

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии

ДВОЕЖЁНОВА
Елизавета Александровна

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ В ОБЛАСТИ *cre* НА
КАТАБОЛИТНУЮ РЕПРЕССИЮ ГЕНА α -АМИЛАЗЫ *amyM3***

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель
кандидат биологических наук,
доцент А. В. Качан

Минск, 2021

АННОТАЦИЯ

Объект исследования: ген *amyM3*, кодирующий термостабильную α -амилазу *Bacillus flexus* 406.

Цель работы: получить мутантные варианты гена *amyM3* *Bacillus flexus* 406 с изменёнными предполагаемыми участками *cre* и оценить уровень катаболитной репрессии изменённых генов в клетках *Bacillus subtilis* 168.

В различных областях биотехнологии необходимо использовать ферменты выдерживающие высокие температуры и сохраняющие свою активность в течение долгого времени. Фермент α -амилаз также должна иметь высокую термостабильность, чтобы использовать его в различных промышленных процессах.

Ген термостабильной α -амилазы *amyM3* *Bacillus flexus* 406 подвержен катаболитной репрессии в клетках *Bacillus subtilis* 168 в присутствии в среде глюкозы.

В ходе проделанной работы был получен ген α -амилазы *B. flexus* 406 с мутациями в расположенных в начале кодирующей последовательности участках, предположительно являющихся *cre*-сайтами (*creB*, *creC*). Были получены рекомбинантные штаммы *Bacillus subtilis* 168, в которых мутированный и нативный варианты гена *amyM3* были внедрены в состав хромосомного локуса *amyE*.

Показано, что внесённые мутации в двух предполагаемых участках *cre* не оказывали значимого влияния на подавление синтеза α -амилазы в присутствии глюкозы. После глубинного культивирования в течение 4 ч в среде с 0,5 % глюкозы, удельная активность в культурах бактерий, содержащих мутантный и исходный вариант гена амилазы, составила 25,031 ед./OD600 и 29,743 ед./OD600 соответственно.

MINISTRY OF EDUCATION REPUBLIC OF BELARUS
BELARUSIAN STATE UNIVERSITY
BIOLOGICAL FACULTY
MICROBIOLOGY DEPARTMENT

E. A.
DVAYAZHONAVA

**ESTIMATION OF THE INFLUENCE OF MUTATIONS IN THE
REGION OF *cre* ON CATABOLYTE REPRESSION OF THE
amyM3 α -AMYLASE GENE**

Scientific adviser:
Candidate of Biological Sciences,
Associate Professor A. V. Kachan

Minsk, 2021

ANNOTATION

Object of research: the *amyM3* gene encoding the thermostable α -amylase of *Bacillus flexus* 406.

Objective: to obtain mutant variants of the *amyM3* gene of *Bacillus flexus* 406 with altered putative *cre* regions and to assess the level of catabolic repression of altered genes in *Bacillus subtilis* 168 cells.

In various fields of biotechnology, it is necessary to use enzymes that can withstand high temperatures and retain their activity for a long time. The enzyme α -amylase must also withstand high temperatures in various industrial processes.

The gene of thermostable α -amylase *amyM3* of *Bacillus flexus* 406 is subject to catabolic repression in *Bacillus subtilis* 168 cells in the presence of glucose in the medium.

In the course of this work, the *B. flexus* 406 α -amylase gene was obtained with mutations in the regions located at the beginning of the coding sequence, presumably being *cre* sites (*creB*, *creC*). Recombinant strains of *Bacillus subtilis* 168 were obtained, in which the mutated and native variants of the *amyM3* gene were introduced into the *amyE* chromosomal locus.

It was shown that the introduced mutations in two supposed regions of *cre* did not have a significant effect on the suppression of α -amylase synthesis in the presence of glucose. After submerged cultivation for 4 hours in a substrate with 0.5% glucose, the specific activity in cultures of bacteria containing the mutant and initial variant of the amylase gene was 25.031 units/OD600 and 29.743 units/OD600, respectively.

МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЎНІВЕРСІТЭТ
БІЯЛАГІЧНЫ ФАКУЛЬТЭТ
Кафедра мікрабіялогіі

ДВАЯЖОНАВА
ЛІЗАВЕТА АЛЯКСАНДРАЎНА

АЦЭНКА УЗДЗЕЯННЯ МУТАЦЫЙ Ў ВОБЛАСЦІ *cre* НА
КАТАБОЛИТНУЮ РЭПРЭСІЮ ГЕНА α -АМІЛАЗЫ *amyM3*

Анатацыя да дыпломнай працы

Навуковы кіраўнік:
доктар біялагічных навук,
дацэнт А. В. Качан

Мінск, 2021

АНАТАЦЫЯ

Аб'ект даследвання: ген *amyM3*, які дэтэрмініруе тэрмастабільную α -амілазу *Bacillus flexus* 406.

Мэта працы: атрымаць варыянты гена *amyM3 Bacillus flexus* 406 са змененымі ўчасткамі, магчыма *cre*, і ацаніць узровень катабалітнай рэпрэсіі такога гена у клетках *Bacillus subtilis* 168.

У розных галінах біятэхналогіі неабходна выкарыстоўваць ферменты якія вытрымліваюць высокія тэмпературы і захоўваюць сваю актыўнасць на працягу доўгага часу. Фермент α -амілаза таксама павінны вытрымліваць высокія тэмпературы ў розных вытворчых працэсах.

Ген тэрмастабільнай α -амілазы *amyM3 Bacillus flexus* 406 рэгулюецца катабалітнай рэпрэсіей ў клетках *Bacillus subtilis* 168 ў прысутнасці ў пажыўнам асяроддзе глюкозы.

У ходзе выканання работы быў атрыманы ген α -амілазы *B. flexus* 406 з мутацыямі ў размешчаных на пачатку кадзіруючай паслядоўнасці участках, якія з'яўляюцца патэнцыяльна *cre*-сайтамі (*creB*, *creC*). Былі атрыманы рэкомбінантныя штамы *Bacillus subtilis* 168, у якіх мутантны і націўны варыянты гена *amyM3* былі ўкаранёны ў склад хромасомнага локуса *amyE*.

Паказана, што унесеныя мутацыі ў двух меркаваных участках *cre* не аказвалі значнага ўплыву на падаўленне сінтэзу α -амілазы ў прысутнасці глюкозы. Пасля глыбіннага культывавання на працягу 4-х гадзін у асяроддзі з 0,5 % глюкозай, ўдзельная актыўнасць у культурах бактэрый, якія мутантны або зыходны варыянт гена, склала 25,031 ад. / OD600 і 29,743 ад. / OD600 адпаведна.