

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра генетики

НАУМОВСКАЯ
Ольга Алексеевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА
PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SUBSP. *AURANTIACA*, СПОСОБНОГО
К СИНТЕЗУ ФЕНАЗИНОВ НА МИНИМАЛЬНЫХ СРЕДАХ**

Аннотация
к дипломной работе

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

Минск, 2021

РЕФЕРАТ

Дипломная работа с. 56, рис. 35, табл. 5, 48 источников.

Объекты исследования: штаммы *Pseudomonas chlororaphis* subsp *aurantiaca* В-162 (дикий тип) и мутанты В-162/255 и В-162/17.

Цель: анализ и сравнение геномов штаммов бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp *aurantiaca* В-162, а также мутантного штамма В-162/255 и производного из него штамма В-162/17, способного к продукции феназиновых соединений на минимальных средах.

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

Феназиновые пигменты представляют собой низкомолекулярные гетероциклические азотсодержащие соединения, синтезируемые в ходе реакций ароматического пути. Основу всех соединений данного ряда составляет феназин-1-карбоновая кислота.

P. chlororaphis subsp. *aurantiaca* В-162 является продуцентом феназинов. На его основе были получены мутанты В-162/255 и В-162/17, обладающие способностью к сверхсинтезу данных соединений. У В-162/17 появилась способность к синтезу феназинов на минимальных средах. Поскольку для создания данных штаммов применяли химический мутагенез, провоцирующий возникновение множественных мутаций, выяснение причин приобретения конкретного мутантного фенотипа было возможно лишь при условии полногеномного секвенирования. Детальное сравнение аннотированных геномов трех штаммов, привело к обнаружению 4 мутаций, которые потенциально могли повлиять на синтез феназиновых антибиотиков. Для дальнейшего исследования был выбран ген цитохром С оксидазы, несущий наиболее протяженную делецию в своей нуклеотидной последовательности. К последовательностям целевого гена были сконструированы праймеры для ПЦР с перекрывающимися праймерами и получены фрагменты ожидаемого размера для создания генно-инженерной конструкции, обеспечивающей делецию соответствующего гена из генома. Созданная генно-инженерная конструкция трансформирована в клетки *E. coli* BW 19851 и далее перенесена в клетки *P. chlororaphis* subsp *aurantiaca* В-162 с помощью конъюгации, что позволило получить варианты с делецией гена цитохромоксидазы в изучаемых бактериях.

Впервые показано, что продукты генов субъединиц цитохром С оксидаз, в частности гена *coxA*, задействованы в продукции феназиновых антибиотиков на полноценных средах и не принимают участия в синтезе этих соединений на минимальных средах.

ABSTRACT

Graduate work p. 56, pic. 35, table. 5, 48 references.

Object of research: strains of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162, B-162/255, B-162/17 and *Escherichia coli* BW 19851.

Aim of work: analysis and comparison of genomes of bacterial strains *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162, as well as mutant strain B-162/255 and strain B-162/17 derived from it, capable of producing phenazine compounds on minimal media.

Research methods: microbiological, molecular genetic, bionformational, biochemical, spectrophotometric.

Phenazine pigments are low molecular weight heterocyclic nitrogen-containing compounds synthesized in the course of aromatic reactions. All compounds of this series are based on phenazine-1-carboxylic acid.

P. chlororaphis subsp. *aurantiaca* B-162 is a phenazine producer. On its basis, mutants B-162/255 and B-162/17 were obtained, which have the ability to over-synthesize these compounds. B-162/17 acquired the ability to synthesize phenazines on minimal media. Since chemical mutagenesis was used to create these strains, which provokes the emergence of multiple mutations, the elucidation of the reasons for the acquisition of a particular mutant phenotype was possible only under the condition of whole genome sequencing.

A detailed comparison of the annotated genomes of the three strains led to the discovery of 4 mutations that could potentially affect the synthesis of phenazine antibiotics. For further research, the cytochrome C oxidase gene, which carries the longest deletion in its nucleotide sequence, was selected. For the sequences of the target gene, primers for PCR with overlapping primers were designed and fragments of the expected size were obtained to create a genetically engineered construct that ensures the deletion of the corresponding gene from the genome. The created genetically engineered construct was transformed into *E. coli* BW 19851 cells and then transferred to *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 cells by conjugation, which made it possible to obtain variants with the deletion of the cytochrome oxidase gene in the studied bacteria.

It was shown for the first time that the products of the genes of cytochrome C oxidase subunits, in particular the *coxA* gene, are involved in the production of phenazine antibiotics on high-grade media and do not participate in the synthesis of these compounds on minimal media.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца з. 56, мал. 35, табл. 5, 48 крыніц.

Аб'екты даследавання: штамы *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162, В-162/255 і В-162/17, *Escherichia coli* ВW 19851.

Мэта: аналіз і параўнанне геномаў штамаў бактэрыі *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162, а таксама мутантавага штаму В-162/255 і вытворнага з яго штаму В-162/17 здольнага да прадукцыі феназиновых злучэнняў на мінімальным асяроддзях.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя, малекулярна-генетычныя, біонфармацыйныя, біяхімічныя, спектрофотаметрычныя.

Феназиновыя пігменты ўяўляюць сабой нізкамалекулярныя гетэрацыклічныя азотазмяшчальныя злучэнні, сінтэзаваныя ў ходзе рэакцыі араматычнага шляху. Аснову ўсіх злучэнняў дадзенага шэрагу складае феназін-1-карбонавая кіслата.

P. chlororaphis subsp. *aurantiaca* В-162 з'яўляецца прадукцэнтам феназинов. На яго аснове былі атрыманы мутанты В-162/255 і В-162/17 валодаюць здольнасцю да свёрхсінтэзу дадзеных злучэнняў. У В-162/17 з'явілася здольнасць да сінтэзу феназинов на мінімальным асяроддзях. Паколькі для стварэння дадзеных штамаў ўжывалі хімічны мутагенез, які правакуе ўзнікненне множных мутацый, высвятленне прычын набыцця канкрэтнага мутантавага фенатыпу было магчыма толькі пры ўмове полногеномнага секвеніравання. Дэталёвае параўнанне анатаваных геномаў трох штамаў, прывяло да выяўлення 4 мутацый, якія патэнцыйна маглі паўплываць на сінтэзу феназиновых антыбіётыкаў. Для далейшага даследавання быў абраны ген цитохром С оксидазы, які нясе найбольш працяглую дзялок ў сваёй нуклеотидной паслядоўнасці. Да паслядоўнасцяў мэтавага гена былі сканструяваныя праймер для ПЦР з перакрываюцца праймер і атрыманы фрагменты чаканага памеру для стварэння гена-інжынернай канструкцыі, якая забяспечвае дзялок адпаведнага гена з геному. Створаная гена-інжынерная канструкцыя трансфармавана ў клеткі *E. coli* ВW 19851 і далей перанесена ў клеткі *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162 з дапамогай кан'югацыі, што дазволіла атрымаць варыянты з дзялок гена цитохромоксидазы ў вивучаемых бактэрыях.

Упершыню паказана, што прадукты генаў субадзінак цитохром С оксидаз, у прыватнасці гена *soxA*, задзейнічаны ў прадукцыі феназиновых антыбіётыкаў на паўнавартасных асяроддзях і не прымаюць удзелу ў сінтэзе гэтых злучэнняў на мінімальным асяроддзях.