

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**Учреждение образования
«Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета**

ФАКУЛЬТЕТ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КАФЕДРА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ И БИОХИМИИ

**СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* –
ПРОДУЦЕНТА БРАЗЗЕИНА**

Лемеза
Денис Александрович

Дипломная работа V курса

Специальность 1-80 02 01 Медико-биологическое дело

_____ Д. А. Лемеза

«Допустить к защите»

Зав. кафедрой экологической химии и
биохимии

к.х.н., доцент, профессор

С. Н. Шахаб

Научный руководитель

д.б.н., профессор, чл.-корр.

А. И. Зинченко

« ____ » _____ 2019 г.

МИНСК 2019

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* – ПРОДУЦЕНТА БРАЗЗЕИНА

Реферат

Дипломная работа: 41 страница, 12 рисунков, 6 таблиц, 35 источников

БРАЗЗЕИН, СЛАДКИЙ БЕЛОК, *ESCHERICHIA COLI*,
РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ

Объектами исследования являются: *Escherichia coli*, а также коллекционный штамм *E. coli* BL21(DE3), использующийся для создания штаммов-продуцентов рекомбинантных белков.

Цель работы – создание штамма-продуцента браззеина и описание основных физико-химических свойств полученного рекомбинантного белка.

Ген *qbra*, кодирующий браззеин, был получен методом ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиду, содержащую искусственно синтезированный ген браззеина, и встроен в вектор pET42a(+). Созданной конструкцией были трансформированы компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3).

В результате выполнения работы был получен новый генно-инженерный штамм *E. coli* pET42-Qbra, продуцент браззеина. Также был наработан и выделен целевой белок с чистотой продукта 98%.

Таким образом, результаты исследования могут лечь в основу технологии получения натуральных подсластителей.

В процессе работы применялись следующие методики: выделение геномной ДНК, полимеразная цепная реакция, электрофорез ДНК в агарозном геле, продолжительная перекрывающаяся полимеразная цепная реакция, трансформация клеток *E. coli*, скрининг трансформированных клеток, культивирование микроорганизмов в жидких и твердых (агарозных) питательных средах, выделение и очистка белка, денатурирующий гель-электрофорез белков, аффинная хроматография на смоле Ni²⁺-NTA.

СТВАРЭННЕ РЭКАМБІНАНТНАГА ШТАМА *ESCHERICHIA COLI* – ПРАДУЦЕНТА БРАЗЕІНА

Рэферат

Дыпломная работа: 41 старонка, 12 малюнкаў, 6 табліц, 35 крыніц

БРАЗЕІН, САЛОДКІ БЯЛОК, *ESCHERICHIA COLI*, РЭКАМБІНАНТНЫ ШТАМ

Аб'ектамі даследавання з'яўляюцца: *E. coli*, а таксама калекцыйны штам *E. coli*: BL21 (DE3), які выкарыстоўваецца для стварэння штамаў-прадучэнтаў рэкамбінантных бялкоў.

Мэта работы – стварэнне штама-прадучэнта бразеіна і апісанне асноўных фізіка-хімічных уласцівасцяў атрыманага рэкамбінантнага бялку.

Ген *qbra*, які кадуе бразеин, быў атрыманы метадам ПЦР з выкарыстаннем у якасці матрыцы плазміды, якая змяшчае штучна сінтэзаваны ген бразеіна, і ўбудаваны ў вектар pET42a (+). Створанай канструкцыяй былі трансфармаваны кампетэнтныя клеткі *E. coli* BL21 (DE3).

У выніку выканання працы быў атрыманы новы генна-інжынерны штам *E. coli* pET42-Qbra, прадучэнт бразеіна. Таксама быў напрацаваны і вылучаны патрэбны нам бялок з чысцінёй прадукту 98%.

Такім чынам, вынікі даследавання могуць легчы ў аснову тэхналогіі атрымання натуральных падсалодвальнікаў.

У працэсе работы ўжываліся наступныя метадыкі: вылучэнне геномнай ДНК, палімеразная ланцуговая рэакцыя, элекрафарэз ДНК у агарозным гелі, працяглая перакрываючая палімеразная ланцуговая рэакцыя, трансфармацыя клетак *E. coli*, скрынінг трансфармаваных клетак *E. coli*, культываванне мікраарганізмаў у вадкіх і цвёрдых (агарозных) пажыўных асяроддзях, вылучэнне і ачыстка бялку, дэнатурыруючы гель-электрафарэз бялкоў, аффінная храматаграфія на смале Ni²⁺-NTA.

*THE CREATURE OF RECOMBINANT STRAIN OF ESCHERICHIA COLI
– PRODUCER BRAZZEIN*

Abstract

Term paper: 41 pages, 12 figures, 6 tables, 35 references

BRAZZEIN, SWEET-TASTING PROTEIN, *ESCHERICHIA COLI*,
RECOMBINANT STRAIN

The objects of the study are bacterial cells of the strain *E. coli* BL21 (DE3), which are used to create recombinant protein producer strains.

The purpose of the work is to create a producer strain of brazzein and description of the main physicochemical properties of the resulting recombinant protein.

The *qbra* gene which codes brazzein was obtained by method PCR using a plasmid containing an artificially synthesized brazzein gene as a template and inserted into the pET42a(+) vector. Competent cells of *E. coli* BL21 (DE3) were transformed by the created construction.

As a result of the work, a new genetically engineered strain *E. coli* pET42-Qbra, producing brazzein, was obtained. The target protein with a product purity of 98% was also developed and isolated.

So, the results of the study can form the basis of the technology for the production of natural sweeteners.

In the course of the study the following methods were used: isolation of genomic DNA, polymerase chain reaction, DNA electrophoresis in agarose gel, prolonged overlapping polymerase chain reaction, transformation of *E. coli* cells, screening of transformed *E. coli* cells, cultivation of microorganisms in liquid and solid (agar) substratums, isolation and purification of protein denaturing gel electrophoresis of proteins, thin-layer chromatography on the of resin Ni²⁺-NTA.