

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра молекулярной биологии

Аннотация к дипломной работе

РАТНИКОВА
МАРИЯ СЕРГЕЕВНА

РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ
В СИНТЕЗЕ ТРЕГАЛОЛИПИДОВ У БАКТЕРИЙ
RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор М.А. Титок

Минск, 2019

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 79 с., 26 рис., 10 табл., 74 источника.

Ключевые слова: *Rhodococcus erythropolis*, трегалолипиды, монооксигеназы.

Объект исследования: бактерии *R. erythropolis*.

Цель: поиск природных бактерий *R. erythropolis*, способных эффективно продуцировать поверхностно-активные вещества, и изучение роли отдельных генетических детерминант в синтезе трегалолипидов у бактерий этой таксономической группы.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов), физические (спектрофотометрия, измерение поверхностного натяжения), генетические (трансформация, конъюгация, направленный мутагенез), молекулярно-генетические (выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, рестрикционный анализ, клонирование), биохимические (экстракция веществ) и биоинформационные.

В результате проведенного исследования разработаны молекулярно-генетические подходы для выявления и идентификации полиморфных природных бактерий *R. erythropolis* (сконструированы специфические праймеры для амплификации генов *alkB1*, *alkB2*, *alkB3*, *alkB4*, подобраны ферменты *SacI*, *AatII* для специфической рестрикции продуктов амплификации генов *rpoC*). Среди ранее и вновь идентифицированных природных бактерий *R. erythropolis* выявлен штамм *R. erythropolis* A29-k1, эффективно продуцирующий экзоклеточные и связанные с клетками поверхностно-активные соединения. В результате направленного мутагенеза отобраны рифампицинрезистентные варианты бактерий *R. erythropolis* A29-k1 с нарушенными генами *alkB1*, *alkB2*, *alkB3*, *alkB4*, кодирующими синтез алкан-1-монооксигеназ. С использованием оптимизированного спектрофотометрического метода определена концентрация трегалолипидов, синтезируемых исходными и мутантами бактериями *R. erythropolis* A29-k1. Впервые установлено, что у мутантов, устойчивых к рифампицину, синтез трегалолипидов увеличивается в 2 раза. Показано, что мутации в генах *alkB1*, *alkB2* и *alkB4* приводят к снижению продукции трегалолипидов (на 43, 29 и 26 % соответственно), тогда как продукт гена *alkB3* не оказывает влияния на их синтез. Показано, что у рифампицинустойчивых бактерий и мутантов с нарушенными генами *alkB1* и *alkB4* степень гидрофобности клеточной поверхности снижается (на 9, 11 и 6 % соответственно), а у мутантов с инактивированными генами *alkB2* и *alkB3* соответствует штамму дикого типа.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа: 79 с., 26 мал., 10 табл., 74 крыніцы.

Ключавыя словы: *Rhodococcus erythropolis*, трэгалаліпіды, монааксігеназы.

Аб'ект даследавання: бактэрыі *R. erythropolis*.

Мэта: пошук прыродных бактэрыі *R. erythropolis*, здольных эфектыўна прадукцыраваць паверхнева-актыўныя рэчывы, і вывучэнне ролі асобных генетычных дэтэрмінантаў у сінтэзе трэгалаліпідаў у бактэрыі гэтай таксанамічнай групы.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў), фізічныя (спектрафотаметрыя, вымярэнне паверхневага нацяжэння), генетычныя (трансфармацыя, кан'югацыя, накіраваны мутагенэз), малекулярна-генетычныя (выдзяленне ДНК, палімеразная ланцужковая рэакцыя, рэстрыкцыйны аналіз, кланіраванне), біяхімічныя (экстракцыя рэчываў) і біяінфармацыйныя.

У выніку праведзенага даследавання распрацаваны малекулярна-генетычны падыходы для выяўлення і ідэнтыфікацыі паліморфных прыродных бактэрыі *R. erythropolis* (сканструяваны спецыфічныя праймеры для ампліфікацыі генаў *alkB1*, *alkB2*, *alkB3*, *alkB4*, падабраны ферменты *SacI*, *AatII* для спецыфічнай рэстрыкцыі прыдуктаў ампліфікацыі генаў *rpoC*). Сярод раней і зноў ідэнтыфіцыраваных прыродных бактэрыі *R. erythropolis* выяўлены штамп *R. erythropolis* A29-k1, які эфектыўна прадукцыруе экзаклетачныя і звязаныя з клеткамі паверхнева-актыўныя рэчывы. У выніку накіраванага мутагенэзу адабраны рыфампіцынрэзістэнтныя варыянты бактэрыі *R. erythropolis* A29-k1 з парушанымі генамі *alkB1*, *alkB2*, *alkB3*, *alkB4*, якія кадзіруюць сінтэз алкан-1-монааксігеназ. З дапамогай аптымізаванага спектрафотаметрычнага метаду вызначана канцэнтрацыя трэгалаліпідаў, якія сінтэзуюць зыходныя і мутантныя бактэрыі *R. erythropolis* A29-k1. Упершыню выяўлена, што ў мутантаў, устойлівых да рифампіцыну, сінтэз трэгалаліпідаў павялічваецца ў 2 разы. Устаноўлена, што мутацыі ў генах *alkB1*, *alkB2* і *alkB4* прыводзяць да зніжэння прадукцыі трэгалаліпідаў (на 43, 29 і 26 % адпаведна), у той час як прадукт гена *alkB3* не ўрльвае на іх сінтэз. Выяўлена, што ў рифампіцынустойлівых бактэрыі і мутантаў з парушанымі генамі *alkB1* і *alkB4* ступень гідрафобнасці клетачнай паверхні зніжаецца (на 9, 11 і 6 % адпаведна), а ў мутантаў з інактывіраванымі генамі *alkB2* і *alkB3* адпавядае штаму дзікага тыпу.

SUMMARY

Diploma project: 79 p., 26 fig., 10 tables, 74 sources,

Key words: *Rhodococcus erythropolis*, trehalolipids, monooxygenases.

The object of the research: *R. erythropolis* bacteria.

The aim of the research: the search for natural *R. erythropolis* bacteria capable of efficiently producing surfactants, and studying the role of particular genetic determinants in the synthesis of trehalolipids in bacteria of this taxonomic group.

The research methods: microbiological (cultivation of microorganisms), physical (spectrophotometry, measurement of surface tension), genetic (transformation, conjugation, directed mutagenesis), molecular-genetic (DNA extraction, polymerase chain reaction, restriction analysis, cloning), biochemical (extraction of substances) and bioinformational techniques.

As a result of the study, molecular genetic approaches to detect and identify polymorphic natural bacteria of *R. erythropolis* were developed (specific primers to amplify the *alkB1*, *alkB2*, *alkB3*, *alkB4* genes were designed, *SacI* and *AatII* enzymes for specific restriction of amplification products of the *rpoC* genes were selected). Among the previously and newly identified natural bacteria *R. erythropolis*, the strain *R. erythropolis* A29-k1 effectively producing exocellular and cell-binding surfactants was detected. As a result of directed mutagenesis, rifampicin-resistant variants of *R. erythropolis* A29-k1 bacteria with inactivated *alkB1*, *alkB2*, *alkB3*, *alkB4* genes encoding the synthesis of alkane-1-monooxygenases were selected. Using the optimized spectrophotometric method, the concentration of trehalolipids synthesized by the natural and mutant bacteria *R. erythropolis* A29-k1 was determined. First it has been shown that the synthesis of trehalolipids by rifampicin-resistant mutants is increased by 2 times. Also it has been shown that mutations in the *alkB1*, *alkB2* and *alkB4* genes lead to the reduction of trehalolipids production (by 43, 29 and 26 %, respectively), while the *alkB3* gene product has no effect on their synthesis. It has been shown that the degree of cell surface hydrophobicity decreases in rifampicin-resistant bacteria and mutants with inactivated *alkB1* and *alkB4* genes (by 9, 11 and 6 %, respectively), while in mutants with inactivated *alkB2* and *alkB3* genes it corresponds to the level of a wild-type strain.