

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии

ГИЛЕВСКАЯ
Александра Егоровна

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВЫСОКОТОЧНОЙ
ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ НА ОСНОВЕ БЕЛКА
СЛИЯНИЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *PYROCOCCUS FURIOSUS* И ДНК-
СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА *SULFOLOBUS SOLFATARICUS*
Дипломная работа

Научный руководитель:
и.о. заведующего лабораторией
белковой инженерии
Института биоорганической химии
НАН Беларуси,
кандидат химических наук
Янцевич Алексей Викторович

Допущена к защите
«__» _____ 2022 г.
Зав. кафедрой биохимии

кандидат биологических наук, доцент
_____ И.В. Семак

Минск, 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 41 страница, 8 рисунков, 4 таблицы, 53 источника.

ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ, ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ, МЕТАЛЛ-АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ.

Объект исследования: рекомбинантная ДНК-полимераза С43-37.

Цель исследования: увеличить процессивность Pfu-полимеразы за счет присоединения к ней ДНК-связывающего белка Sso7d путем создания рекомбинантного белка слияния.

Методы исследования: микробиологические, хроматографические, спектрофотометрические, метод гель-электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, амплификация, электрофорез в агарозном геле.

В результате проведенных исследований была экспрессирована и получена ДНК-полимераза с увеличенной процессивностью, названная С43-37. С помощью метода гель-электрофореза в полиакриламидном геле было подтверждено, что рекомбинантный белок является белком слияния Pfu-полимеразы и ДНК-связывающего Sso7d белка. Было проведено изучение эффективности данного фермента в полимеразной цепной реакции при различных условиях, исследовано влияние аддитивов на протекание реакции ПЦР в случае с ампликонами невысокой длины (<3000 п.н.). Обнаружены оптимальные условия работы фермента – 72 °С на стадии удлинения, рН 9.3 при 25 °С.

Практическая значимость исследования и область применения: разработанный протокол получения и очистки ДНК-полимеразы позволит производить ферменты с необходимыми модификациями с нуля в лабораторных условиях, что может привести к диверсификации и увеличению скорости и эффективности проводимых ординарных научных исследований. Область применения – молекулярная биология, биохимия.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 41 старніца, 8 малюнкаў, 4 табліцы, 53 крыніцы.

ДНК-ПАЛІМЕРАЗЫ, ГЕТЭРАЛАГІЧНАЯ ЭКСПРЭСІЯ, МЕТАЛ-АФІННАЯ ХРАМАТАГРАФІЯ, ПАЛІМЕРАЗНАЯ ЛАНЦУЖНАЯ РЭАКЦЫЯ,
Аб'ект даследвання: рэкамбінантная ДНК-палімераза С43-37.

Мэта даследвання: павялічыць працэсіўнасць Rfu-палімеразы за кошт далучэння да яе ДНК-звязваючага бялка Sso7d праз стварэнне рэкамбінантнага бялка зліяння.

Метады даследвання: мікрабіялагічныя, храматаграфічныя, спектрафотаметрычныя, метады гелі-электрафарэзу ў поліакрыламідным гелі ў дэнатурыруючых умовах, ампліфікацыя, электрафарэз у агарозным гелі.

У выніку праведзенных даследванняў была экспрэсавана і атрымана ДНК-палімераза з павялічанай працэсіўнасцю, якая атрымала назву С43-37. З дапамогай метаду гелі-электрафарэзу ў поліакрыламідным гелі было пацверджана, што рэкамбінантны бялок з'яўляецца бялком зліяння Rfu-палімеразы і ДНК-звязваючага бялка Sso7d. Было праведзена вывучэнне эфектыўнасці дадзенага ферменту ў палімеразнай ланцужной рэакцыі пры розных умовах, даследаваны ўплыў адытываў на працяканне рэакцыі ПЛР у выпадках з ампліконамі невялікай працягласці (<3000 п.н.). Выяўлены аптымальныя ўмовы працы ферменту – 72 °С на стадыі падаўжэння, рН 9.3 пры 25 °С.

Практычнае значэнне даследвання і вобласць выкарыстоўвання: распрацаваны пратакол атрымання і ачысткі ДНК-палімеразы дазволіць вырабляць ферменты з неабходнымі мадыфікацыямі з нуля ў лабараторных умовах, што можа прывесці да дыверсіфікацыі і павялічвання хуткасці і эфектыўнасці праводзімых ардынарных навуковых даследванняў. Вобласць выкарыстоўвання – малекулярная біялогія, біяхімія.

ABSTRACT

Thesis, 41 pages, 8 figures, 4 tables, 53 sources.

DNA-POLYMERASES, HETEROLOGICAL EXPRESSION, METAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY, POLYMERASE CHAIN REACTION.

The object of the research: recombinant DNA-polymerase C43-37.

The aim of the research: increase processivity of Pfu-polymerase through linking it to DNA-binding protein Sso7d by construction of fusion protein.

Research methods: microbiological, chromatographic, spectrophotometric, denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, agarose electrophoresis.

As a result of the research, the recombinant DNA-polymerase, called C43-37, was expressed and purified. Using polyacrylamide gel electrophoresis, it was confirmed that the recombinant protein is a fusion protein of Pfu-polymerase and DNA-binding protein Sso7d. The effectiveness of this enzyme at PCR at different conditions was confirmed, the influence of additional components on PCR reaction process with small amplicons (>3000 bp) was studied. The optimal conditions for enzyme activity were found – 72 °C on elongation stage, pH 9.3 at 25 °C.

The practical value of the research and spheres of application: the designed protocol of obtaining and purification of DNA-polymerase allows produce enzymes with necessary modifications from the beginning within laboratory conditions, and this could lead to diversification and growth of ordinary scientific research rate. Application spheres – molecular biology, biochemistry.

