МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра молекулярной биологии

Никипоронок

Дарья Александровна

Изучение влияния аминокислотной замены Leu325Phe на термостабильность альфа-амилазы *Bacillus flexus* 406

Дипломная работа

Научный руководитель:

К. б. н., доцент Качан А.В.

Допущена к защите

«__»_____2017г.

Зав. кафедрой молекулярной биологии

Доктор биологических наук, профессор А.Н. Евтушенков

Минск 2017

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 47 с., 10 рис., 4 табл., 18 источников.

Изучение влияния аминокислотной замены Leu325Phe на термостабильность альфа-амилазы *Bacillus flexus* 406

Цель: получить мутантный ген альфа-амилазы *B. flexus* 406, кодирующий фермент с заменой лейцин325→фенилаланин и оценить влияние данной замены на термостабильность амилазы.

Методы исследования: культивирование микроорганизмов, фракционирование клеток, электропорация, электрофорез, измерение остаточной активности фермента выделение ДНК, рестрикционный анализ, клонирование, Са-трансформация, денатурация ДНК, мутагенез, лигирование.

В результате с помощью сайт-направленного мутагенеза получена нуклеотидная последовательность гена альфа-амилазы *Bacillus flexus* 406, содержащая замену лейцинового кодона ТТА на триплет ТТТ, кодирующий фенилаланин. Указанная мутация должна выражаться в изменении первичной структуры внеклеточной альфа-амилазы – замене остатка лейцина в положении 325 на фенилаланин. Замена лейцин325→фенилаланин в аминокислотной последовательности α-амилазы *Bacillus flexus* 406 приводила к повышению термостабильности α-фермента.

Ключевые слова: альфа-амилаза, мутагенез, термостабильность, реактив с динитросалициловой кислотой, остаточная активность.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 47 с., 10 мал., 4 табл., 18 крыніц.

Вывучэнне ўплыву амінакіслотнай замены Leu325Phe на тэрмастабільнасць альфа-амілазы *Bacillus flexus* 406.

Мэта: атрымаць мутантны ген альфа-амілазы *B. flexus* 406, які кадуе фермент з заменай лейцын325 → фенілаланін і ацаніць уплыў дадзенай замены на тэрмастабільнасць амілазы.

Метады даследавання: культыванне мікраарганізмаў, вылучэнне ДНК, рзстрыкцыйны аналіз, кланаванне, фракцыяванне клетак, электрапарцыя, электрафарэз, вымярэнне астаткавай актыўнасці, Са-трансфармацыя, дэнатурацыя ДНК, мутагенез, лігіраванне.

У выніку з дапамогай сайт-накіраванага мутагенеза атрымана нуклеатыдная паслядоўнасць гена альфа-амілазы *Bacillus flexus* 406, якая змяшчае замену лейцынавага кадона ТТА на трыплет ТТТ, які кадуе фенілаланін. Азначаная мутацыя павінна выяўляцца ў змене першаснай структуры пазаклеткавай альфа-амілазы - замене астатку лейцына ў палажэнні 325 на фенілаланін. Замена лейцын325 → фенілаланін ў амінакіслотнай паслядоўнасці α - амілазы *Bacillus flexus* 406 прыводзіла да павышэння тэрмастабільнасці фермента.

Ключавыя словы: альфа-амілаза, мутагенез, тэрмастабільнасць, рэактыў з дінітрасаліцылавай кіслатой, астатковая актыўнасць.

SUMMARY

Graduate work 47 pages, 10 pictures, 4 tables, 18 sources.

Study of the effect of the amino acid substitution Leu325Phe on the thermal stability of *Bacillus flexus* 406 alpha-amylase.

Goal: : to obtain a mutant gene of alpha-amylase *B. flexus* 406, which encodes the enzyme with the substitution leucine325 → phenylalanine and to assesse the effect of this substitution on the thermal stability of amylase.

Research methods: cultivation of microorganisms, cell fractionation, electroporation, electrophoresis, measurement of residual enzyme activity, DNA isolation, restriction analysis, cloning, Ca-transformation, DNA denaturation, mutagenesis, ligation.

As a result, a nucleotide sequence of the *Bacillus flexus* 406 alpha-amylase gene was obtained by site-directed mutagenesis, which replacing the leucine codon TTA with a triplet TTT which encoding phenylalanine. This mutation should be expressed in a change in the primary structure of extracellular alpha-amylase - replacing the leucine residue at position 325 with phenylalanine. The substitution of leucine325 → phenylalanine in the amino acid sequence of amylase *Bacillus flexus* 406 led to an increase in the thermostability of the α-amylase.

Key words: alpha-amylase, mutagenesis, thermal stability, reagent with Dinitrosalicylic acid, residual activity.