

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра молекулярной биологии

Аннотация к дипломной работ

СОРОКИН
Дмитрий Владимирович

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОМОТОРА ГЕНА
ТРАНСКРИПЦИОННОГО РЕГУЛЯТОРА SLYA

Научный руководитель:
старший преподаватель
К.Ю. Песоцкая

Минск, 2025

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 45 страницы, 11 рисунков, 2 таблицы, 29 источников.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*, бактериальный ожог, фенольные соединения растений, SlyA, авторегуляция, регуляция экспрессии.

Объект исследования: *Erwinia amylovora* E2-pUA66, E2-Ps, E2 Δ slyA-Ps, E2-PsCs, E2 Δ slyA-PsCs, E2-PsC, E2 Δ slyA-PsC, E2-PyC, E2-PyCs, E2 Δ slyA-PyC, E2 Δ slyA-PyCs, *Escherichia coli* DH5 α .

Предмет исследования: активность промотора гена транскрипционного регулятора slyA.

Цель исследования: изучить регуляцию экспрессии промотора гена транскрипционного регулятора SlyA.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов), статистические, молекулярно-генетические (электрофорез, полимеразная цепная реакция, измерение уровня экспрессии генов).

В результате проведенного исследования установлено, что салициловая кислота в концентрации 2,5 ммоль/л вызывает увеличение активности промотора гена slyA в 1,3 раза по сравнению с контролем, а в концентрации 5 ммоль/л – в 1,4 раза. Ванилиновая кислота в концентрации 2,5 ммоль/л ее показала снижение в 1,2 раза по сравнению с контролем. *пара*-гидроксибензойная кислота (2,5 ммоль/л) показала снижение в 1,4 раза. Феруловая кислота (2,5 ммоль/л) показала снижение в 1,4 раза. Хлорогеновая кислота (2,5 ммоль/л) показала снижение в 1,2 раза. Кофейная кислота в концентрации 2,5 ммоль/л не вызвала изменений в активности промотора гена slyA, однако при увеличении концентрации кислоты до 5 ммоль/л экспрессия репортера оказалась снижена в 1,2 раза по сравнению с контрольными значениями. Добавление коричной кислоты в концентрации 2,5 ммоль/л к среде культивирования не вызвало достоверных различий между полученными контрольными и опытными значениями. При культивировании клеток с растительными фенольными соединениями в концентрации 0,6 ммоль/л было обнаружено, что ни одно из исследуемых фенольных соединений достоверно не изменило уровень активности исследуемого промотора.

Экспрессия промотора гена slyA у клеток делеционного мутанта Δ slyA-PsC был ниже в 1,8 раза по сравнению со значениями, полученными при культивировании штамма E2-PsC. Замена "пустой" векторной плазмиды pFLAG-CTC штамма E2-PsC на рекомбинантную с копией гена slyA (pFLAG-CTC-slyA, штамм E2-PsCs) повысила исследуемую промоторную активность в 1,4 раза. Эти

данные свидетельствуют об активаторной роли SlyA в отношении промотора собственного гена.

Было показано, что полимиксин В в концентрации 1 мкг/мл вызывает увеличение промоторной активности гена *slyA* в 1,2 раза.

В концентрации 25 ммоль/л перекись водорода вызывает снижение выживаемости клеток делеционного мутанта по сравнению с клетками дикого типа в 2 раза, а в концентрациях 50 и 100 ммоль/л – прекращение роста клеток мутантного штамма. Активность промотора *slyA* в присутствии H₂O₂ в концентрации 1 ммоль/л увеличилась в 1,2 раза, в концентрации 2 ммоль/л – в 1,4 раза, в концентрации 5 ммоль/л – в 1,7 раза.

Замена плазмиды pFLAG-CTC на рекомбинантную плазмиду с копией гена *slyA* (pFLAG-CTC-*slyA*) увеличила активность исследуемого промотора в клетках делеционного мутанта в 4,2 раза (Δ *slyA*-PyCs), что может свидетельствовать о том, SlyA положительно регулирует экспрессию гена *yhcN*, продукт которого, по-видимому, вовлечен в устойчивость клеток *E. amylovora* к окислительному стрессу.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 45 старонкі, 11 малюнкаў, 2 табліцы, 29 крыніц.

Ключавыя словы: *Erwinia amylovora*, бактэрыяльны апёк, фенольныя злучэнні раслін, *SlyA*, аўтарэгуляцыя, рэгуляцыя экспрэсіі.

Аб'ект даследавання: *Erwinia amylovora* E2-pUA66, E2-Ps, E2 Δ *slyA*-Ps, E2-PsCs, E2 Δ *slyA*-PsCs, E2-PsC, E2 Δ *slyA*-PsC, E2-PyC, E2-PyCs, E2 Δ *slyA*-PyC, E2 Δ *slyA*-PyCs, *Escherichia coli* DH5 α .

Прадмет даследавання: актыўнасць прамотора гена транскрыпцыйнага рэгулятара *slyA*.

Мэта даследавання: вывучыць рэгуляцыю экспрэсіі прамотора гена транскрыпцыйнага рэгулятара *SlyA*.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў), статыстычныя, малекулярна-генетычныя (электрафарэз, палімеразную ланцуговая рэакцыя, вымярэнне ўзроўню экспрэсіі генаў).

У выніку праведзенага даследавання ўстаноўлена, што саліцылавая кіслата ў канцэнтрацыі 2,5 ммоль / л выклікае павелічэнне актыўнасці прамотора гена *slyA* ў 1,3 разы ў параўнанні з кантролем, а ў канцэнтрацыі 5 ммоль / л - у 1,4 разы. Ванілінавая кіслата ў канцэнтрацыі 2,5 ммоль / л яе паказала зніжэнне ў 1,2 разы ў параўнанні з кантролем. пара-гидроксибензойная кіслата (2,5 ммоль / л) паказала зніжэнне ў 1,4 разы. Ферулавая кіслата (2,5 ммоль / л) паказала зніжэнне ў 1,4 разы. Хлорагенавая кіслата (2,5 ммоль / л) паказала зніжэнне ў 1,2 разы. Кававая кіслата ў канцэнтрацыі 2,5 ммоль / л не выклікала змен у актыўнасці прамотора гена *slyA*, аднак пры павелічэнні канцэнтрацыі кіслаты да 5 ммоль / л экспрэсія рэпарцёра апынулася зніжана ў 1,2 разы ў параўнанні з кантрольнымі значэннямі. Даданне карычнай кіслаты ў канцэнтрацыі 2,5 ммоль / л да асяроддзя культывавання не выклікала дакладных адрозненняў паміж атрыманымі кантрольнымі і дасведчанымі значэннямі. Пры культываванні клетак з расліннымі фенольнымі злучэннямі ў канцэнтрацыі 0,6 ммоль / л было выяўлена, што ні адно з доследных фенольных злучэнняў дакладна не змяніла ўзровень актыўнасці доследнага прамотора.

Экспрэсія прамотора гена *slyA* ў клетак делецыйнага мутанта Δ *slyA*-PsC быў ніжэйшы ў 1,8 разы ў параўнанні са значэннямі, атрычанымі пры культываванні штаму E2-PsC. Замена "пусты" вектарнай плазміды pFLAG-CTC штаму E2-PsC на рэкамбінантныя з копіяй гена *slyA* (pFLAG-CTC-*slyA*, штам E2-PsCs) павысіла доследную прамоторную актыўнасць у 1,4 разы. Гэтыя дадзеныя сведчаць аб актыватарнай ролі *SlyA* ў дачыненні да прамотора ўласнага гена.

Было паказана, што полимиксин В у канцэнтрацыі 1 мкг / мл выклікае павелічэнне праматорнай актыўнасці гена *slyA* ў 1,2 разы.

У канцэнтрацыі 25 ммоль / л перакіс вадароду выклікае зніжэнне выжывальнасці клетак делецыйнага мутанта ў параўнанні з клеткамі дзікага тыпу ў 2 разы, а ў канцэнтрацыях 50 і 100 ммоль / л - спыненне росту клетак мутантавага штаму. Актыўнасць праматора *slyA* у прысутнасці H₂O₂ у канцэнтрацыі 1 ммоль / л павялічылася ў 1,2 разы, у канцэнтрацыі 2 ммоль / л - у 1,4 разы, у канцэнтрацыі 5 ммоль / л - у 1,7 разы.

Замена плазміды pFLAG-CTC на рэкамбінантную плазмідку з копіяй гена *slyA* (pFLAG-CTC-*slyA*) павялічыла актыўнасць доследнага праматора ў клетках делецыйнага мутанта ў 4,2 разы (Δ *slyA*-PyCs), што можа сведчыць аб тым, SlyA становіцца рэгулюе экспрэсію гена *uhcN*, прадукт якога, па-відаць, уцягнуты ў ўстойлівасць клетак *E. amylovora* да акісляльнага стрэсу.

ABSTRACT

Diploma work, 45 pages, 11 figures, 2 tables, 29 sources.

Keywords: *Erwinia amylovora*, bacterial blight, plant phenolic compounds, SlyA, autoregulation, expression regulation.

Object of study: *Erwinia amylovora* E2-pUA66, E2-Ps, E2 Δ slyA-Ps, E2-PsCs, E2 Δ slyA-PsCs, E2-PsC, E2 Δ slyA-PsC, E2-PyC, E2-PyCs, E2 Δ slyA-PyC, E2 Δ slyA-PyCs, *Escherichia coli* DH5 α .

Subject of study: activity of the slyA transcriptional regulator gene promoter.

The aim of the study: to study the regulation of the expression of the gene promoter of the transcriptional regulator SlyA.

Research methods: microbiological (cultivation of microorganisms), statistical, molecular genetic (electrophoresis, polymerase chain reaction, measurement of gene expression levels).

As a result of the study, it was found that salicylic acid at a concentration of 2.5 mmol / l causes an increase in the activity of the *slyA* gene promoter by 1.3 times compared to the control, and at a concentration of 5 mmol / l - by 1.4 times. Vanillic acid at a concentration of 2.5 mmol / l showed a decrease of 1.2 times compared to the control. Para-hydroxybenzoic acid (2.5 mmol / l) showed a decrease of 1.4 times. Ferulic acid (2.5 mmol / l) showed a decrease of 1.4 times. Chlorogenic acid (2.5 mmol / l) showed a decrease of 1.2 times. Caffeic acid at a concentration of 2.5 mmol/l did not cause changes in the *slyA* gene promoter activity, however, with an increase in the acid concentration to 5 mmol/l, the reporter expression was reduced by 1.2 times compared to the control values. The addition of cinnamic acid at a concentration of 2.5 mmol/l to the cultivation medium did not cause reliable differences between the obtained control and experimental values. When culturing cells with plant phenolic compounds at a concentration of 0.6 mmol/l, it was found that none of the studied phenolic compounds significantly changed the activity level of the studied promoter.

Expression of the *slyA* gene promoter in cells of the deletion mutant Δ slyA-PsC was 1.8 times lower than the values obtained when culturing the E2-PsC strain. Replacement of the "empty" pFLAG-CTC vector plasmid of the E2-PsC strain with a recombinant one containing a copy of the *slyA* gene (pFLAG-CTC-*slyA*, E2-PsCs strain) increased the studied promoter activity by 1.4 times. These data indicate the activator role of SlyA with respect to the promoter of its own gene.

It was shown that polymyxin B at a concentration of 1 μ g/ml causes an increase in the promoter activity of the *slyA* gene by 1.2 times.

At a concentration of 25 mmol/l, hydrogen peroxide causes a decrease in the survival of the deletion mutant cells compared to the wild-type cells by 2 times, and at concentrations of 50 and 100 mmol/l - cessation of cell growth of the mutant strain. The activity of the *slyA* promoter in the presence of H₂O₂ at a concentration of 1 mmol/l increased by 1.2 times, at a concentration of 2 mmol/l – by 1.4 times, at a concentration of 5 mmol/l – by 1.7 times.

Replacement of the pFLAG-CTC plasmid with a recombinant plasmid containing a copy of the *slyA* gene (pFLAG-CTC-*slyA*) increased the activity of the studied promoter in the cells of the deletion mutant by 4.2 times (Δ *slyA*-PyCs), which may indicate that SlyA positively regulates the expression of the *yhcN* gene, the product of which is apparently involved in the resistance of *E. amylovora* cells to oxidative stress.