

8. Singh I. P., Mahajan S. Berberine and its derivatives: a patent review // Expert Opinion on Therapeutic Patents. – 2021. – Vol. 31, № 2. – P. 141–156.

9. Zhang Y., Liu X., Wang J., Chen Y. Quality control of herbal syrups using chromatographic methods // Journal of Pharmaceutical Analysis.- 2020. – Vol. 10, № 5. – P. 415-423.

10. Li Z., Wang Y., Chen L., Zhang H. HPLC determination of isoquinoline alkaloids in Berberis species // Journal of Chromatography A. – 2022. – Vol. 1671. – P. 462–470.

УДК: 577.21: 57.052: 579.6

А. И. Левданская, ст. преп.,  
Т. В. Герасимова, стажер мл. научн. сотр., Е. О. Дымар, студ.,  
А. Д. Козловская, студ. (БГУ, Минск)

**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В МЕЖГЕННЫХ ОБЛАСТЯХ  
БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP.  
*AURANTIACA* В-162 НА СВЕРХСИНТЕЗ  
ФЕНАЗИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

Бактерии *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162 являются продуцентами феназинов - азотсодержащих гетероциклических соединений, свойства которых обусловлены присутствием и расположением в этих соединениях различных функциональных групп. Они используются в сельском хозяйстве (в качестве антимикробных агентов), медицине (как антифунгальные и противоопухолевые средства). Благодаря их способности к переносу электронов перспективно использование феназинов в биосенсорных технологиях [1].

На основе штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162 дикого типа (номер доступа CP050510.1) был получен, штамм-сверхпродуцент *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162/17, который способен продуцировать феназиновые соединения на минимальной среде в отличие от бактерий дикого типа [2]. Сравнительный анализ геномов этих бактерий не показал наличия значимых мутаций в генах, напрямую связанных с синтезом феназиновых соединений у данных штаммов. Однако была найдена потенциально значимая мутация в межгенной области (координаты 3443576 – 3443752 п.н.), расположенной между генами, экспрессирующими АВС-транспортер пермеазы и флаavin-зависимую оксидоредуктазу класса LLM [3].

С помощью программы Sigmoid был проведен скрининг всего генома *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162 и предсказано располо-

жение в данной области регуляторных последовательностей, способных влиять на транскрипцию генов этих бактерий. Наиболее правдоподобными оказались два сайта, общие паттерны которых имели сходство с областями связывания для регуляторных белков LuxR и TetR семейств. После чего были предсказаны координаты генов, кодирующих регуляторные белки вышеуказанных семейств, предположительно способные связываться с данными областями.

Было выяснено, что последовательность гена, кодирующая белок, относящийся к регуляторным белкам LuxR-семейства, который сможет связаться с данной областью, находится на координатах 2512879 – 2513526. С данной области считывается белок, который определяется программами аннотации как двухкомпонентный транскрипционный регулятор ответа семейства LuxR. Данный белок содержит 215 аминокислот и имеет молекулярную массу 23,8 кДа. В литературе описано, что семейство LuxR - широко распространенное среди прокариот семейство белков-регуляторов транскрипции, принимающих участие в чувстве кворума микроорганизмов. Большинство белков-регуляторов данного семейства - активаторы транскрипции, некоторые белки - репрессоры. Белки LuxR работают совместно с белками LuxI семейства (система LuxR/ LuxI) [4].

Последовательность гена, кодирующая белок, относящийся к регуляторным белкам TetR-семейства, который сможет связаться с данной областью, находится на координатах 2349392 – 2350156. С данной области считывается белок, который определяется программами аннотации как активатор транскрипции оперона, отвечающего за утилизацию гликоната GlcC. По литературным данным, регулятор GlcC относится к регуляторам TetR семейства. Данный белок содержит 254 аминокислоты и имеет молекулярную массу 28,4 кДа. Семейство TetR - широко распространенное семейство регуляторов транскрипции, контролирующие гены, продукты которых вовлечены в устойчивость к широкому спектру антибиотиков, а также являются ферментами, участвующими в катаболических путях, биосинтезе антибиотиков, осмотическом стрессе, а также регулируют гены чувства кворума. Члены семейства TetR в основном являются репрессорами транскрипции, но некоторые представители выполняют функцию активаторов. Для того чтобы стать функционально активными члены данного семейства должны связаться со специфическими лигандами, после чего белки мультимеризуются, и в такой форме они распознают гены-мишени на ДНК [5].

Для выяснения, какой из отобранных белков связывается с данной межгенной областью необходимо было создать специальные ге-

нетические конструкции. Для начала изучаемую межгенную область необходимо было клонировать в специальный вектор pUA66, содержащий ген устойчивости к канамицину. Особенностью данного вектора является наличие в его составе последовательности, кодирующей белок GFP (от англ. green fluorescent protein). При встраивании последовательностей, содержащих регуляторные участки, в область перед последовательностью данного белка происходит экспрессия GFP, что может свидетельствовать о наличии регуляторных областей во встраиваемой последовательности. Так как исследуемая межгенная область в геноме *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 находится между последовательностями, кодирующими ABC-транспортную пермеазу и флавин-зависимую оксидоредуктазу класса LLM, и их рамки считывания направлены в разные стороны, то и регуляторные участки, расположенные в этой межгенной области могут индуцировать транскрипцию данных генов в обе стороны. Следовательно, необходимо проверить обе ориентации данного участка в составе вектора pUA66. Для этого были выбраны два сайта рестрикции BamHI и XhoI, благодаря которым ориентацию вставки можно будет контролировать.

Для получения межгенной области в двух разных ориентациях были разработаны следующие праймеры:

Межгенная область ориентация 1:

Прямой праймер – **CGGATCCTCCTTCCTCATCAAGCC** (жирным шрифтом выделена навеска сайта рестрикции BamHI);

Обратный праймер – **CCTCGAGCAAAGGGCGTTGGTC** (жирным шрифтом выделена навеска сайта рестрикции XhoI).

Межгенная область ориентация 1:

Прямой праймер – **CCTCGAGTCCTTCCTCATCAAGCC** (жирным шрифтом выделена навеска сайта рестрикции XhoI);

Обратный праймер – **CGGATCCCAAAGGGCGTTGGTC** (жирным шрифтом выделена навеска сайта рестрикции BamHI).

В результате были получены 2 ПЦР-продукта (размер 190 п.о.), содержащие межгенную область, которые, после проведения рестрикции двумя ферментами были залигированы в вектор pUA66 и далее с использованием трансформации с применением CaCl<sub>2</sub> полученные генетические конструкции были клонированы в бактерии *Escherichia coli* DH5α.

Параллельно были созданы ещё две генетические конструкции, необходимые для осуществления экспрессии генов, кодирующих регуляторные белки LuxR и TetR семейств.

Для корректной вставки генов, кодирующих белки-регуляторы были выбраны сайты рестрикции NdeI и XhoI. Для получения ПЦР-



3. Genome analysis of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* mutant strains with increased production of phenazines / A.I. Liaudanskaya, P.V. Vychik, N.P. Maximova, K.G. Verameyenka // Archives of Microbiology. – 2022. - 204:247. – 10 p.

4. Nasser, W. New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators / W. Nasser, S. Reverchon // Anal Bioanal Chem. – 2007. – Vol. 387, № 2. – P. 381–390.

5. Cuthbertson, L. The TetR family of regulators / L. Cuthbertson, J.R. Nodwell // Microbiol Mol Biol Rev. – 2013. – Vol. 77, № 3. – P. 440–475.

УДК 579.22:579.26:579.69

Л. А. Жуковская, доц., канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

(Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск);

С. Шульга, студ. (Белорусский государственный университет, г. Минск);

Т. В. Семашко, доцент, канд. биол. наук, зав. лаб.

(Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск)

### **ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ОСНОВНЫХ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗИТЕЛЕЙ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ ГОРОДСКИХ ТЕРРИТОРИЙ**

Почвы городских территорий представляют собой сложные и уникальные системы, которые испытывают влияние различных стрессовых факторов, существенно ухудшающих их качество. В связи с концентрацией производственных мощностей города, неуклонным ростом населения и, как следствие этого, количества транспорта, сельскохозяйственных работ, а также хозяйственно-бытовой деятельности человека в почве происходит аккумуляция большого количества техногенных загрязнителей [1].

Преобразование и обезвреживание вредных веществ в почве зависит от состояния микробных сообществ почв. Микроорганизмы наиболее чутко реагируют на изменение окружающих условий. Изменения в составе почвы приводят к существенным изменениям родового и видового состава микроорганизмов. Отдельные группы микроорганизмов способны адаптироваться в определенных условиях среды обитания и противостоять токсичному воздействию загрязнителей [2].

*Цель работы* – оценить влияние основных техногенных загрязнителей на рост и развитие бактериальных изолятов, выделенных из почв городских территорий.