

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии**

ЧУБАНОВА
Сабина Владимировна

**ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ДНК-ЛИГАЗЫ
БАКТЕРИОФАГА T4 В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI***

АННОТАЦИЯ
к дипломной работе

Научный руководитель:
Зав. лаб. «Центр аналитических и генно-инженерных исследований»
Государственного научного учреждения
Институт микробиологии НАНБ,
кандидат биологических наук
Л.Н. Валентович

Минск, 2014

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 64 с., 16 рис., 5 табл., 47 источников.

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*, ДНК-ЛИГАЗА БАКТЕРИОФАГА Т4.

Объект исследования: клетки бактерий *E.coli* – экспрессионные штаммы: BL21(DE3), Tuner™(DE3)pLysS, Rosetta™(DE3)pLysS, XL1-Blue – предоставлены лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» Института микробиологии НАНБ.

Цель работы: получение в условиях минимизации затрат ферментного препарата ДНК-лигазы бактериофага Т4, характеризующегося функциональной активностью уровня, достаточного для использования в рутинных генно-инженерных экспериментах.

Методы исследования: биохимические, микробиологические, молекулярно-генетические.

В результате работы был получен ферментный препарат ДНК-лигазы бактериофага Т4, характеризующийся функциональной активностью уровня, достаточного для использования в рутинных экспериментах, в частности, молекулярном клонировании и трансформации микроорганизмов. Было выделено около 2,5 мл ферментного препарата со 150 мл культуральной жидкости (концентрация белка около 6 мг\мл). В рамках выполнения основной задачи настоящей работы была проведена оптимизация условий наработки целевого фермента: подобрана экспрессионная система, выбраны параметры среды, подходящие для проведения индукции экспрессии гена интересующего нас продукта, его очистки. Наиболее подходящими для наработки интересующего нас белка условиями были выбраны следующие: *E. coli* BL21(DE3) [pET42a(+)*ligT4*], концентрация индуктора ИПТГ 0,08 мМ, время индукции: 3 часа, температура: 37 °С.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 64 с., 16 мал., 5 табл., 47 крыніц.

ГЕТЭРАЛАГІЧНАЯ ЭКСПРЕСІЯ У КЛЕТКАХ БАКТЭРЫЙ *ESCHERICHIA COLI*, ДНК-ЛІГАЗА БАКТЭРЫЯФАГА Т4.

Аб'ект даследвання: клеткі бактэрыі *E.coli* – экспресійныя штамы: BL21(DE3), Tuner™(DE3)pLysS, Rosetta™(DE3)pLysS, XL1-Blue – прадастаўлены лабараторыяй «Цэнтр аналітычных і генна-інжынерных даследаванняў» Інстытута мікрабіялогіі НАНБ.

Мэта работы: напрацоўка ферментнага прэпарата ДНК-лігазы бактэрыяфага Т4, які характарызуецца функцыянальнай актыўнасцю ўзроўню, дастатковай для выкарыстання ў руцінных генна-інжынерных эксперыментах.

Метады даследвання: біяхімічныя, мікрабіялагічныя, малекулярна-генетычныя.

У выніку працы быў атрыманы ферментны прэпарат ДНК-лігазы бактэрыяфага Т4, які характарызуецца функцыянальнай актыўнасцю ўзроўню, дастатковай для выкарыстання ў руцінных эксперыментах, у прыватнасці, малекулярным кланаванні і трансфармацыі мікраарганізмаў. Было выдзелена каля 2,5 мл ферментнага прэпарата (канцэнтрацыя бялку каля 6 мг\мл) са 150 мл культуральнай вадкасці. У рамках выканання асноўнай задачы працы была праведзена аптымізацыя умоў напрацоўкі фермента: падабрана экспресійная сістэма, выбраны параметры асяроддзя, падыходзячыя для правядзення індукцыі экспрэсіі гена прадукту, яго ачысткі. Найбольш прыдатнымі для напрацоўкі бялку ўмовамі былі вызначаны наступныя: *E. coli* BL21(DE3) [pET42a(+)-ligT4], канцэнтрацыя індуктара IPTG 0,08 мм, час індукцыі: 3 гадзіны, тэмпература: 37 °С.

ABSTRACT

Diploma work 64 pages, 16 figures, 5 tables, 47 sources.

HETEROLOGOUS GENE-EXPRESSION, DNA-LIGASE PHAGE T4.

Research object: bacteria *E. coli* – expression strains BL21(DE3), Tuner™(DE3)pLysS, Rosetta™(DE3)pLysS, XL1-Blue – property of “Analytical and Genetic Engineering Research Center” laboratory, Institute for microbiology, National Academy of Science Belarus.

Research purpose: synthesis of DNA-ligase phage T4 enzyme, having functional activity level high enough for it being used in conduction of standard genetic-engineering experiments.

Research methods: biochemical, microbiological, molecular-genetic techniques.

Synthesis of functional enzyme DNA-ligase of phage T4 in *E. coli* expression strains; obtaining of the enzyme mentioned above characterized with activity level high enough for it being used in conduction of standard genetic-engineering experiments, is considered to be the result of the work. The amount of the enzyme obtained from 150 ml of cultivating broth is about 2.5 ml with protein concentration of about 6 mg/ml. The optimization of the T4 Ligase production conditions was held: the appropriate gene-expression system, the options for the modified *E. coli* T4 Ligase - producing strain cultivation, such as IPTG (inducer) concentration, and strategy for the purifying of the final protein-product were chosen. It was shown that the optimal conditions for T4 Ligase production were: IPTG concentration 0.08 mM, time of the appropriate gene induction 3 h, temperature 37 °C.