

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра молекулярной биологии

Аннотация к дипломной работе

ВАСИЛЬКОВА
Александра Александровна

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА *CITJ PESTOVACTERIUM*
***VERSATILE* В ЭКСПРЕССИОННОМ ВЕКТОРЕ PET24B**

Научный руководитель:
Ассистент кафедры,
М. А. Шарангович

Научный консультант:
Кандидат биологических наук,
доцент Николайчик Е. А.

Минск, 2025

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 47 с., 11 рис., 2 табл., 43 источника.

Ключевые слова: *Pectobacterium versatile*, фитопатогенные бактерии, транскрипционные факторы, *citJ*, семейство GntR, клонирование, экспрессионный вектор pET24b.

Объект исследования: *Pectobacterium versatile* 3-2

Цель: клонирование гена *citJ* из бактерии *Pectobacterium versatile* в экспрессионный вектор pET24b с последующим анализом экспрессии белка.

Материалы и методы: штаммы *Escherichia coli* (DH5 α , BL21(DE3)) и *Pectobacterium versatile* JN42, вектор pET24b и его производная конструкция с геном *citJ*. Для клонирования применяли стандартные молекулярно-биологические методы: выделение плазмидной ДНК, ПЦР, рестрикцию и лигирование. Конструкции трансформировали в *E. coli* с использованием хлорида кальция и электропорации. Экспрессию гена индуцировали IPTG. Очистку белка проводили с использованием никель-аффинной хроматографии. Электрофорез в агарозном и полиакриламидном геле применяли для анализа ДНК и белков соответственно. Использовались стандартные питательные среды и буферы, приготовленные по утверждённым протоколам.

В ходе работы было установлено, что белок CitJ экспрессируется, но полностью локализуется в нерастворимой фракции. Попытки очистки с помощью Ni-NTA сорбентов оказались неэффективны. Рефолдинг не дал стабильной растворимой формы белка. Секвенирование показало наличие делеции в конструкции pET24b::citJ(16), что, вероятно, повлияло на структуру белка. Конструкция pET24b::citJ(13) мутаций не содержит и перспективна для дальнейшей работы.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 47 с., 11 мал., 2 табл., 43 крыніцы.

Ключавыя словы: *Pectobacterium versatile*, фітапатагенныя бактэрыі, транскрыпцыйныя фактары, *citJ*, сямейства GntR, кланаванне, экспрэсійны вектар pET24b.

Аб'ект даследавання: ген *citJ* бактэрыі *Pectobacterium versatile*, кланаваны ў экспрэсійнам вектары pET24b

Мэта даследавання: кланаванне ген *citJ* бактэрыі *Pectobacterium versatile* у экспрэсійнам вектары pET24b з наступным аналізам экспрэсіі бялку.

Матэрыялы і метады: штамы *Escherichia coli* (DH5 α , BL21 (DE3)) і *Pectobacterium versatile* JN42, вектар pET24b і яго вытворная канструкцыя з генам *citJ*. Для кланавання ўжывалі стандартныя малекулярна-біялагічныя метады: вылучэнне плазміднай ДНК, ПЦР, рэстрыкцыю і лігіраванне. Канструкцыі трансфармавалі ў *E. coli* з выкарыстаннем хларыду кальцыя і электрапарацыі. Экспрэсію гена індукавалі IPTG. Ачышчэнне бялку праводзілі з выкарыстаннем нікель-афіннай храматаграфіі. Электрафарэз у агарозным і поліакрыламідным гелі ўжывалі для аналізу ДНК і бялкоў адпаведна. Выкарыстоўваліся стандартныя пажыўныя асяроддзя і буферы, прыгатаваныя па зацверджаных пратаколах.

У ходзе работы было ўстаноўлена, што бялок CitJ экспрэсуецца, але цалкам лакалізуецца ў нерастваральнай фракцыі. Спробы ачысткі з дапамогай Ni-NTA сарбентаў апынуліся неэфектыўныя. Рэфолдынг не даў стабільнай растваральнай формы бялку. Секвеніраванне паказала наяўнасць дэлецыі ў канструкцыі pET24b::*citJ*(16), што, верагодна, паўплывала на структуру бялку. Канструкцыя pET24b::*citJ*(13) мутацый не ўтрымоўвае і перспектыўная для далейшай працы.

ABSTRACT

Diploma project 47 p., 11 figures., 2 tables, 43 sources.

Keywords: *Pectobacterium versatile*, phytopathogenic bacteria, transcription factors, *citJ*, GntR family, cloning, pET24b expression vector.

Object of the research: the *citJ* gene of the bacterium *Pectobacterium versatile*, cloned into the pET24b expression vector

The aim of the research: cloning of the *citJ* gene from the bacterium *Pectobacterium versatile* into the pET24b expression vector, followed by protein expression analysis.

Materials and methods: strains of *Escherichia coli* (DH5a, BL21(DE3)) and *Pectobacterium versatile* JN42, vector pET24b and its derivative construct with the *citJ* gene. Standard molecular biology methods were used for cloning: plasmid DNA isolation, PCR, restriction, and ligation. The constructs were transformed into *E. coli* using calcium chloride and electroporation. The expression of the gene was induced by IPTG. Protein purification was performed using nickel–athene chromatography. Electrophoresis in agarose and polyacrylamide gel was used for DNA and protein analysis, respectively. Standard nutrient media and buffers prepared according to approved protocols were used.

We found that the CitJ protein is expressed, but is completely localized in the insoluble fraction. Attempts at purification using Ni-NTA sorbents were ineffective. Refolding did not give a stable soluble form of the protein. Sequencing showed the presence of a deletion in the pET24b::*citJ*(16) construct, which probably affected the protein structure. The pET24b::*citJ*(13) construct does not contain mutations and is promising for further work.