

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии

ЩЕРБАКОВА
Анастасия Андреевна

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ *E.COLI*, СИНТЕЗИРУЮЩИХ
ПЕРОКСИДАЗУ ХРЕНА ИЗОФОРМУ С2 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ МЕТОДОВ

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель,
кандидат биологических наук
Семашко Т.В.

Минск, 2020

АННОТАЦИЯ

Объекты исследования: пероксидаза хрена изоформа C2, *Escherichia coli*, плазида pFLAG-CTS.

Цель: клонирование гена пероксидазы изоформы C2 в клетки *Escherichia coli*, путём сайт-специфического мутагенеза, проведение замены аминокислотных остатков активного центра пероксидазы хрена изоформы C2.

В ходе работы проводили выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса. Плазмиду обрабатывали рестриктазой для образования липких концов. Далее с этими образцами проводили ПЦР. Нарботку и очистку фрагмента ДНК, содержащего ген пероксидазы хрена, проводили путём ПЦР и вырезания из геля. Затем проводили рестрикцию при помощи рестриктаз Hind III и Bgl II, чтобы избавиться от лишнего и получить липкие концы. После также проводили рестрикцию с плазмидой. В результате были получены фрагменты ДНК, содержащие ген пероксидазы хрена и линеаризованную плазмиду, с которыми далее проводили лигирование.

Установлено, вставка имеет размер около 1000 п.о., лианиризованный вектор – около 5000 п.о., а лигазная смесь ~ 6000 п.о.

В дальнейшем была проведена трансформация плазмиды со вставкой методом электропорации. Отбор трансформантов проводили по устойчивости к антибиотику ампициллину. Выросшие отдельные колонии трасформантов пересекали на среду с вышеуказанным антибиотиком. Из выросших культур выделяли ДНК методом щелочного лизиса. Установлено наличие вставки только в образце 1.1. Штамм, содержащий необходимую плазмиду со вставкой, повторно вырастили для перепроверки результатов.

Далее проводили измерение активности и концентрации фермента.

Установлено, что наибольшая концентрация белка у *E.coli* была в образцах №1 (на качалке с индукцией) и №2 (на качалке без индукции), наименьшая в образце №3 (в термостате с индукцией). У дрожжей наибольшая концентрация белка оказалась в образцах 0- (без индукции, без вставки), 1- (со вставкой без индукции), 1+ (со вставкой с индукцией).

**MINISTRY OF EDUCATION OF THE REPUBLIC OF BELARUS
BELARUSIAN STATE UNIVERSITY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
Department of Microbiology**

SHCHERBAKOVA
Anastasia Andreevna

**OBTAINING STRAINS OF E. COLI SYNTHESIZING HORSERADISH
PEROXIDASE ISOFORM C2 USING GENETICALLY ENGINEERED
METHODS**

Annotakia to the thesis

Scientific adviser,
candidate of biological sciences
Semashko T.V.

Minsk, 2020

ANNOTATION

Objects of study: horseradish peroxidase isoform C2, *Escherichia coli*, plasmid pFLAG-CTS.

Purpose: cloning the C2 isoform peroxidase gene into *Escherichia coli* cells by site-specific mutagenesis, replacing the amino acid residues of the active horseradish peroxidase center of the C2 isoform.

In the course of work, plasmid DNA was isolated by alkaline lysis. The plasmid was digested with restriction enzyme to form sticky ends. Next, PCR was performed with these samples. The production and purification of the DNA fragment containing the horseradish peroxidase gene was carried out by PCR and gel excision. Then restriction was carried out using restriction enzymes Hind III and Bgl II to get rid of excess and get sticky ends. After that, restriction was also carried out with the plasmid. As a result, DNA fragments containing the horseradish peroxidase gene and a linearized plasmid were obtained, with which they further ligated.

It has been established that the insert has a size of about 1000 bp, the linearized vector is about 5000 bp, and the ligation mixture is ~ 6000 bp.

Subsequently, the plasmid was transformed with an insert by electroporation. Transformants were selected for antibiotic resistance to ampicillin. The grown individual colonies of transformants were reseeded on Wednesday with the above antibiotic. DNA was isolated from grown cultures by alkaline lysis. The presence of an insert was found only in sample 1.1. The strain containing the necessary plasmid with the insert was re-grown to recheck the results.

Next, the activity and concentration of the enzyme were measured.

It was found that the highest protein concentration in *E. coli* was in samples No. 1 (on a rocking chair with induction) and No. 2 (on a rocking chair without induction), the lowest in sample No. 3 (in a thermostat with induction). In yeast, the highest protein concentration was found in samples 0– (without induction, without insertion), 1– (with insertion without induction), 1+ (with insertion with induction).

**МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЎНІВЕРСІТЭТ
біялагічным факультэце
кафедра мікрабіялогіі**

Шчарбакова
Анастасія Андрэеўна

**АТРЫМАННЕ ШТАМ E.COLI, СІНТЭЗУЮЦА ПЕРОКСИДАЗУ
ХРЭН ИЗОФОРМУ C2 З ВЫКАРЫСТАННЕМ ГЕННА-ІНЖЫНЕРНЫХ
МЕТАДАЎ**

Аннотакія да дыпломнай працы

Навуковы кіраўнік,
кандыдат біялагічных навук
Сямашка Т.В.

Мінск, 2020

АНАТАЦЫІ

Аб'екты даследавання: пероксидаза хрэна ізоформа C2, *Escherichia coli*, плазмід рFLAG-CTS.

Мэта: кланаванне гена пероксидазы ізоформы C2 ў клеткі *Escherichia coli*, шляхам сайт-спецыфічнага мутагенеза, правядзенне замены амінакіслотных астакоў актыўнага цэнтра пероксидазы хрэна ізоформы C2.

У ходзе работы праводзілі вылучэнне плазмідной ДНК метадам шчолачнага лізіс. Плазміды апрацоўвалі рэстрыктазой для адукацыі ліпкіх рэшт. Далей з гэтымі ўзорамі праводзілі ПЦР. Напрацоўку і ачыстку фрагмента ДНК, які змяшчае ген пероксидазы хрэна, праводзілі шляхам ПЦР і выразання з геля. Затым праводзілі рэстрыкцыяў пры дапамозе рэстрыктаз Hind III і Bgl II, каб пазбавіцца ад лішняга і атрымаць ліпкія канцы. Пасля тагсама праводзілі рэстрыкцыяў з плазмідой. У выніку былі атрыманы фрагменты ДНК, якія змяшчаюць ген пероксидазы хрэна і лінеарызіраваную плазміды, з якімі далей праводзілі лігіраванне.

Устаноўлена, устаўка мае памер каля 1000 П.В., ліанізіраваный вектар - каля 5000 П.В., а лігазная сумесь ~ 6000 П.В.

У далейшым была праведзена трансфармацыя плазміды з устаўкай метадам электропорации. Адбор трансформантаў праводзілі па ўстойлівасці да антыбіётыка ампіцыліну. Якія выраслі асобныя калоніі трансформантаў перасеваюць на сераду з вышэйпаказаным антыбіётыкам. З якіх выраслі культур вылучалі ДНК метадам шчолачнага лізіс. Устаноўлена наяўнасць ўстаўкі толькі ва ўзоры 1.1. Штам, які змяшчае неабходную плазміды з устаўкай, паўторна выгадавалі для пераправеркі вынікаў.

Далей праводзілі вымярэнне актыўнасці і канцэнтрацыі фермента.

Устаноўлена, што найбольшая канцэнтрацыя бялку ў *E.coli* была ў узорах №1 (на пампавалцы з індукцыяй) і №2 (на пампавалцы без індукцыі), найменшая ва ўзоры №3 (у тэрмастаце з індукцыяй). У дрожджаў найбольшая канцэнтрацыя бялку апынулася ў узорах 0- (без індукцыі, без ўстаўкі), 1- (з устаўкай без індукцыі), 1+ (з устаўкай з індукцыяй).