

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

КАБЫШКО
Елизавета Сергеевна

**КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО АНТИМИКРОБНЫЙ
ПЕПТИД ШЕФЕРИН II, В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI***

Аннотация

Научный руководитель:
старший преподаватель
кафедры микробиология
Н.В. Сауткина

Минск, 2020

АННОТАЦИЯ

Объектом исследования является последовательность гена, кодирующего антимикробный пептид шеферин II.

Целью дипломной работы является клонирование и экспрессия гена, кодирующего антимикробный пептид шеферин II, в клетках *E. coli*.

В ходе работы ген *shepherin-oII* длиной 134 п.н., оптимизированный для экспрессии в клетках *E. coli* и кодирующий антимикробный пептид шеферин II, клонирован в составе вектора pET-24b(+) по сайтам рестрикции NdeI и EcoRI в клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Однако в результате индукции экспрессии этого гена в бактериальных клетках и последующей окраски полиакриламидного геля серебром целевой пептид массой 3,2 кДа не зафиксирован. Для решения возникшей проблемы АМП шеферин II получали в клетках *E. coli* в составе фьюжн-белков, а в качестве фьюжн-партнёров пептида использовали анионные белки: малый убиквитин-подобный модификатор дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (далее SUMO) и углевод-связывающий модуль (далее СВМТ) фермента ксиланазы 10А бактерий *Thermotoga maritima*. В результате в клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащего рекомбинантные плазмиды pСВМТ-Shepherin-oII и pSUMO-Shepherin-oII, в результате индукции экспрессии выявлено накопление продуктов массой 28 кДа и 17,8 кДа, соответствующих белкам СВМТ-Shepherin-oII и SUMO-Shepherin-oII.

**МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЎНІВЕРСІТЭТ
БІЯЛАГІЧНЫ ФАКУЛЬТЭТ
Кафедра мікрабіялогіі**

КАБЫШКА
Лізавета Сяргееўна

**КЛОНАВАННЕ ГЕНА, КАДАВАЛЬНАГА АНТЫМІКРОБ-
НУЮ ПЕПТЫДУ ШЭФЕРЫН ІІ, У КЛЕТЦЫ *ESCHERICHIA*
*COLI***

Анатацыя

Навуковы кіраўнік:
старэйшы выкладчык
кафедры мікрабіялогіі
Н.У. Сауткіна

Мінск, 2020

АНАТАЦЫЯ

Аб'ектам даследавання з'яўляецца паслядоўнасць гена, кадавальнага антымікробную пептыду шэферын II.

Мэтай дыпломнай працы з'яўляецца кланаванне і экспрэсія гена, кадавальнага антымікробную пептыду шэферын II, у клетках штаму *E. coli*.

У ходзе работы ген *shepherin-oII* даўжынёй 134 п.н., аптымізаваны для экспрэсіі ў клетках *E. coli* і кадавальны антымікробную пептыду шэферын II, кланаван ў складзе вектара pET-24b (+) па сайтах рэстрыкцыі NdeI і EcoRI у клетках штаму *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Аднак у выніку індукцыі экспрэсіі гэтага гена ў бактэрыяльных клетках і наступнай афарбоўкі полиакриламіднага геля срэбрам мэтавай пептыды масай 3,2 кДа не зафіксаван. Для вырашэння ўзніклай праблемы АМП шэферын II атрымлівалі ў клетках *E. coli* ў складзе фьюжн-бялкоў, а ў якасці фьюжн-партнёраў пептыда выкарыстоўвалі аніённыя бялкі: малы убіквітін-падобны мадыфікатар дрожджаў *Saccharomyces cerevisiae* (далей SUMO) і вугляводзлучальны модуль (далей CBMT) фермента ксіланазы 10а бактэрыі *Thermotoga maritima*. У выніку ў клетках штаму *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, які змяшчае рэкамбінантныя плазміды pCBMT-Shepherin-oII і pSUMO-Shepherin-oII, у выніку індукцыі экспрэсіі выяўлена назапашванне прадуктаў масай 28 кДа і 17,8 кДа, адпаведных бялкоў CBMT-Shepherin-oII і SUMO-Shepherin-oII.

THE MINISTRY OF EDUCATION OF THE REPUBLIC OF BELARUS
BELARUSIAN STATE UNIVERSITY
BIOLOGICAL FACULTY
Department of Microbiology

KABYSHKO
Elizaveta Sergeevna

**CLONING OF THE GENE ENCODING THE
ANTIMICROBIAL PEPTIDE SHEFERIN II
IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS**

Abstract

Scientific supervisor:
Senior lecturer,
Department of Microbiology
N.V. Sautkina

Minsk, 2020

ABSTRACT

The object of the study is the sequence of the gene encoding the antimicrobial peptide Sheferin II.

The aim of the thesis is cloning and expression of the gene encoding the antimicrobial peptide Sheferin II in *E. coli* cells.

To achieve this goal, the *shepherin-oII* gene, 134 bp in length, optimized for expression in *E. coli* cells and encoding the sheferin II antimicrobial peptide, was cloned into the pET-24b (+) vector at the NdeI and EcoRI restriction sites in *E. coli* strain BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. However, as a result of induction of the expression of this gene in bacterial cells and subsequent staining of the polyacrylamide gel with silver, the target peptide of 3.2 kDa mass was not fixed. To solve the problem, AMP shepherin II was obtained in *E. coli* cells as part of fusion proteins, and anionic proteins were used as fusion partners of the peptide: small ubiquitin-like modifier of yeast *Saccharomyces cerevisiae* (hereinafter SUMO) and a carbohydrate-binding module (hereinafter CBMT) xylanase enzyme 10A of *Thermotoga maritima* bacteria. As a result, the cells of *E. coli* strain BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL containing recombinant plasmids pCBMT-Shepherin-oII and pSUMO-Shepherin-oII, as a result of expression induction, accumulation of products weighing 28 kDa and 17.8 kDa corresponding to proteins CBMT-Shepherin-oII and SUMO-Shepherin-oII.