

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра генетики

ВЕЛИКАНОВА

Юлия Сергеевна

**ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS*
КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ**

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент А.В. Лагодич

Минск, 2014

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 70 с, 7 рисунков, 14 таблиц, 48 источников

МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА, ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА, *LACTOBACILLUS*, ПЛАЗМИДА, ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ, НАСЛЕДОВАНИЕ, ПДРФ-АНАЛИЗ, КЛОНИРОВАНИЕ.

Объекты исследования: штаммы *Lactobacillus casei* БИМВ-194, *Lactobacillus rhamnosus* БИМВ-189.

Цель работы: охарактеризовать перспективные для получения молочной кислоты бактериальные штаммы *Lb. casei* БИМ В-194 и *Lb. rhamnosus* БИМ В-189: подобрать условия для их эффективного культивирования и трансформации (электропорации), изучить характер наследования плазмид в клетках указанных штаммов, определить активность лактатдегидрогеназы исходного штамма и его кислотоустойчивых форм, амплифицировать ген лактатдегидрогеназы и осуществить верификацию с помощью ПДРФ-анализа.

Методы исследования: микробиологические – культивирование целевых штаммов, определение спектра и уровня антибиотикорезистентности; биохимические – определение активности лактатдегидрогеназы; молекулярно-генетические – выделение и очистка ДНК; электропорация и трансформация; рестрикционный и электрофоретический анализ; ПЦР, молекулярное клонирование.

По ходу выполнения работы использованы: аппараты для гелелектрофореза и анализа гелей, весы лабораторные аналитические, центрифуги различных моделей, термостаты для культивирования микроорганизмов, холодильники (морозильники), сушильные шкафы, автоклав, водяные бани, ПЦР-амплификаторы, спектрофотометры с контролем температуры.

В результате проведенной работы были подобраны условия для культивирования и электропорирования клеток штамма *L. casei* БИМ В-194. Изучена антибиотикорезистентность штаммов *L. casei* БИМ В-194 и *Lb. rhamnosus* БИМ В-189. Осуществлен анализ наследования различных векторных молекул в клетках штамма *L. casei* БИМ В-194, определена их сохранность в неселективных условиях. Подобраны условия для получения клеточного лизата, используемого для определения ферментативной активности. Определена активность лактатдегидрогеназ у штамма *L. casei* БИМ В-194 и его кислотоустойчивых мутантов. Получен продукт амплификации, гена лактатдегидрогеназы-2 штамма *E. faecalis*. С помощью ПДРФ-анализа было выявлено отличие в нуклеотидной последовательности гена лактатдегидрогеназы-2 у кислотоустойчивых форм штамма *E. faecalis* БИМ В-1012, а также выявлено новое аллельное состояние изучаемого гена.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца 70 с, 7 малюнкаў, 14 табліц, 48 крыніц

МАЛОЧНАЯ КІСЛАТА, ЛАКТАТ ДЭГІДРАГЕНАЗА, *LACTOBACILLUS*, ПЛАЗМІДА, ЭЛЕКТРАПАРАЦЫЯ, УСПАДКОЎВАННЕ, ПДРФ-АНАЛІЗ, КЛАНАВАННЕ.

Аб'екты даследавання: штамы *Lactobacillus casei* БІМВ-194, *Lactobacillus rhamnosus* БІМВ-189.

Мэта працы: ахарактарызаваць перспектыўныя для атрымання малочнай кіслаты бактэрыіныя штамы *Lb. casei* БІМ В-194 і *Lb. rhamnosus* БІМ В 189: падабраць умовы для іх эфектыўнага культывавання і трансфармацыі (электрапарацыі), вывучыць характар успадкоўвання плазмід у клетках паказаных штамаў, вызначыць актыўнасць лактатдэгідрагеназы выточнага штама і яго кіслата-ўстойлівых формаў, ампліфікаваць ген лактатдэгідрагеназы і ўжыццявіць верыфікацыю з дапамогай ПДРФ-аналізу.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя – культываванне мэтавых штамаў, вызначэнне спектра і ўзроўню антыбіётыка-рэзістэнтнасці; біяхімічныя – вызначэнне актыўнасці лактат дэгідрагеназы; малекулярна-генетычныя – вылучэнне і ачыстка ДНК; электрапарацыя і трансфармацыя; рэстрыкцыйны і электрафарэтычны аналіз; ПЦР, малекулярнае кланаванне.

У час выканання працы скарыстаны: апараты для гелі-электрафарэзу і аналізу геляў, шалі лабараторныя аналітычныя, цэнтрыфугі розных мадэляў, тэрмастаты для культывавання мікраарганізмаў, халадзільнікі (маразільнікі), сушыльныя шафы, аўтаклаў, вадзяныя лазні, ПЦР-ампліфікатары, спектрафатометры з кантролем тэмпературы.

У выніку праведзенай працы былі падабраны ўмовы для культывавання і электрапарывання клетак штама *L. casei* БІМ В-194. Вывучана антыбіётыка-рэзістэнтнасць штамаў *L. casei* БІМ В-194 і *Lb. rhamnosus* БІМ В-189. Ажыццёўлены аналіз успадкоўвання розных вектарных малекул у клетках штама *L. casei* БІМ В-194, вызначана іх захаванасць у неселектыўных умовах. Падабраны ўмовы для атрымання клеткавага лізату, што выкарыстоўваецца для вызначэння ферментацыйнай актыўнасці. Вызначана актыўнасць лактат дэгідрагеназ у штама *L. casei* БІМ В-194 і яго кіслата-ўстойлівых мутантаў. Атрыманы прадукт ампліфікацыі гена лактатдэгідрагеназы-2 штама *E. faecalis*. З дапамогай ПДРФ-аналізу было выяўлена адрозненне ў нуклеатыднай паслядоўнасці гена лактатдэгідрагеназы-2 у кіслата-ўстойлівых формаў штама *E. faecalis* БІМ В-1012, а таксама выяўлен новы алельны стан вывучанага гена.

ABSTRACT

Diploma work with 70, 7 figures, 14 tables, 48 sources

LACTIC ACID, LACTATE DEHYDROGENASE, *LACTOBACILLUS*, PLASMIDS, ELECTROPORATION, INHERITANCE, RFLP-ANALYSIS, CLONING.

Objects of study : strains of *Lactobacillus casei* BIMB -194 , *Lactobacillus rhamnosus* BIM B -189.

Mission: To characterize promising for lactic acid bacterial strains *Lb. casei* BIM B- 194 and *Lb. rhamnosus* BIM B-189: to select conditions for their effective cultivation and transformation (electroporation) , to explore the nature of inheritance of plasmids in cells of these strains to determine the activity of lactate dehydrogenase and its original strain of acid forms amplify the lactate dehydrogenase gene and perform verification using RFLP analysis .

Methods: microbiological - cultivation target strains, and to identify the spectrum of antibiotic resistance; biochemical - determination of lactate dehydrogenase activity; molecular genetics - isolation and purification of DNA; electroporation and transformation; restriction and electrophoretic analysis; PCR, molecular cloning .

In the course of performance used: apparatus for gel electrophoresis and gel analysis, laboratory analytical balances, centrifuges different models, thermostats for the cultivation of microorganisms, refrigerators (freezers), ovens, autoclave, water baths, PCR amplifiable, spectrophotometers with temperature control .

As a result of these work the conditions for culturing and electroporation cells of strain *L. casei* BIM B-194 were chosen. Antibiotic resistance of strains *L. casei* BIM B- 194 and *Lb. rhamnosus* BIM B-189 was studied. The analysis of inheritance of different vector molecules in cells strain *L. casei* BIM B-194, determined their safety under nonselective conditions. The conditions for obtaining the cell lysate used to determine enzyme activity. The activity of lactate dehydrogenase from strain *L. casei* BIM B-194 and its acid resistance mutants were determined. Obtained amplification product of gene lactate dehydrogenase-2 from cells of *E. faecalis*. A difference in the nucleotide sequence of the gene of lactate dehydrogenase-2 of *E. faecalis* strain BIM B -1012 and its acid resistance mutants was revealed by RFLP-analysis, and a new allele status of lactate dehydrogenase-2 gene was identified .