

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

ПИЩЕВСКАЯ
Наталья Николаевна

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ШТАММА *ENTEROCOCCUS FAECALIS* БИМ В-1012
И ЕГО МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ

Аннотация
к дипломной работе

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

Минск 2015

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 62 с., 8 рис., 16 табл., 41 источник
МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА, ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА 1 И 2 ТИПОВ,
ENTEROCOCCUS FAECALIS, АКТИВНОСТЬ, АМПЛИФИКАЦИЯ, ПДРФ-
АНАЛИЗ, СИКВЕНС-АНАЛИЗ

Объекты исследования: *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012.

Цель работы: характеристика генов лактатдегидрогеназы штамма *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012 и его мутантных форм как перспективных продуцентов L-молочной кислоты: изучить нуклеотидные последовательности генов лактатдегидрогеназы различных штаммов *E. faecalis*, представленных в базах данных; разработать праймеры для амплификации гена лактатдегидрогеназы; получить продукты амплификации гена лактатдегидрогеназы штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 и его мутантных вариантов; осуществить ПДРФ анализ полученных продуктов амплификации; осуществить сиквенс-анализ генов лактатдегидрогеназы 1 и 2 типов интактного штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 и его мутантных вариантов; определить активность лактатдегидрогеназы исходного штамма и его мутантных форм.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов, трансформация); молекулярно-генетические (выделение и очистка ДНК, электрофоретический анализ, рестрикционный анализ, ПЦР, ПДРФ-анализ, сиквенс-анализ); биохимические (измерение активности лактатдегидрогеназы), спектрофотометрия.

В результате проведенной работы были подобраны условия для получения клеточного лизата с последующим определением ферментативной активности. Определена активность лактатдегидрогеназ у штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 и его кислотоустойчивых мутантов. С помощью сконструированных праймеров получены продукты амплификации, представленные последовательностями генов лактатдегидрогеназы 1 типа и лактатдегидрогеназы 2 типа. С помощью ПДРФ-анализа было выявлено новое аллельное состояние гена лактатдегидрогеназы 1 типа, а также изменение нуклеотидной последовательности гена лактатдегидрогеназы 2 типа у мутанта 4. Просеквенирована последовательность генов лактатдегидрогеназы 2 типа у мутантов М4, М5, М6.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца 62 с., 8 мал., 16 табл., 41 крыніц

МАЛОЧНАЯ КІСЛАТА, ЛАКТАТДЭГІДРАГЕНАЗА 1 І 2 ТЫПАЎ, *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, АКТЫЎНАСЦЬ, АМПЛІФІКАЦЫЯ, ПДРФ-АНАЛІЗ, СІКВЕНС-АНАЛІЗ

Аб'екты даследавання: *Enterococcus faecalis* БІМ В- 1012

Мэта : ахарактарызаваць гены лактатдэгідрагеназы штама *E. faecalis* БІМ В-1012 і яго мутантныя формы як перспектыўных прадукцэнтаў L-малочнай кіслаты: вывучыць нуклеотыдныя паслядоўнасці генаў лактатдэгідрагеназы розных штамаў *E. faecalis*, прадстаўленых у базах дадзеных; распрацаваць праймер для ампліфікацыі генаў лактатдэгідрагеназы; атрымаць прадукты ампліфікацыі генаў лактатдэгідрагеназы штаму *E. faecalis* БІМ В - 1012 і яго мутантных варыянтаў; ажыццявіць ПДРФ аналіз атрыманых прадуктаў ампліфікацыі; ажыццявіць сіквенс аналіз генаў лактатдэгідрагеназы 1 і 2 тыпаў інтактнага штаму *E. faecalis* БІМ В - 1012 і яго мутантных варыянтаў; вызначыць актыўнасць лактатдэгідрогеназы зыходнага штаму і яго мутантных формаў.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне, трансфармацыя), малекулярна-генетычныя (вылучэнне і ачыстка ДНК, электрафарэтычны аналіз, рэстрыкцыонны аналіз, ПЦР, ПДРФ-аналіз, сіквенс-аналіз), біяхімічныя (вымярэнне актыўнасці лактатдэгідрагеназы), спектрафотаметрыя.

У выніку праведзенай работы былі падабраныя ўмовы для атрымання клеткавага лізата з наступным вызначэннем ферментатыўнай актыўнасці. Вызначана актыўнасць лактатдэгідрагеназы у штаму *E. faecalis* БІМ В- 1012 і яго кіслатаўстойлівых мутантаў. З дапамогай сканструяваных праймераў атрыманы прадукты ампліфікацыі, прадстаўленыя паслядоўнасцямі генаў лактатдэгідрагеназы 1 тыпу і лактатдэгідрагеназы 2 тыпу. З дапамогай ПДРФ-аналізу было выяўлена новы алельны стан гена лактатдэгідрагеназы 1 тыпу, а таксама змена нуклеатыднай паслядоўнасці гена лактатдэгідрагеназы 2 тыпу ў мутанта 4. Прасеквеніравана паслядоўнасць генаў лактатдэгідрагеназы 2 тыпу ў мутантаў М4, М5, М6.

ABSTRACT

Diploma work with 62 p., 8 fig., 16 tables., 41 sources

LACTIC ACID, LACTATE DEHYDROGENASE TYPE 1 AND 2, *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, ACTIVITY, AMPLIFICATION, RFLP-ANALYSIS, SEQUENCE-ANALYSIS

Objects of study: *Enterococcus faecalis* БИМ В - 1012

Mission: to characterize the bacterial strain *E. faecalis* БИМ В - 1012 and its mutants forms as a perspective producer of L-lactic acid: to select the conditions for cultivation and transformation (electroporation) of cells of the strain *E. faecalis* БИМ В - 1012, to study the nature of inheritance of plasmids in the strain *E. faecalis* БИМ В - 1012, to measure the activity of lactate dehydrogenase of initial strain and its mutants forms, to amplify the lactate dehydrogenase gene and perform verification using RFLP – analysis.

Methods of research: microbiological (cultivation of microorganisms, transformation), methods of molecular genetics (extraction and purification of DNA, electrophoresis analysis, restriction analysis, PCR, RFLP – analysis, sequence-analysis), biochemical (the measurement of lactate dehydrogenase activity) spectrophotometry.

As a result of a conducted work conditions were chosen to obtain a cell lysate to provide the following determination of enzyme activity. The activity of lactate dehydrogenase of the strain *E. faecalis* БИМ В- 1012 and its acid-resistant mutants has been defined. Using primers designed obtained amplification products represented lactate dehydrogenase gene sequences of type 1 and lactate dehydrogenase type 2. Using RFLP-analysis revealed new allelic state lactate dehydrogenase type 1 gene, and changes in the nucleotide sequence of the gene of lactate dehydrogenase type 2 mutant 4. Sequenced gene sequence of lactate dehydrogenase type 2 mutants M4, M5, M6.