



Династия

# Полногеномное секвенирование природной плазмиды *Escherichia coli*

Лаборатория Молекулярной Генетики Микроорганизмов

## Цель

Определить последовательность и аннотировать природную плазмиду *E.coli*, содержащую оперон микроцина Б.

## Введение

Микроцин Б – пептидный антибиотик, ингибирующий ДНК-гиразу прокариот. Природный штамм *E. coli*, продуцирующий микроцин Б, был выделен в конце 70-х годов. В этом штамме была обнаружена плаزمида длиной более 70 т. п. н., содержащая микроциновый оперон, состоящий из 7 генов (*mcbABCDEFGHI*). Для дальнейшего изучения оперон микроцина Б был клонирован в небольшой вектор, а исходная плазмиды была забыта. Биосинтез и механизм действия микроцина Б изучены достаточно хорошо, чего нельзя сказать о его происхождении. Анализ последовательности позволит пролить свет на происхождение как самой плазмиды, так и микроцинового оперона.

## Ход работы

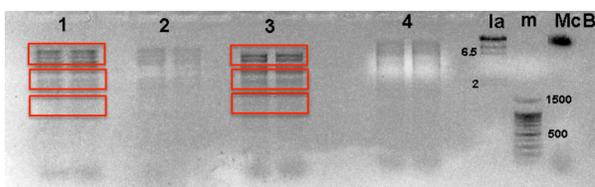
### Экспериментальная часть:

- Рестрикция плазмиды pS2 рестриктазами EcoRI-HindIII и BamHI-BglIII-EcoRI, очистка фрагментов ДНК из геля, лигирование с вектором pBlueScript
- Трансформация компетентных клеток лигазной смесью, сине-белая селекция, проверка вставок с помощью ПЦР, очистка ПЦР фрагментов
- Посев ночных культур клеток, выделение плазмид
- Отправка очищенных ПВР фрагментов и выделенных плазмид на секвенирование по Сэнгеру, отправка плазмиды pS2 на Illumina MiSeq

### Биоинформатическая часть:

- Анализ сиквенсов (по Сэнгеру) с помощью программы Chromas
- Сборка контигов в программе SeqMan
- Анализ ридов с Illumina, сборка контигов программой CLC Genomics и SeqMan
- Аннотирование генов полученных контигов при помощи ORF Finder, BLAST и Artemis
- Биоинформатический анализ транспозонов с помощью IS finder

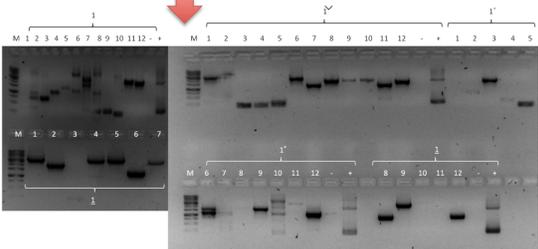
## Результаты



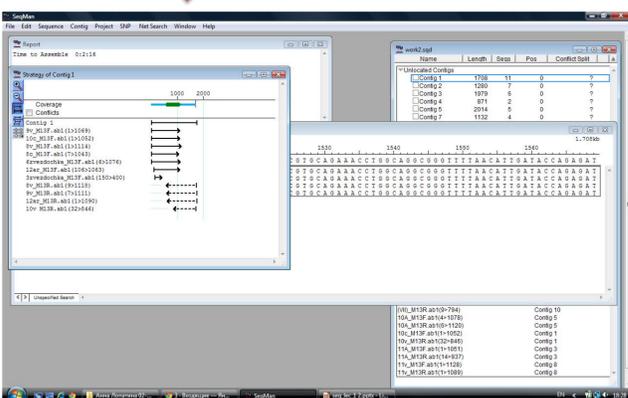
Гидролиз плазмиды наборами рестриктазами HindIII-EcoRI и BamHI-BglIII-EcoRI, очистка фрагментов из геля после рестрикции



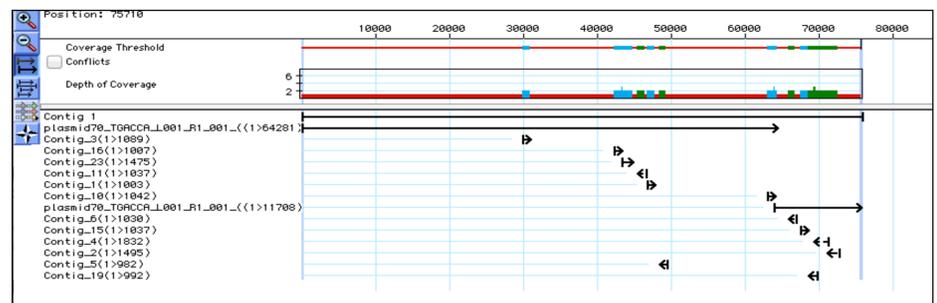
Сине-белая селекция



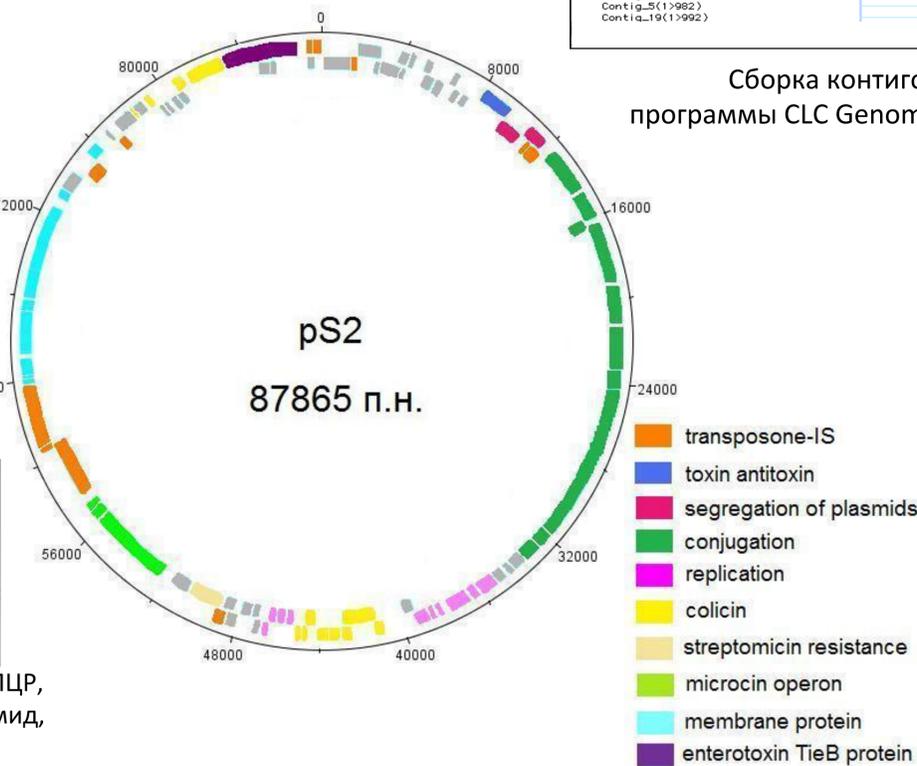
Проверка вставок в плаزمиды с помощью ПЦР, очистка ПЦР фрагментов и выделение плазмид, отправка образцов на секвенирование



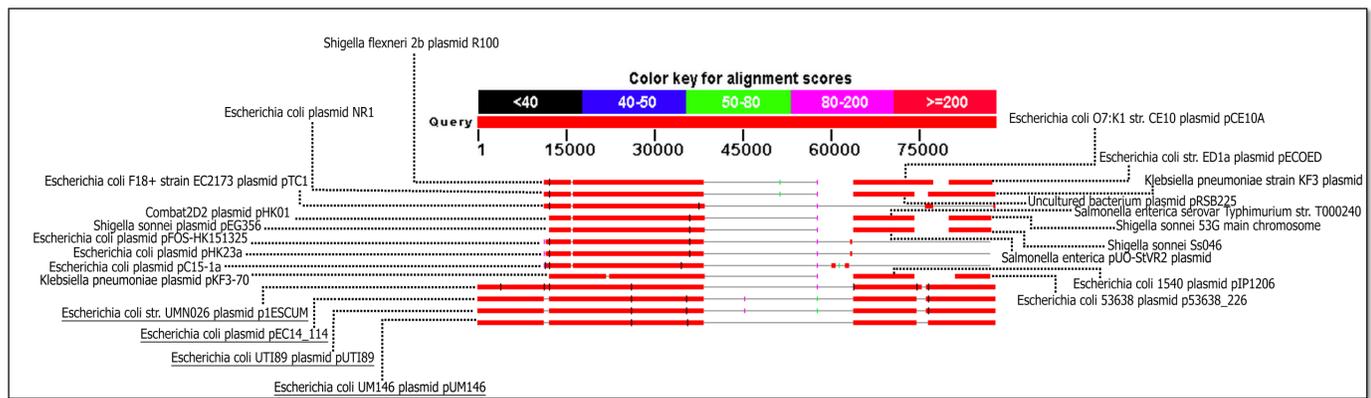
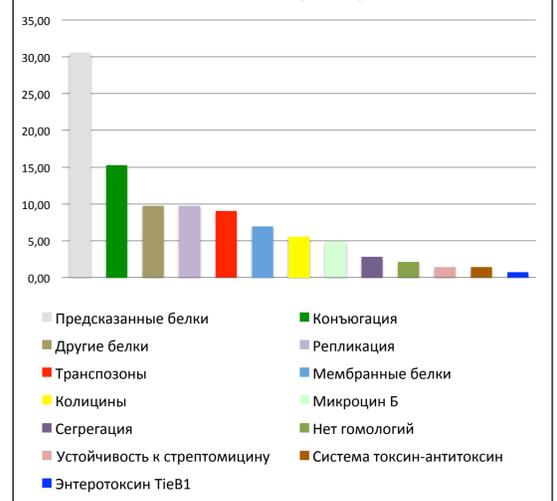
Сборка контигов в программе SeqMan



Сборка контигов, полученных на Illumina MiSeq с помощью программы CLC Genomics Workbench с последующим наложением контигов в Lasergene SeqMan



### Функциональная аннотация белков (NGS)



Анализ полногеномной последовательности плазмиды pS2 методом сравнения с базой данных GeneBank (Blastn method)

## Участники

Аня Ергемлидзе  
Ира Мартюшева  
Лейла Керимова  
Катя Мищенко  
Настя Стрюк  
Саша Чевгунова  
Сережа Стариков  
Таня Бессонова



Аня Лопатина  
Миша Метелев  
Инна Зухер  
Даша Лавыш  
Леша Куликовский

## Выводы

- Сборка полной последовательности плазмиды требует дополнительного секвенирования шагающими праймерами для уточнения порядка собранных контигов.
- Аннотация генома выявила наличие на плазмиде генов антибактериальных токсинов (микроцин, несколько типов колицинов), а также генов устойчивости к стрептомицину.
- Выше рамки считывания микроцинового оперона вплотную находится транспозон Tn3, что позволяет нам строить гипотезы об участии этого транспозона в возникновении оперона микроцина Б.