

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра генетики

СЕМАШКО
Анастасия Игоревна

**ФУНКЦИОНАЛЬНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДАГФ-
СИНТАЗЫ II ТИПА БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS***

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
доцент Е.Г. Веремеенко

Минск, 2016

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 48 с., 23 рис., 4 табл., 45 источников, 3 приложения.
ФУНКЦИОНАЛЬНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДАГФ-СИНТАЗЫ II
ТИПА БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*.

Объекты исследования: штаммы *Pseudomonas chlororaphis* spp. *aurantiaca* В-162, *P. chlororaphis* В-1393, *P. chlororaphis* В-1246, *P. aeruginosa* АТСС 15412, *P. mendocina* ВКМВ1299, *P. putida* КБМЦ4307, *P. fluorescens* ВКМВ1407.

Цель: структурно-функциональная характеристика *phzC*-гена бактерий рода *Pseudomonas*.

Методы исследования: микробиологические, молекулярно-генетические, бионформационные, биохимические, спектрофотометрические.

3-дезоксид-Д-арабиногептулозонат-7-фосфат синтаза II типа (ДАГФ-синтаза II типа - КФ 2.5.1.54) является ключевым ферментом шикиматного пути. Это одна из двух известных ДАГФ-синтаз, которая, в отличие от аналогичного фермента I типа, присутствует не только в клетках бактерий, но и в хлоропластах и ядрах растений. В связи с этим особый интерес представляет изучение направления и механизмов переноса данного гена между геномами про- и эукариотических организмов.

Наличие *phzC*-гена было подтверждено в геномах всех исследованных коллекционных штаммов. Последовательности трех из них (*P. chlororaphis* spp. *aurantiaca* В-162, *P. aeruginosa* АТСС 15412 и *P. mendocina* ВКМВ1299) были отсеквенированы и полученные результаты использованы для построения филограммы. Анализ данных секвенирования продемонстрировал высокую степень консервативности *phzC*-гена у бактерий рода *Pseudomonas*. Филограмма подтвердила раннее расхождение путей эволюции данного гена у про- и эукариотических организмов.

Измерение удельной активности ДАГФ-синтаз, синтезированных бактериями на полноценной и минимальной средах, доказало активацию ДАГФ-синтазы II типа только на среде ПСА, что резко повышало уровень наработки продукта взаимодействия фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата, реакцию взаимодействия которых данный фермент катализирует.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца 48 с., 23 мал., 4 табл., 45 крыніц, 3 дадатка.

ФУНКЦЫЯНАЛЬНА-ГЕНЕТЫЧНЫ АНАЛІЗ ДАГФ-СІНТАЗЫ ІІ ТЫПУ БАКТЭРЫЙ РОДА *PSEUDOMONAS*.

Аб'екты даследавання: штамы *Pseudomonas chlororaphis* spp. *aurantiaca* В-162, *P. chlororaphis* В-1393, *P. chlororaphis* В-1246, *P. aeruginosa* АТСС 15412, *P. mendocina* ВКМВ1299, *P. putida* КБМЦ4307, *P. fluorescens* ВКМВ1407.

Мэта: структурна-функцыянальная характарыстыка *phzC*-гена бактэрыі рода *Pseudomonas*.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя, малекулярна-генетычныя, біяінфармацыйныя, біяхімічныя, спектрафатаметрычныя.

3-дэзоксі-D-арабінагептулазанат-7-фасфат сінтаза ІІ тыпу (ДАГФ-сінтаза ІІ тыпу - КФ 2.5.1.54) з'яўляецца ключавым фярментам шыкіматнага шляху. Гэта адна з дзвух вядомых ДАГФ-сінтаз, якая, у адрозненне ад аналагічнага фярмента І тыпу, прысутнічае не толькі ў клетках бактэрыі, але і ў хларапластах і ядрах раслін. У сувязі з гэтым асабліваю цікавасць выклікае вивучэнне кірунку і механізмаў пераносу гэтага гена паміж геномамі пра- і эукарыятычных арганізмаў.

Падцверджана наяўнасць *phzC*-гена ў геномах усіх даследаваных калекцыйных штамаў. Паслядоўнасці трох з іх (*P. chlororaphis* spp. *aurantiaca* В-162, *P. aeruginosa* АТСС 15412 і *P. mendocina* ВКМВ1299) былі адсекваніраваны, а атрымленыя вынікі выкарастаны для пабудовы філаграмы. Аналіз дадзеных секваніравання прадэманстравалі высокі ўзровень кансерватыўнасці *phzC*-гена ў бактэрыі рода *Pseudomonas*. Філаграма падцвердзіла ранняе разыходжанне шляхаў эвалюцыі дадзенага гена ў пра- і эукарыятычных арганізмаў.

Вымярэнне ўдзельнай актыўнасці ДАГФ-сінтаз, якія былі сінтэзаваны на паўнацэнным і мінімальным асяроддзях, даказала, што толькі на асяроддзі ПАА мае месца актывацыя ДАГФ-сінтазы ІІ тыпу, што рэзка павышала ўзровень вытварэння прадукта ўзаемадзеяння фосфаенолпірувата і эрытроза-4-фасфата, рэакцыю ўзаемадзеяння якіх гэты фярмент каталізуе.

ABSTRACT

Graduate work 48 p., 23 pict., 4 tabl., 45 references, 3 attachments.

FUNCTIONAL GENETIC ANALYSIS OF DAHPS II TYPE IN PSEUDOMONAS BACTERIA.

Object of research: strains *Pseudomonas chlororaphis* spp. *aurantiaca* B-162, *P. chlororaphis* B-1393, *P. chlororaphis* B-1246, *P. aeruginosa* ATCC 15412, *P. mendocina* BKMB1299, *P. putida* KBMI4307, *P. fluorescens* BKMB1407.

Aim of work: structural and functional characterization of *phzC*-gene of *Pseudomonas* genus bacteria.

Methods: microbiological, molecular-genetic, bioinformatical, biochemical, spectrophotometrical.

3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase II type (DAHP synthase II type - EC 2.5.1.54) is the crucial enzyme of shikimate pathway. It is one of two known types of DAHP synthases detected in chloroplastic and nuclear plant genome in contrast to the first type that had been found only in bacteria. As a result the main interest of this investigation was to study the way and mechanisms of gene transfer among genomes of prokaryotic and eukaryotic organisms.

Presence of *phzC*-gene was confirmed in all researched strains of *Pseudomonas* genus. Sequencing of genes from *P. chlororaphis* spp. *aurantiaca* B-162, *P. aeruginosa* ATCC 15412 and *P. mendocina* BKMB1299 were carried out. The results were used for phylogenetic tree plotting. There was established by sequencing analysis that the high level of *phzC*-gene conservatism observed among *Pseudomonas* bacteria. Phylogenetic tree confirmed early divergent evolution pathways of this gene from prokaryotic and eukaryotic organisms.

Determination of DAHP synthase specific activity on reach and minimal media was carried out. It was established that DAHP synthase II type was activated only on reach media (PCA). Due to this synthesis level of phosphoenolpyruvate and D-erythrose 4-phosphate interaction resulting product increased.