

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

Аннотация к дипломной работе

ИСАЕВ
Алексей Вадимович

**ВЛИЯНИЕ ГЕНА *sigX* И ОПЕРОНОВ *dlt* И *cssRS* НА
АКТИВНОСТЬ ПРОМОТОРА ГЕНА *htrA* В КЛЕТКАХ
BACILLUS SUBTILIS ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
АНТИМИКРОБНЫХ ВЕЩЕСТВ**

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

Минск, 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа включает 47 страниц, 8 рисунков, 1 таблицу, 78 источников.

Ключевые слова: регуляция синтеза внеклеточных ферментов, *Bacillus subtilis*, HtrA, *sigX*, *dlt*, *cssRS*, *lacZ*, фактор σ^X , антимикробные вещества.

Объекты исследования: бактериальные штаммы *Bacillus subtilis* 168 htr9, 168 htr9 *sigX*, 168 htr9 Δ dlt, 168 htr9 Δ cssRS, гены *htrA* и *sigX*, опероны *dlt* и *cssRS*.

Цель: изучить влияние гена *sigX* и оперонов *dlt* и *cssRS* на активность промотора гена *htrA* в клетках *B. subtilis* в ответ на действие антимикробных веществ.

Методы: культивирование бактерий, спектрофотометрия, световая микроскопия, диско-диффузионный анализ устойчивости клеток к различным веществам, определение титра бактериальных клеток, анализ активности промотора с помощью репортерного гена *lacZ*.

С помощью диско-диффузионного анализа было выявлено полное отсутствие влияния оперона *cssRS* на устойчивость клеток *B. subtilis* к следующим антимикробным веществам: тритону X-100, ДСН, HCl, низину, полимиксину В, ванкомицину, лизоциму, фосфомицину и цефотаксиму. Была исключена возможность точной фенотипической верификации наличия инактивирующих мутаций в гене *sigX* и опероне *dlt* в клетках *B. subtilis*, основанной на оценке устойчивости клеток к антимикробным веществам (по крайней мере, при восьми повторах анализа). Была выявлена *CssRS*-зависимая активация промотора гена *htrA* в клетках *B. subtilis* в присутствии ванкомицина, полимиксина В, ДСН, тритона X-100, лизоцима и HCl ~2,8 М (9%). Обнаружено положительное влияние гена *sigX* (в отсутствии его работы активация промотора гена *htrA* не выражена) на активность промотора гена *htrA* в клетках *B. subtilis* в присутствии лизоцима и HCl ~2,8 М (9%). В присутствии же ванкомицина, цефотаксима, полимиксина В, ДСН, тритона X-100, низина, фосфомицина и HCl в концентрации 1 М и меньше ген *sigX* не оказывает никакого видимого влияния на активность промотора гена *htrA*. Обнаружено положительно влияние оперона *dlt* на активность промотора гена *htrA* в клетках *B. subtilis* в присутствии тритона X-100 и HCl ~2,8 М (9%), но отрицательное (при его работе активация промотора гена *htrA* не выражена) в присутствии низина. В присутствии же ванкомицина, лизоцима, цефотаксима, полимиксина В, ДСН, фосфомицина и HCl в концентрации 1 М и меньше оперон *dlt* не оказывает никакого видимого влияния на экспрессию гена *htrA*. Обнаружены значительно более низкая скорость набора биомассы и более длительная лаг-фаза у штамма *B. subtilis* с инактивацией гена *sigX* по сравнению со штаммом *B. subtilis* дикого типа.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа ўключае 47 старонак, 8 малюнкаў, 1 табліцу, 78 крыніц.

Ключавыя словы: рэгуляцыя сінтэзу пазаклеткавых ферментаў, *Bacillus subtilis*, HtrA, *sigX*, *dlt*, *cssRS*, *lacZ*, фактар σ^X , антымікробныя рэчывы.

Аб'екты даследавання: бактэрыяльныя штамы *Bacillus subtilis* 168 htr9, 168 htr9 sigX, 168 htr9 Δ dlt, 168 htr9 Δ cssRS, гены *htrA* і *sigX*, апероны *dlt* і *cssRS*.

Мэта: выявіць уплыў гена *sigX* і аперонаў *dlt* і *cssRS* на актыўнасць прамотара гена *htrA* ў клетках *B. subtilis* ў адказ на дзеянне антымікробных рэчываў.

Метады: культываванне бактэрый, спектрафатометрыя, светлавая мікраскапія, дыска-дыфузійны аналіз устойлівасці клетак да розных рэчываў, вызначэнне тытра бактэрыяльных клетак, аналіз актыўнасці прамотара з дапамогай рэпарцёрнага гена *lacZ*.

З дапамогай дыска-дыфузійнага аналізу была выяўлена поўная адсутнасць ўплыву аперону *cssRS* на ўстойлівасць клетак *B. subtilis* да наступных антымікробных рэчываў: трытона X-100, ДСН, HCl, нізіна, паліміксіна В, ванкаміцына, лізацыма, фасфаміцына і цефатаксіма. Была выключана магчымасць дакладнай фенатыпічнай верыфікацыі наяўнасці інактывіруючых мутацый у гене *sigX* і апероне *dlt* ў клетках *B. subtilis*, заснаванай на ацэнцы ўстойлівасці клетак да антымікробных рэчываў (па меншай меры, пры васьмі паўторах аналізу). Была выяўлена *CssRS*-залежная актывацыя прамотара гена *htrA* ў клетках *B. subtilis* ў прысутнасці ванкаміцына, паліміксіна В, ДСН, трытона X-100, лізацыма і HCl ~2,8 М (9%). Выяўлен пазітыўны ўплыў гена *sigX* (у адсутнасці яго працы актывацыя прамотара гена *htrA* не выказана) на актыўнасць прамотара гена *htrA* ў клетках *B. subtilis* ў прысутнасці лізацыма і HCl ~2,8 М (9%). У прысутнасці ж ванкаміцына, цефатаксіма, паліміксіна В, ДСН, трытона X-100, нізіна, фасфаміцына і HCl у канцэнтрацыі 1 М і менш ген *sigX* не аказвае ніякага бачнага ўплыву на актыўнасць прамотара гена *htrA*. Выяўлен пазітыўны ўплыў аперона *dlt* на актыўнасць прамотара гена *htrA* ў клетках *B. subtilis* ў прысутнасці трытона X-100 і HCl ~2,8 М (9%), але негатыўны (пры яго працы актывацыя прамотара гена *htrA* не выказана) у прысутнасці нізіна. У прысутнасці ж ванкаміцына, лізацыма, цефатаксіма, паліміксіна В, ДСН, фасфаміцына і HCl у канцэнтрацыі 1 М і менш аперон *dlt* не аказвае ніякага бачнага ўплыву на экспрэсію гена *htrA*. Выяўлены значна больш нізкая хуткасць набору біямасы і больш працяглая лаг-фаза ў штаму *B. subtilis* з інактывацыяй гена *sigX* у параўнанні са штамам *B. subtilis* дзікага тыпу.

ABSTRACT

The diploma project includes 47 pages, 8 figures, 1 tables, 78 sources.

Key words: regulation of extracellular enzyme synthesis, *Bacillus subtilis*, HtrA, *sigX*, *dlt*, *cssRS*, *lacZ*, σ X factor, antimicrobial agents.

Objects of study: bacterial strains *Bacillus subtilis* 168 htr9, 168 htr9 *sigX*, 168 htr9 Δ dlt, 168 htr9 Δ cssRS, *htrA* and *sigX* genes, *dlt* and *cssRS* operons.

Purpose: to study the effect of the *sigX* gene and the *dlt* and *cssRS* operons on the activity of the *htrA* gene promoter in *B. subtilis* cells in response to the action of antimicrobial substances.

Methods: cultivation of bacteria, spectrophotometry, light microscopy, disk diffusion analysis of cell resistance to various substances, determination of bacterial cell titer, analysis of promoter activity using the *lacZ* reporter gene.

Using disk diffusion analysis, was revealed the complete absence of the influence of the *cssRS* operon on the resistance of *B. subtilis* cells to the following antimicrobial substances: triton X-100, SDS, HCl, nisin, polymyxin B, vancomycin, lysozyme, fosfomicin, and cefotaxime. The possibility of accurate phenotypic verification of the presence of inactivating mutations in the *sigX* gene and the *dlt* operon in *B. subtilis* cells based on the assessment of cell resistance to antimicrobial substances (at least eight repetitions of the analysis) was excluded. *CssRS*-dependent activation of the *htrA* gene promoter was detected in *B. subtilis* cells in the presence of vancomycin, polymyxin B, SDS, triton X-100, lysozyme, and HCl ~2.8 M (9%). A positive effect of the *sigX* gene (in the absence of its operation, the activation of the *htrA* gene promoter is not expressed) on the activity of the *htrA* gene promoter in *B. subtilis* cells in the presence of lysozyme and HCl ~2.8 M (9%) was found. In the presence of vancomycin, cefotaxime, polymyxin B, SDS, triton X-100, nisin, fosfomicin, and HCl at concentrations of 1 M or less, the *sigX* gene has no visible effect on the activity of the *htrA* gene promoter. A positive effect of the *dlt* operon on the activity of the *htrA* gene promoter in *B. subtilis* cells in the presence of triton X-100 and HCl ~2.8 M (9%) was found, but negative (during its work, the activation of the *htrA* gene promoter was not expressed) in the presence of nisin. In the presence of vancomycin, lysozyme, cefotaxime, polymyxin B, SDS, fosfomicin, and HCl at concentrations of 1 M or less, the *dlt* operon has no visible effect on *htrA* gene expression. A significantly lower rate of biomass gain and a longer lag phase were found in the *B. subtilis* strain with inactivation of the *sigX* gene compared to the wild-type *B. subtilis* strain.