

СЕКРЕЦИЯ ХАРПИНА HrpW АППАРАТОМ СЕКРЕЦИИ III ТИПА БАКТЕРИЙ ERWINIA CAROTOVORA SUBSP. ATROSEPTICA 3-2

А.Л. Лагоненко

Научный руководитель – д.б.н., профессор *А.Н. Евтушенко*
Белорусский государственный университет

Бактерии *Erwinia carotovora subsp. atroseptica (E.c.a.)* - широко распространенные в умеренной зоне фитопатогены, вызывающие заболевание «черная ножка» у многих сортов картофеля. Наряду с большим количеством гидролитических ферментов, этот микроорганизм продуцирует особые белки патогенности – Avr и харпины. Эти белки переносятся из бактериальной клетки в растение через систему секреции III типа (ССТТ). Целью данной работы является выяснение способности белка HrpW секретироваться через ССТТ бактерий *E.c.a.*

На первом этапе нами был амплифицирован участок хромосомы *E.c.a.* размером 1,5 т.п.н. с праймерами, синтезированными под ген *hrpW* (HrpW1 и HrpW2), клонирован на мультикопийном векторе pUC18, после чего была определена его нуклеотидная последовательность, которая соответствовала гену *hrpW E.c.a.* SCRI (Blast database).

На втором этапе работы было осуществлено переклонирование *hrpW* на вектор цитоплазматической экспрессии pFLAG-CTC (Sigma) под Lac-индуцируемый промотор. В результате была получена конструкция, позволяющая экспрессировать в бактериальной клетке химерный HrpW-FLAG белок при индукции IPTG. Следует отметить, что FLAG-пептид (состоит из восьми аминокислот) пришивали с карбокси конца HrpW, оставляя неизменным N-концевой секреторный домен изучаемого белка. Затем полученной рекомбинантной плазмидой трансформировались клетки штамма дикого типа *E.c.a. 3-2*. Трансформанты выращивались в hrp-индуцирующей среде (минимальная глицериново-солевая среда с лимитом по источнику азота, pH=6,0) с целью повышения уровня экспрессии генов аппарата секреции III типа и добавлением IPTG для индукции плазмидного промотора. Белки клеток и культуральной жидкости разделяли электрофорезом по Лэмбли. Наличие HrpW в клетках и супернатанте определяли иммунологически методом вестерн-блоттинга. Для детекции белка использовали анти-FLAG M2 антитела (Sigma).

В результате проделанной работы нами было показано, что харпин HrpW секретировался из бактериальной клетки в культуральную жидкость при условии индукции системы секреции III типа. Планируется провести исследования по выявлению функции данного белка у бактерий *E.c.a.*

ВЛИЯНИЕ ГЕНА *hrpL* НА экспрессию гена *hrpJ* БАКТЕРИЯМИ *ERWINIA CAROTOVORA SUBSP. ATROSEPTICA*

Т.В. Овчинникова

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

Бактерии *Erwinia carotovora subsp atroseptica (Eca)*, как и некоторые другие фитопатогены, обладают системой секреции III типа (TTSS), служащей для направленной доставки эффекторных белков в межклеточное пространство и клетки эукариотического организма. Большинство белков, транспортируемых с помощью TTSS, способствуют колонизации растения фитопатогеном, но некоторые секретируемые белки выполняют вспомогательную функцию и их роль в развитии заболевания не совсем ясна. К последней группе секретируемых белков относится белок HrpJ.

Гены, кодирующие компоненты системы секреции III типа, обычно располагаются кластером и регулируются координировано. Экспрессия генов *hrp*-кластера, кодирующего систему секреции III типа у *Erwinia*, происходит при наличии в клетке альтернативного сигма-фактора HrpL. Белок HrpL является конечным звеном регуляторного каскада, и поскольку до сих пор