

## Литература

1. Романова Е.В. Сравнительный геномный анализ штаммов вируса клещевого энцефалита, обладающих разной вирулентностью.: Автореф. дисертация на соискание степени кандидата биологических наук. Новосибирск, 2011.–17с
2. Belikov S. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors / Belikov S. // Journal of Biological Chemistry 276, 45762–45771
3. AMBER 12: Reference manual / D.A. Case [и др.]; University of California, San Francisco, 2012. – 348 с.

## КЛОНИРОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНОГО PSRA-ГЕНА БАКТЕРИЙ PSEUDOMONAS AURANTIACA

Ю. А. Шилова, Е. Г. Веремеенко

Ризосферные бактерии *Pseudomonas aurantiaca* являются продуцентами феназиновых антибиотиков, проявляющими высокую биологическую активность в отношении ряда патогенов растений и животных [1]. Это позволяет использовать данные соединения для разработки на их основе эффективных биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур и разработки терапевтических средств лечения некоторых заболеваний человека [2]. Для получения высокоактивных продуцентов феназинов необходимо детальное изучение регуляции биосинтеза этих веществ, которая остается для нас во многом неизученной.

Феназиновые антибиотики относятся к вторичным метаболитам, продукция которых регулируется посредством двухкомпонентной системы GacS/GacA [3; 4]. Одним из ниже лежащих звеньев каскада, контролируемого GacS/GacA, является PstA (от англ. «*Pseudomonas sigma regulator*») – транскрипционный регулятор, относящийся к TetR-семейству белков. Как и другие члены данного семейства, С-концевой домен PstA содержит сайт для связывания эффекторных молекул, роль которых, в данном случае, играют преимущественно жирные кислоты с длиной углеродной цепи C<sub>12</sub> – C<sub>18</sub> [5].

В зависимости от места расположения специфической консенсусной последовательности, узнаваемой PstA, данный белок может функционировать как активатор или ингибитор транскрипции, перекрывая в последнем случае сайты посадки РНК-полимеразы [6].

Примечательным является то, что в различных литературных источниках существуют противоречивые данные о роли PstA в регуляции синтеза феназинов. Даже в пределах одного вида, но разных штаммов, например *P. chlororaphis*, активация данного гена, опосредованно через транскрипцию *groS*-гена, может иметь совершенно противоположное действие на продукцию феназиновых антибиотиков [7; 8; 9].

В связи с вышесказанным интересным является выяснение роли *PsrA* в продукции феназинов у бактерий *Pseudomonas aurantiaca*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *P. aurantiaca* B-162, полученный из коллекции кафедры генетики БГУ (коллекционный номер КМБУ В-162). Для клонирования использовался штамм *E. coli* XL-1Blue (F'proABlacI<sup>q</sup>lacZΔM15Tn10/recA1gyrA96(Nar<sup>r</sup>)thi-1hsdR17supE44relA1lac) и вектор pTZ57R/T («МБИ Ферментас», Литва).

Культивирование бактерий осуществляли в стандартных питательных средах LB и питательном бульоне, приготовленном на основе сухого концентрата, производства фирмы ФГУП «НПО Микроген» (Махачкала) и на агаризованных полноценных питательных средах при температуре 37°C (*E. coli*) и 28°C (*P. aurantiaca*). Тотальную ДНК выделяли сарколизоловым методом [10]. Выделение плазмиды, трансформацию и электрофорез проводили согласно стандартным протоколам. Выделение ДНК из агарозного геля проводили с использованием коммерческого набора GeneJET<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit («МБИ Ферментас», Литва). Лигирование и рестрикцию проводили в смеси стандартного состава, в условиях, рекомендованных фирмой-производителем («МБИ Ферментас», Литва). ПЦР проводили в смеси стандартного состава с использованием программируемого термостата ThermoHybaib PX2. Параметры циклов амплификации были следующими: первичная денатурация – 2 мин при 94°C; затем 30 циклов: денатурация – 94°C, 1 мин; отжиг – 52°C, 30 с; элонгация – 72°C, 2 мин 30 с; заключительная достройка – 72°C, 10 мин. Праймеры для ПЦР гена *psrA* были сконструированы на основе информации из базы данных нуклеотидных последовательностей GeneBank. Последовательность прямого праймера: GCGGATCCGAGTAGCCATGGCCCA; последовательность обратного праймера – GCGGATCCACGGTCAGGCCTTGGC (выделены сайты для рестриктазы). Оба праймера содержали сайты для рестриктазы BamHI. Секвенирование ДНК проводили с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (производитель «Applied Biosystems», США) на секвенаторе ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (производитель «Applied Biosystems», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы был осуществлен ПЦР-скрининг на присутствие *psrA* гена в геноме бактерий *P. aurantiaca*. Были разработаны

праймеры включающие кодирующую последовательность *psrA* гена и дополнительно несколько нуклеотидов правее и левее неё.

В качестве матрицы для амплификации *psrA* гена использовали тотальную ДНК бактерий дикого типа *P. aurantiaca B-162*. Размер полученного ПЦР-продукта составил 750 п. н. (рис. 1).

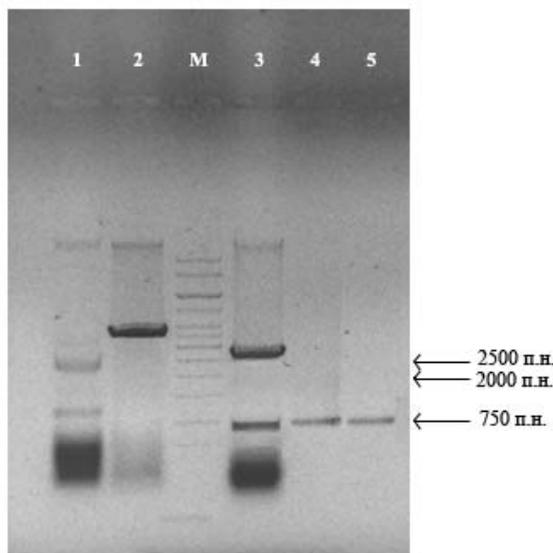


Рис. 1. Электрофоретический анализ рекомбинантной плазмиды рTZ57R/Т со вставкой гена *psrA*

Примечание: 1 – кольцевая форма ДНК плазмиды рTZ57R/Т*psrA*, 2 – линейризованная по *SmaI* форма ДНК плазмиды рTZ57R/Т*psrA*, 3 – рестрицированная по *BamHI* ДНК плазмиды рTZ57R/Т*psrA*, 4 – ПЦР-продукт плазмиды со вставкой, 5 – ПЦР-продукт *psrA* гена для – *P. aurantiaca B-162* (контроль); М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК GeneRuler™ 1kb DNA Ladder #SM0311

На следующем этапе работы было осуществлено клонирование полученного ПЦР-фрагмента в составе вектора рTZ57R/Т, после чего рекомбинантную конструкцию перенесли в клетки штамма *E. coli XL-1Blue*. Последующий рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды рTZ57R/Т*psrA* производился с использованием рестриктаз *SmaI* и *BamHI*, а также ПЦР-амплификация в присутствии специфических праймеров и ДНК этой плазмиды в качестве матрицы, подтвердили наличие в ее составе вставки, идентичной по размерам ПЦР-продукту *psrA* гена (рис. 1).

Для окончательной идентификации клонированного фрагмента было осуществлено его секвенирование, которое показало, что нуклеотидная последовательность *psrA*-гена у бактерий *P. aurantiaca B-162* характеризуется высокой степенью гомологии (до 96 %) с имеющимися в базе данных NCBI Blast последовательностями *psrA*-гена (таблица)

**Сравнение нуклеотидных последовательностей клонированного фрагмента с известными последовательностями PsrA в базе данных**

Код доступа	Описание	Процент гомологии (%)
JQ971979.1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain PA23 PsrA (psrA) gene, complete cds	96 %
AF502251.1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain PCL1391 LexA repressor (lexA), PsrA protein (psrA), and beta-N-acetylglucosaminidase-like protein (nagZ) genes, complete cds	95 %
CP003190.1	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0, complete genome	89 %

**Литература**

1. *Laurson J.B, Nielsen J.* Phenazine natural products: Biosynthesis, Synthetic Analogues and Biological Activity // *Chem. Rev.* 2004. Vol. 104. P. 1663–1685.
2. *Price-Whelan A. et al.* Rethinking «secondary» metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics // *Nat. Chem. Biol.* 2006. Vol. 2. №2. P. 71–78.
3. *Bertani I et al.* Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas* // *Arch Microbiol.* 2003. Vol 180. P 264–271.
4. *Wang D. et al.* Roles of the Gac-Rsm pathway in the regulation of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 // *MicrobiologyOpen.* 2013. doi: 10.1002/mbo3.90. P. 1–20.
5. *Kang Y. et al.* The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of rpoS and the type III secretion exsCEBA operon in *Pseudomonas aeruginosa* // *Molecular Microbiology.* 2009. Vol. 73. № 1. P. 120–136.
6. *Kojic M., Aguilar C., Venturi V.* TetR family member psrA directly binds the *Pseudomonas* rpoS and psrA promoters // *J. Bacteriol.* 2002. –Vol. 184. P. 2324–2330.
7. *Kojic M., Venturi V.* Regulation of rpoS gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator // *J. Bacteriol.* 2001. Vol. 183. P 3712–3720.
8. *Липасова В. А., Атамова Э. Э., Хмель И. А.* Синтез N-ацил-гомосеринлактонов, феназинов, некоторые ферментативные активности и фунгицидная активность в клетках *Pseudomonas chlororaphis* 449 с инактивированным геном rpoS // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2009. № 1. С. 8–10.
9. *Oh S. A. et al.* The GacS-regulated sigma factor RpoS governs production of several factors involved in biocontrol activity of the rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 // *Can. J. Microbiol.* 2013. Vol 59. P. 556–562.
10. *Ligozzi, M. Fontana R.* Isolation of total DNA from bacteria and yeast // *African J. Biotechnol.* 2003. Vol. 2. № 8. P. 251–253.