гена в геноме исследуемого штамм *P. chlororaphis sp. aurantiaca* В-162 с проведением в последующем ПЦР-скрининга. Проведенный рестрикционный анализ и секвенирование подтвердили, что клонированный фрагмент является именно *psrA*-геном. Данные секвенирования были в дальнейшем использованы для разработки праймеров для средней части гена, которая была амплифицирована и клонирована вначале в составе pTZ57R/T вектора, а после переклонирована в плазмиду pK18 mob и введена в мобилизующий штамм *E. coli* BW19851. Поскольку была поставлена задача по стандартизации методик сайт-направленного мутагенеза с использованием плазмиды pK18mob для всех бактерий рода *Pseudomonas* на следующем этапе работы была проведена проверка на наличие гена *psrA* в геноме всех штаммов данного рода, имеющих в коллекции кафедры генетики биологического факультета БГУ. Далее проводился подбор оптимальных концентраций клеток донора и реципиента, используемых в скрещивании, с последующим отбором трансконъюгантов. На основе проделанной работы была разработана методика.

ABSTRACT

Graduate work 47 pages., 28 pictures, 2 tables, 53 sources.

Development of methods for site-directed mutagenesis by suicidal integration vector PK18MOB FOR bacteria of the genus *Pseudomonas*

The object of the study are collectible strains of bacteria of the genus *Pseudomonas*

The study - the selection of the optimum conditions for carrying out site-directed mutagenesis using suicidenton integrative vector pK18mob for bacteria of the genus *Pseudomonas*.

We used microbiological, molecular-genetic and biochemical methods.

At the first stage, based on nucleotide sequence analysis of the gene *psrA* bacteria of the genus *Pseudomonas* in a data base of NCBI Blast specific primers were designed for the search of a gene in the genome of the test strain *P. chlororaphis* sp. *aurantiaca* B-162 in a subsequent conduct PCR screening. Spent restriction analysis and sequencing confirmed that the cloned fragment is precisely *psrA*-gene. The sequence data were further used to design primers for the middle portion of the gene that was amplified and cloned initially composed pTZ57R/T vector, and then cloning into the plasmid pK18mob and introduced into the mobilizing strain of *E. coli* BW19851. Since there was a task to standardize methods of site-directed mutagenesis using plasmid pK18mob for all bacteria of the genus *Pseudomonas* in the next phase of the work was carried out checking for *psrA* gene in the genome of all strains of this kind available in the collection of the Department of Genetics of the biological faculty of BSU. Further selection was performed optimal concentrations of donor and recipient cells used in crosses with subsequent selection transconjugants. On the basis of the work methodology was developed.

РЕФЕРАТ

Дыпломная работа 47 старонак., 28 малюнкаў, 2 табліцы, 53 крыніцы.

Распрацоўка методык правядзення сайт-накіраванага мутагенеза з дапамогай суіцыдальнага інтэгрэтыўнага вектара pK18mob для бактэрыі роду *Pseudomonas*.

Аб'ектам даследавання з'яўляюцца калекцыйныя штамы бактэрыі роду *Pseudomonas*

Мэта даследавання - падбор аптымальных умоў для правядзення сайт-накіраванага мутагенеза з выкарыстаннем суіцыдальнага інтэгрыраванага вектара pK18mob дзеля бактэрыі роду *Pseudomonas*.

У працы выкарыстоўваліся мікрабіялагічныя, малекулярна-генетычныя і біяхімічныя метады.

На першым этапе работы, на аснове аналізу нуклеотыднай паслядоўнасці *psrA* гена бактэрыі роду *Pseudomonas* ў базе дадзеных NCBI Blast былі распрацаваны спецыфічныя праймер для пошуку вывучаемага гена ў геноме доследнага штама *P. chlororaphis* sp. *aurantiaca* B-162 з правядзеннем у наступным ПЦР-скрынінгу. Праведзены рэстрыкцыйны аналіз і секвеніраванне пацвердзілі, што кланаваны фрагмент з'яўляецца менавіта *psrA*-генам. Данныя секвеніравання былі ў далейшым выкарыстаны для распрацоўкі праймераў для сярэдняй частцы гена, якая была ампліфіцыравана і кланаваная спачатку ў склад рTZ57R/T вэктару, а пасля перакланавана ў плазмиду pK18mob і ўведзена ў мабілізаваны штам *E. coli* BW19851. Пасколькі была пастаўлена задача па стандартызацыі методык сайт-накіраванага мутагенеза з выкарыстаннем плазміды pK18mob для ўсіх бактэрыі роду *Pseudomonas* на наступным этапе работы была праведзена праверка на наяўнасць гена *psrA* ў геноме ўсіх штамаў дадзенага роду, наяўных у калекцыі кафедры генетыкі біялагічнага факультэта БДУ. Далей праводзіўся падбор аптымальных канцэнтрацый клетак донара і рэцыпіента, якія выкарыстоўваюцца ў скрыжаванні, з наступным адборам трансгэноў. На аснове праведзенай работы была распрацавана методыка.