

**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики**

СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ**

**Для студентов IV курса
специальности 1-31 01 01 «Биология»
(направление 1-31 01 01-03 «Биотехнология»)**

**МИНСК
2008**

УДК 579.66(075.5)
ББК 30.16р.я73
С29

Авторы – составители:
Е. А. Храмцова, Н. П. Максимова

Рекомендовано Ученым советом
биологического факультета
26 сентября 2008 г., протокол № 2

Рецензент
кандидат биологических наук, доцент *Т. В. Кукулянская*

Селекция продуцентов: метод. указания к лаб. работам / авт.-
С29 сост. : Е. А. Храмцова, Н. П. Максимова. – Минск : БГУ, 2008. – 13 с.

Методические указания к лабораторным занятиям по курсу «Селекция продуцентов» предназначены для студентов IV-го курса специальности 1-31 01 01 «Биология» (направление 1-31 01 01-03 «Биотехнология»).

УДК 579.66(075.5)
ББК 30.16р.я73

© БГУ, 2008

ВВЕДЕНИЕ

Природные штаммы микроорганизмов, как правило, не способны выделять и накапливать в питательной среде значительное количество аминокислот, поскольку биосинтез этих соединений в клетке подвержен строгой и четкой регуляции. Микроорганизмы синтезируют такое количество первичных метаболитов, которое необходимо для роста и деления клетки. Для использования штамма микроорганизма в качестве продуцента эта регуляция должна быть изменена таким образом, чтобы использовать биосинтетический аппарат клетки для получения максимального количества необходимого метаболита.

Методы получения продуцентов аминокислот обычно основаны на использовании структурных аналогов естественных метаболитов.

Отбор аналогрезистентных мутантов — один из широко применяемых и эффективных методов получения и улучшения штаммов продуцентов первичных метаболитов. Структурные аналоги действуют на регуляторные системы биосинтеза подобно природному метаболиту, но не могут выполнить основной функциональной роли этого метаболита в клетке. Так, аналог аминокислоты имитирует ее избыток в среде вызывая репрессию и ингибирование, но при этом не может заменить аминокислоту функционально, т.е. не способен включиться в белок или, включаясь, приводит к образованию дефектных белков, вызывая в обоих случаях голодание клетки по природной аминокислоте и останавливая рост.

Например, в селекции продуцентов триптофана широко применяют его структурные аналоги: метил-триптофан, ацетилтриптофан, D-триптофан и др. Эти соединения воспринимаются регуляторными системами клетки как ретроингибиторы или корепрессоры, однако они не могут заменить триптофан функционально. Поэтому на минимальной среде, содержащей аналог триптофана, выживают и растут лишь те мутанты, у которых нарушена негативная регуляция биосинтеза триптофана, что приводит к его сверхсинтезу. Такие мутанты называют **регуляторными**.

Типичными мутационными нарушениями, приводящими к сверхсинтезу аминокислот у аналогрезистентных мутантов, являются:

- утрата чувствительности регуляторного фермента к ретроингибированию,
- нарушение механизма репрессии его синтеза, что обеспечивает конститутивный синтез продукта.

Триптофан – один из важнейших предшественников вторичных метаболитов ароматической природы, синтезируемых клеткой. Одним из них является индол-3-уксусная кислота (ИУК). Одним из путей повышения выхода ИУК является использование регуляторных мутантов, способных к сверхпродукции триптофана, а, следовательно, и ИУК.

Целью лабораторных занятий по курсу «Селекция продуцентов» является получение аналогорезистентных мутантов бактерий *P. mendocina* ВКМВ1299, продуцирующих в питательную среду триптофан и индол-3-уксусную кислоту.

При получении аналогорезистентных мутантов бактерий *P. mendocina* ВКМВ1299 необходим отбор из шести различных токсических аналогов триптофана наиболее эффективного. Затем, будет проведен мутагенез этих бактерий для получения регуляторных мутантов, устойчивых к наиболее эффективному аналогу триптофана. На заключительном этапе работы будет проведено изучение продукции триптофана и индолил-3-уксусной кислоты у отобранных аналогорезистентных мутантов.

ЗАДАЧА 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ ТРИПТОФАНА НА РОСТ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS MENDOCINA*

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определение степени токсического действия различных аналогов триптофана (NL-ацетил-DL-триптофан, DL-5-фтор-триптофан, D-триптофан, L-триптофан-метиловый эфир гидрохлорида, 5-метил-триптофан и α -метил-триптофан) на клетки *P. mendocina* по отсутствию роста бактерий в зоне диффузии аналога.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Стерильные пробирки, стерильные пипетки, стерильные чашки Петри, шпатели, спиртовки, торсионные весы, термостат.

ШТАММЫ И РЕАКТИВЫ

Ночная культура бактерий *P. mendocina* ВКМВ1299, водный агар, солевой концентрат (М9), растворы 0,1 моль $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и 0,01 моль $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 20% глюкозы, аналоги триптофана.

ХОД РАБОТЫ

1. Разливают 7 чашек Петри с минимальной агаризованной средой, содержащей глюкозу, из расчета 1 чашка на один токсический аналог + 1 чашка без аналога (контроль).
2. 0,1 мл ночной культуры *P. mendocina*, высевают газоном на хорошо высушенные чашки Петри с минимальной агаризованной средой.
3. В центр опытных чашек помещают навеску аналога (около 2 мг). В контрольные чашки аналог не вносят.
4. Чашки помещают в термостат (крышкой вверх) и инкубируют при 37° С в течение 24 ч. Затем чашки переворачивают и продолжают инкубацию при тех же условиях еще 48 ч.
5. Определяют степень токсического действия различных аналогов триптофана на клетки *P. mendocina* по величине зоны задержки роста бактерий в зоне диффузии аналога (табл. 1).

Зона задержки роста бактерий <i>P. mendocina</i> при выращивании на среде с аналогом (см)						Без аналога
NL-ацетил-DL-триптофан	DL-5-фтор-триптофан	D-триптофан	L-триптофан-метилловый эфир гидрохлорида	5-метил-триптофан	α -метил-триптофан	

6. Отбор из шести различных токсических аналогов триптофана наиболее эффективного.

ЗАДАЧА 2

ПОЛУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МУТАНТОВ *P. MENDOCINA* ВКМВ 1299, УСТОЙЧИВЫХ К ТОКСИЧЕСКИМ АНАЛОГАМ ТРИПТОФАНА

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Получение с использованием НГ-мутагена мутантов бактерий *P. mendocina* с нарушенной регуляцией синтеза триптофана.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Термостат, качалка, центрифуга, весы, стерильные колбочки (50 мл), пробирки эппендорф, стерильные пипетки, автоматические пипетки со стерильными насадками, стерильные чашки Петри, спиртовки, шпатели, стерильные центрифужные пробирки, дозаторы, стерильные наконечники.

ШТАММЫ И РЕАКТИВЫ

Культура бактерий *P. mendocina* ВКМВ1299 в логарифмической фазе роста, физиологический раствор, нитратный буфер (рН 5,5), раствор нитрозогуанидина (500 мкг/мл), питательный агар, питательный бульон, минимальный агар, солевой концентрат (М9), растворы 0,1 моль $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и 0,01 моль $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 20 % глюкозы, аналога триптофана.

ХОД РАБОТЫ

1. В 2 мл культуры *P. mendocina* ВКМВ1299 в логарифмической фазе роста центрифугируют при 4000 об/мин в течение 2 мин.
2. Клетки отмывают дважды физиологическим раствором с помощью центрифугирования в течение 2 мин при 4000 об./мин.
3. Осадок ресуспендируют в 0,4 мл цитратного буфера (рН 5,5) и разливают по 0,2 мл в две пробирки опытную и контрольную
4. В контрольную пробирку вносят 0,05 мл цитратного буфера, а в опытную - 0,05 мл НГ (в конечной концентрации 100 мкг/мл).
5. Пробирки выдерживают в термостате при 37°C в течение 30 мин.

6. Из каждой пробирки отбирают пробы по 0,1 мл и осуществляют серию разведений в физиологическом растворе.
7. Пробы из соответствующих разведений высевают на чашки с полноценным агаром в двойном повторе и инкубируют 24 ч при 37° С для определения выживаемости клеток.
8. Культуру из опытной пробирки центрифугируют при 4000 об/мин в течение 2 мин и дважды отмывают физиологическим раствором от мутагена.
9. Клетки ресуспендируют в 0,5 мл питательного бульона и инкубируют в течение 1,5 ч с аэрацией при 37 °С.
10. Культуру центрифугируют и отмывают от бульона физиологическим раствором дважды.
11. Клетки ресуспендируют в 0,1 мл физиологического раствора и высевают газоном на чашки с минимальным агаром.
12. В центр чашки помещают навеску токсического аналога триптофана, который был отобран на предыдущем занятии как наиболее эффективный.
13. Чашки инкубируют при 37° С в течение 72 ч.
14. Выросшие в зоне токсического действия аналога клоны пересевают штрихом на чашки с полноценным агаром и инкубируют в течение 24 ч при 37° С.

ЗАДАЧА 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ ТРИПТОФАНА РЕГУЛЯТОРНЫМИ МУТАНТАМИ *P. MENDOCINA*

Уровень продукции триптофана клетками регуляторных мутантов бактерий можно определить как биологическим (ауксонографическим), так и химическим способом. Биологический способ определения является качественным и позволяет судить о наличии продукции данной аминокислоты. Сущность данного метода заключается в способности регуляторных мутантов, продуцирующих триптофан, поддерживать рост клеток индикаторного штамма, дефектного по синтезу данной аминокислоты. Биологический тест проводят на минимальной агаризованной среде с глюкозой, используя технику полужидкого агара и посева "медальонами".

Химический метод определения триптофана позволяет зарегистрировать количество продуцируемого триптофана. Метод основан на проведении химической реакции с парааминобензальдегидом и последующей спектрофотометрической регистрацией образующегося продукта. С использованием калибровочной кривой определяют количество триптофана в мкг/мл.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Качественное и количественное определение продукции триптофана регуляторными мутантами *P. mendocina*.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Стерильные чашки Петри, стерильные пипетки, шпатели, спиртовки, термостат, стерильные металлические шпильки, водяная баня.

ШТАММЫ И РЕАКТИВЫ

Культуры регуляторных мутантов *P. mendocina* ВКМВ1299, ночная культура индикаторного штамма *P. mendocina* В9, физиологический раствор, солевой концентрат (М9), растворы 20 % глюкозы, 0,1 моль $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и 0,01 моль $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, водный агар, стерильная дистиллированная вода, 0,5 % раствор р-аминобензальдегида, 0,1 % раствор $NaNO_2$.

ХОД РАБОТЫ

1. Качественное определение продукции триптофана клетками регуляторных мутантов бактерии *P. mendocina*.

1. Стерильные чашки Петри заливают тонким слоем минимальной агаризованной среды (1,5 % агара) с глюкозой. Чашки хорошо просушивают.
2. 10 мл ночной культуры индикаторного штамма *P. putida* М В9 центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин и дважды отмыывают в физиологическом растворе.
3. Процедуру повторяют дважды и ресуспендируют клетки в 5 мл физиологического раствора
4. Добавлением стерильной дистиллированной воды в 1,5 % водный агар готовят полужидкий (0,7 %) агар, сохраняя его температуру на водяной бане в пределах 45-49 °С.
5. Суспензию клеток индикаторного штамма вносят в полужидкий агар, размешивают и заливают тонким слоем поверх базового слоя.
6. После застывания двухслойного агара стерильными металлическими шпильками на поверхность агара «медальонами» засевают регуляторные мутанты *P. mendocina* отобранные на предыдущем занятии и бактерии дикого типа в качестве контроля.
7. Чашки инкубируют 24-48 ч при 28 °С и просматривают на наличие зон роста.
8. Появление зоны роста индикаторного штамма вокруг регуляторного мутанта *P. mendocina* свидетельствует о сверхсинтезе триптофана данным штаммом.
9. Отбирают штаммы, которые способны к сверхсинтезу триптофана и отсевают их в жидкую минимальную среду для количественного определения триптофана.

2. Количественное определение продукции триптофана клетками регуляторных мутантов бактерий *P. mendocina*.

1. К 1 мл культуральной жидкости регуляторного мутанта *P. mendocina* добавляют 3 мл 0,5 % раствора р-аминобензальдегида. Смесь встряхивают и выдерживают 15 мин при комнатной температуре.
2. В смесь вносят 0,25 мл 0,1 % раствора NaNO_2 , встряхивают и выдерживают 10 мин при комнатной температуре.
3. Измерение проводят на спектрофотометре при длине волны 660

нм.

4. С использованием калибровочной кривой определяют количество триптофана (мкг/мл) присутствующего в культуральной жидкости мутанта.

Продукция триптофана аналогорезистентными мутантами *P. mendocina*

Штаммы <i>P. mendocina</i>	Продукция триптофана (мкг/мл)
Дикий тип	-

ЗАДАЧА 4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ РЕГУЛЯТОРНЫМИ МУТАНТАМИ *P. MENDOCINA*

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Качественное и. количественное определение продукции триптофана регуляторными мутантами *P. mendocina*.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Стерильные пробирки, стерильные пипетки, стерильные чашки Петри, центрифуги, центрифужные пробирки, спектрофотометр СФ-46

ШТАММЫ И РЕАКТИВЫ

Культуры регуляторных мутантов *P. mendocina* ВКМВ1299, реактив Сальковского.

ХОД РАБОТЫ

1. Клетки бактерий выращивали с аэрацией в течение 36 - 48 часов в среде РС, дополненной дрожжевым экстрактом (0,25 %) при 30 °С.
2. клетки осаждали центрифугированием.
3. К культуральной жидкости добавляли реактив Сальковского.
4. Интенсивность окрашивания образцов определяли через 1 час на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 525 нм.
5. Количество ИУК определяли по калибровочной кривой.

Продукция ИУК регуляторными мутантами *P. mendocina*

Штаммы <i>P. mendocina</i>	Продукция ИУК (мкг/мл)
	-

СОДЕРЖАНИЕ

Задача 1. Определение токсического действия структурных аналогов триптофана на рост бактерий <i>Pseudomonas mendocina</i>	5
Задача 2. Получение регуляторных мутантов <i>P. mendocina</i> , устойчивых к токсическим аналогам триптофана.....	7
Задача 3. Определение уровня продукции триптофана регуляторными мутантами <i>P. mendocina</i>	9
Задача 4. Определение уровня продукции индолил-3-уксусной кислоты регуляторными мутантами <i>P. mendocina</i>	12

Учебное издание

СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ**

**Для студентов IV курса
специальности 1-31 01 01 «Биология»
(направление 1-31 01 01-03 «Биотехнология»)**

А в т о р ы – с о с т а в и т е л и
Храмцова Елена Аркадьевна
Максимова Наталья Павловна

В авторской редакции

Ответственный за выпуск *Е. А. Храмцова*

Подписано в печать 21.10.2008. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. 0,7. Уч.-изд. л. 0,44. Тираж 50 экз. Зак.

Белорусский государственный университет.
ЛИ № 02330/0056804 от 02.03.2004.
220030, Минск, проспект Независимости, 4.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика
на копировально-множительной технике
биологического факультета
Белорусского государственного университета
220064, Минск, ул. Курчатова, 10.