

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии

ВЕРХОВОДКО
Анна Игоревна

ПОЛУЧЕНИЕ ДЕЛЕЦИОННЫХ МУТАНТОВ *BACILLUS*
SUBTILIS* ПО ГЕНАМ *sinR* И *scoC

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Качан А. В.

Минск, 2021

АННОТАЦИЯ

Объект исследования: гены *sinR* и *scoC* *Bacillus subtilis* 168.

Цель: получить мутанты *Bacillus subtilis* 168 с инаktivированными генами *sinR* и *scoC*.

Штаммы рода *Bacillus* являются модельными объектами для изучения многих характеристик, свойственных схожим бактериям, в лабораторных условиях. Клетки *Bacillus subtilis* синтезируют различные экзоферменты (протеазы, пуллулазы, α -амилазы, пектиназы, ксиланазы), которые используются в разнообразных отраслях промышленности. Одним из важных свойств *B. subtilis* является способность образовывать споры и формировать биопленки. Поэтому штаммы *B. subtilis* активно используют в качестве модельных объектов во многих молекулярно-генетических и микробиологических исследованиях, посвященных изучению процессов клеточной дифференциации в сложных сообществах.

Белковые регуляторы ScoC и SinR участвуют в регуляции синтеза экзоферментов. Также известно, что SinR участвует в контроле синтеза полисахарида, который является основной частью матрикса биопленки, а плейотропный транскрипционный регулятор ScoC вносит вклад в запуск споруляции.

В ходе работы с использованием специфических праймеров были амплифицированы последовательности генов *sinR* и *scoC* на матрице геномной ДНК *B. subtilis* 168.

Полученные фрагменты ДНК клонированы в составе вектора pMTL21c в клетках *E. coli* XL-1 Blue, в результате чего сконструированы плазмиды pMTL21c::*sinR* и pMTL21c::*scoC*.

На их основе созданы рекомбинантные плазмиды pMTL21c-*sinR*::*spc* и pMTL21c-*scoC*::*spc*, в которых структура генов *sinR* и *scoC* *B. subtilis* 168 была нарушена путем замены участка кодирующей белок последовательности на ген устойчивости к спектиномицину.

С использованием созданных плазмид были получены штаммы *B. subtilis* с инаktivированными генами *sinR* и *scoC*, что было подтверждено генетическим (полимеразная цепная реакция) и фенотипическим анализом мутантных штаммов.

МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЎНІВЕРСІТЭТ
БІЯЛАГІЧНЫ ФАКУЛЬТЭТ
Кафедра мікрабіялогіі

ВЕРХАВОДКА
Ганна Ігараўна

АТРЫМАННЕ ДЭЛЯЦЫЁННЫХ ШТАМАЎ *BACILLUS*
SUBTILIS* ПА ГЕНАХ *sinR* І *scoC

Анатацыя да дыпломнай работы

Навуковы кіраўнік:
доктар біялагічных навук,
дацэнт Качан А. В.

Мінск, 2021

АННАТАЦЫЯ

Аб'ект даследавання: гены *sinR* і *scoC* *Bacillus subtilis* 168.

Мэта: атрымаць мутанты *Bacillus subtilis* 168 з інактывіраванымі генамі *sinR* і *scoC*.

Штамы роду *Bacillus* з'яўляюцца мадэльнымі аб'ектамі для вывучэння шмат характарыстык, уласцівых падобным бактэрыям, у лабараторных умовах. Клеткі *Bacillus subtilis* сінтэзуюць розныя экзаферменты (пратэазы, пуллуланазы, α -амілаза, пекціназы, ксіланазы), якія выкарыстоўваюцца ў разнастайных галінах прамысловасці. Адной з важных уласцівасцяў *B. subtilis* з'яўляецца здольнасць утвараць споры і фармаваць біяплёнку. Таму штамы *B. subtilis* актыўна выкарыстоўваюць у якасці мадэльных аб'ектаў у многіх малекулярна-генетычных і мікрабіялагічных даследаваннях, прысвечаных вывучэнню працэсаў клетачнай дыферэнцыяцыі ў складаных супольнасцях.

Бялковыя рэгулятары ScoC і SinR ўдзельнічаюць у рэгуляцыі сінтэзу экзаферментаў. Таксама вядома, што SinR ўдзельнічае ў кантролі сінтэзу поліцукрыду, які з'яўляецца асноўнай часткай матрыкса біяплёнку, а плеятропны транскрыпцыйны рэгулятар ScoC робіць узнёсак у запуск спаруляцыі.

У ходзе выканання работы з выкарыстаннем спецыфічных праймераў былі ампліфіцыраваны паслядоўнасці генаў *sinR* і *scoC* на матрыцы геномнай ДНК *B. subtilis* 168.

Атрыманыя фрагменты ДНК кланаваны ў склад вектара pMTL21c ў клетках *E. coli* XL-1 Blue, у выніку чаго сканструяваны плазміды pMTL21c::*sinR* і pMTL21c::*scoC*.

На іх аснове створаны рэкамбінантныя плазміды pMTL21c-*sinR*::*spc* і pMTL21c-*scoC*::*spc*, у якіх структура генаў *sinR* і *scoC* *B. subtilis* 168 была зрушана шляхам замены ўчастка кадуруючай бялок паслядоўнасці на ген ўстойлівасці да спектынаміцыну.

З выкарыстаннем створаных плазмід былі атрыманы штамы *B. subtilis* з інактывіраванымі генамі *sinR* і *scoC*, што было пацверджана генетычным (палімеразная ланцуговая рэакцыя) і фенатыпічным аналізам мутантных штамаў.

MINISTRY OF EDUCATION REPUBLIC OF BELARUS
BELARUSIAN STATE UNIVERSITY
BIOLOGICAL FACULTY
Microbiology department

A. I.
VERKHOVODKO

OBTAINING THE DELETION STRAINS OF *BACILLUS*
***SUBTILIS* BY *sinR* AND *scoC* GENES**

Scientific supervisor:
Doctor of Biological Sciences,
Assistant Professor Kachan A. V.

Minsk, 2021

ANNOTATION

Subject of research: *Bacillus subtilis* 168 genes *sinR* and *scoC*.

Purpose: to obtain the *Bacillus subtilis* 168 *sinR* and *scoC* gene-inactivated mutants.

Strains of the genus *Bacillus* are model objects for studying many characteristics inherent in similar bacteria in the laboratory conditions. *Bacillus subtilis* cells synthesize various exocellular enzymes (proteases, pullulanases, α -amylase, pectinases, xylanases), which are used in various industries. One of the important properties of *B. subtilis* is the ability to form spores and biofilms. Therefore, *B. subtilis* strains are actively used as model objects in many molecular genetic and microbiological studies devoted to the study of the processes of cell differentiation in complex communities.

Protein regulators ScoC and SinR are involved in the regulation of the synthesis of exocellular enzymes. It is also known that SinR is involved in the control of the synthesis of polysaccharide, which is the main part of the biofilm matrix, and the pleiotropic transcriptional regulator ScoC contributes to the initiation of sporulation.

Using specific primers, the *sinR* and *scoC* gene sequences were amplified on the *B. subtilis* 168 genomic DNA template.

The obtained fragments were cloned into the pMTL21c vector in *E. coli* XL-1 Blue cells, obtaining the plasmids pMTL21c::*sinR* and pMTL21c::*scoC*.

The recombinant plasmids pMTL21c-*sinR*::*spc* and pMTL21c-*scoC*::*spc* were created on their basis, in which the structure of *sinR* and *scoC* genes were violated by replacement of protein coding sequence with spectinomycin resistance gene.

Using the created plasmids *Bacillus subtilis* 168 *sinR* and *scoC* gene-inactivated strains were obtained, in which inactivation of genes was proved by genetic (polymerase chain reaction) and phenotypic analysis of mutant strains.