

КЛОНИРОВАНИЕ *rpoE*- КЛАСТЕРА У *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*

Л.Н. Валентович

Научный руководитель – к.б.н. Е.А. Николайчик
Белорусский государственный университет

К настоящему времени получены данные, которые свидетельствуют о том, что σ^E сигма-фактор (*RpoE*) РНК-полимеразы патогенов животных влияет на их вирулентные свойства. Чтобы изучить аналогичное влияние у фитопатогенных бактерий, был выбран модельный объект *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* JN42. Род *Erwinia* (семейство *Enterobacteriaceae*) представлен грамотрицательными палочковидными факультативно-анаэробными бактериями. Бактерии *Erwinia carotovora* являются фитопатогенами, вызывающими возникновение мягких гнилей у широкого спектра растений, вызываемые ими заболевания причиняют значительный ущерб производству сельскохозяйственной продукции.

Целью проведённой работы была идентификация и клонирование фрагмента ДНК у *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* содержащего гены *rpoE*, *rseA*, *rseB*, а также установление его нуклеотидной последовательности. Гены *rseA* и *rseB* входят в один оперон с *rpoE* и кодируют белки-регуляторы σ^E сигма-фактора.

Используя препарат тотальной ДНК из *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* JN42, с помощью ПЦР удалось амплифицировать фрагмент ДНК, содержащий *rpoE*, *rseA*, и часть *rseB* гена. Праймеры для ПЦР были сконструированы, на основе информации из базы данных нуклеотидных последовательностей (Gene Bank; EMBL Data library).

Условия для амплификации были подобраны экспериментально. Правильность амплификации проверяли при электрофорезе продуктов ПЦР.

Амплифицированный фрагмент ДНК был встроен в вектор pUC18 по сайтам *XbaI* - *SacI* и клонирован в штамме *Escherichia coli* XL1-Blue.

Для установления нуклеотидной последовательности *rpoE*, *rseA* и *rseB* генов *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* JN42 был получен препарат плазмидной ДНК.

Установления нуклеотидной последовательности ДНК производилось методом терминации цепей, используя двухцепочечные матрицы (pUC18 плазида с клонированными фрагментами ДНК). В качестве праймеров служили универсальный M13-праймер и M13-обратный праймер.

Клонированный фрагмент ДНК у *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* содержащий гены *rpoE*, *rseA*, *rseB* имеет протяжённость ≈ 500 п.н., поэтому удалось определить нуклеотидную последовательность ≈ 500 п. н. с каждой из сторон клонированного фрагмента.

Гомология полученной нуклеотидной последовательности *rpoE* с *rpoE*-геном *Yersinia enterocolitica* составляет 82%, *Yersinia pestis* составляет 81%, *Salmonella typhimurium* - 80%, *Escherichia coli* - 80%. (с 26-го по 388-й нуклеотид; данные полученные с помощью BLASTN 2.2.5)

В дальнейшем планируется решить следующие задачи:

1. Полностью установить нуклеотидную последовательность *rpoE*, *rseA* и *rseB* генов *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* JN42.

2. Поставить фрагмент ДНК содержащий гены *rpoE*, *rseA*, *rseB* под промотор в pUC19 и инактивировать *rpoE* ген, тем самым получить сверхэкспрессию гена *rseA*. Получившейся плазмидой трансформировать *Erwinia carotovora* для изучения фенотипических проявлений.

3. Поставить фрагмент ДНК содержащий гены *rpoE*, *rseA*, *rseB* под промотор в pUC19 и инактивировать *rseA* ген, тем самым получить сверхэкспрессию гена *rpoE*. Получившейся плазмидой трансформировать *Erwinia carotovora* для изучения фенотипических проявлений.

4. Инактивировать хромосомные копии генов *rpoE* и *rseA* *Erwinia carotovora* – и изучить фенотип полученных мутантов.