

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

УГАСИНА
Елизавета Николаевна

ВЫДЕЛЕНИЕ, КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА
ЛИПАЗЫ *YARROWIA LIPOLYTICA* В *ESCHERICHIA COLI*

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
Заведующий лабораторией
ферментов Института
микробиологии НАН Беларуси,
кандидат биологических наук,
доцент
Л.И.Сапунова

Минск, 2025

РЕФЕРАТ

Дипломная работа содержит 66 страниц, 24 рисунка, 7 таблиц, 50 использованных источников.

Ключевые слова: ДРОЖЖИ, БАКТЕРИИ, ЛИПАЗА, ГЕН, РЕСТРИКЦИЯ, ЛИГИРОВАНИЕ, ВЕКТОР, КЛОНИРОВАНИЕ, ТРАНСФОРМАНТЫ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА

Объекты исследования: ген липазы дрожжей *Yarrowia lipolytica*; векторы клонирования; трансформанты *Escherichia coli*, наследующие ген липазы.

Цель работы: создание векторной системы для клонирования гена липазы дрожжей *Yarrowia lipolytica* в бактерии *Escherichia coli*.

Методы исследования: выделение геномной ДНК из клеток *Yarrowia lipolytica*; полимеразная цепная реакция (ПЦР) и продолжительно перекрывающаяся ПЦР (ПП-ПЦР) для амплификации гена липазы; электрофорез в агарозном геле для анализа размеров ДНК-фрагментов; рестрикционный анализ с использованием эндонуклеаз рестрикции; сайт-специфичное клонирование гена липазы в плазмидные векторы; лигирование фрагментов ДНК с использованием ДНК-лигазы; секвенирование нуклеотидных последовательностей по Сенгеру; трансформация клеток *Escherichia coli* методом электропорации; отбор трансформантов с использованием селективных сред с антибиотиками; определение каталитической активности ферментного белка, экспрессируемого *in vivo*.

Полученные результаты: методом ПЦР и ПП-ПЦР на матрице геномной ДНК гриба *Y. lipolytica* с использованием подобранных праймеров получены и амплифицированы фрагменты ДНК, включающие в себя гены липазы *lipA* и *lip* размером соответственно 1137 и 520 п.н. Их лигированием в плазмидные векторы сконструированы экспрессионные конструкции pFLAG-CTC-lipA и pET42a-Lip для клонирования гена липазы *Y. lipolytica* в бактерии *Escherichia coli*. Отобраны трансформанты *E. coli* BL (DE3) pET42a-Lip и *E. coli* XL1Blue pFLAG-CTC-lipA, в которых методом рестрикционного анализа и ПЦР-скрининга подтверждено наличие вставки гена липазы в составе рекомбинантных плазмид. Потверждена экспрессия каталитически активного ферментного белка трансформантом *E. coli* XL1Blue pFLAG-CTC-lipA, растущим на агаризованной дифференциально-диагностической среде со специфическим субстратом.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца ўтрымлівае 66 старонак, 24 малюнкi, 7 таблiц, 50 выкарыстаных крынiц.

Ключавыя словы: ДРОЖДЖЫ, БАКТЭРЫИ, ЛIПАЗА, ГЕН, РЭСТРЫКЦЫЯ, ЛIГАВАННЕ, ВЕКТАР, КЛАНIРАВАННЕ, ТРАНСФАРМАНТЫ, ЭКСПРЭСIЯ ГЕНА.

Аб'ект даследавання: ген лiпазы дражджэй *Yarrowia lipolytica*; вектары кланавання; трансфарманты *Escherichia coli*, якія атрымалі ў спадчыну ген лiпазы.

Мэта працы: стварэнне вектарнай сiстэмы для кланавання гена лiпазы дражджэй *Yarrowia lipolytica* у бактэрыі *Escherichia coli*.

Метады даследавання: вылучэнне геномнай ДНК з клетак *Yarrowia lipolytica*; палiмеразная ланцужковая рэакцыя (ПЛР) і працягла перакрываючай ПЛР (ПП-ПЛР) для амплiфікацыі гена лiпазы; электрафарэз у агарозным гелі для аналізу памераў фрагментаў ДНК; рэстрыкцыйны аналіз з выкарыстаннем эндануклеаз; сайт-спецыфічнае кланаванне гена лiпазы ў плазмiдныя вектары; лiгаванне фрагментаў ДНК з выкарыстаннем ДНК-лiгазы; секвенiраванне нуклеатыдных паслядоўнасцей па Сэнгеру; трансфармацыя клетак *Escherichia coli* метадам электрапарацыі; адбор трансфармантаў з выкарыстаннем селектыўных асяроддзяў з антыбіётыкамі; вызначэнне каталiтычнай актыўнасці ферментнага бялку, які экспрэсiруецца *in vivo*.

Атрыманыя вынікі: метадамі ПЛР і ПП-ПЛР на матрыцы геномнай ДНК грыба *Y. lipolytica* з выкарыстаннем падабраных праймераў атрыманы і амплiфікаваны фрагменты ДНК, што ўключаюць гены лiпазы *lipA* і *lip* памерам адпаведна 1137 і 520 п. н. Iх лiгаваннем у плазмiдныя вектары былі сканструяваны экспрэсiйныя канструкцыі pFLAG-CTC-lipA і pET42a-Lip для кланiравання гена лiпазы *Y. lipolytica* ў бактэрыі *Escherichia coli*. Атрыманы трансфарманты *E. coli* BL (DE3) pET42a-Lip і *E. coli* XL1Blue pFLAG-CTC-lipA, у якіх метадамі рэстрыкцыйнага аналізу і ПЛР-скрынiнгу пацверджана наяўнасць устаўкі гена лiпазы ў складзе рэкамбiнантных плазмiд. Пацверджана экспрэсiя каталiтычна актыўнага ферментнага бялку трансфармантам *E. coli* XL1Blue pFLAG-CTC-lipA, які расце на агарызаваным дыферэнцыяльна-дыягнастычным асяроддзі са спецыфічным субстратам.

ABSTRACT

Graduated work contains 66 pages, 24 figures, 7 tables, 50 sources used.

Keywords: YEAST, BACTERIA, LIPASE, GENE, RESTRICTION, LIGATION, VECTOR, CLONING, TRANSFORMANTS, GENE EXPRESSION.

Object of the study: the lipase gene from *Yarrowia lipolytica* yeast; cloning vectors; *Escherichia coli* transformants carrying the lipase gene.

Purpose: to develop a vector system for cloning the lipase gene from *Yarrowia lipolytica* into *Escherichia coli* bacteria.

Research method: isolation of genomic DNA from *Yarrowia lipolytica* cells; polymerase chain reaction (PCR) and prolonged overlapping PCR (PO-PCR) for the amplification of the lipase gene; agarose gel electrophoresis for DNA fragment size analysis; restriction analysis using restriction endonucleases; site-specific cloning of the lipase gene into plasmid vectors; ligation of DNA fragments using DNA ligase; Sanger sequencing of nucleotide sequences; transformation of *Escherichia coli* cells by electroporation; selection of transformants on antibiotic-containing selective media; determination of the catalytic activity of the expressed enzyme protein *in vivo*.

Results obtained: using PCR and PO-PCR on genomic DNA from *Y. lipolytica* with selected primers, DNA fragments containing the *lipA* and *lip* lipase genes (1137 bp and 520 bp, respectively) were obtained and amplified. These fragments were ligated into plasmid vectors to construct the expression plasmids pFLAG-CTC-lipA and pET42a-Lip for cloning the *Y. lipolytica* lipase gene into *Escherichia coli*. Transformants *E. coli* BL (DE3) pET42a-Lip and *E. coli* XL1Blue pFLAG-CTC-lipA were obtained, and the presence of the lipase gene insert in the recombinant plasmids was confirmed by restriction analysis and PCR screening. The expression of a catalytically active enzyme protein by the *E. coli* XL1Blue pFLAG-CTC-lipA transformant was confirmed on a differential diagnostic agar medium containing a specific substrate.