

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра генетики

ХОДОСЕВИЧ
Елена Александровна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА
ШТАММА *ENTEROCOCCUS FAECALIS* БИМ В-1012 -
ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ**

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент А.В. Лагодич

Минск, 2014

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 59 с., 6 рис., 17 табл., 53 источника
МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА, ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА,
ENTEROCOCCUS FAECALIS, ПЛАЗМИДА, ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ,
НАСЛЕДОВАНИЕ, ПДРФ-АНАЛИЗ

Объекты исследования: *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012, *Echerichia coli* DH5- α .

Цель работы: охарактеризовать бактериальный штамм *E. faecalis* БИМ В-1012 и его мутантные формы как перспективный продуцент L-молочной кислоты: подобрать условия для культивирования и трансформации (электропорации) клеток штамма *E. faecalis* БИМ В-1012, изучить характер наследования плазмид в клетках штамма *E. faecalis* БИМ В-1012, определить активность лактатдегидрогеназы исходного штамма и его мутантных форм, амплифицировать ген лактатдегидрогеназы и осуществить верификацию с помощью ПДРФ-анализа.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов, изучение кинетики роста и интенсивности роста при различных условиях, определение спектра и уровня антибиотикорезистентности, метод реплик); молекулярно-генетические (электропорация, выделение и очистка ДНК, электрофоретический анализ, рестрикционный анализ, ПЦР, ПДРФ-анализ); биохимические (измерение активности лактатдегидрогеназы), спектрофотометрия.

В результате проведенной работы были подобраны условия для культивирования и электропорирования клеток штамма *E. faecalis* БИМ В-1012. Осуществлен анализ наследования различных векторных молекул в клетках штамма *E. faecalis* БИМ В-1012, определена их сохранность за 20 генераций в неселективных условиях. Для плазмиды рJIM2279 сохранность репликаона в клетках штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 составила около 70 %, при этом изменений в размере и организации молекулы выявлено не было.

Были подобраны условия для получения клеточного лизата с последующим определением ферментативной активности. Показано, что оптимальным способом разрушения клеток является их ультразвуковая дезинтеграция. Определена активность лактатдегидрогеназ у штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 и его кислотоустойчивых мутантов. С помощью сконструированных праймеров получен продукт амплификации, представленный последовательностью гена ЛДГ-1. С помощью ПДРФ-анализа было выявлено новое аллельное состояние изучаемого гена.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца 59 с., 6 мал., 17 табл., 53 крыніцы
МАЛОЧНАЯ КІСЛАТА, ЛАКТАТДЭГІДРАГЕНАЗА,
ENTEROCOCCUS FAECALIS, ПЛАЗМІДА, ЭЛЕКТРАПАРАЦЫЯ,
УСПАДКОЎВАННЕ, ПДРФ-АНАЛІЗ

Аб'екты даследавання: *Enterococcus faecalis* БІМ В - 1012, *Echerichia coli* DH5 - α

Мэта даследавання: ахарактарызаваць бактэрыяльны штамм *E. faecalis* БІМ В- 1012 і яго мутантныя формы як перспектыўных прадукцэнтаў L-малочнай кіслаты: падабраць умовы для культывавання і трансфармацыі (электрапарацыі) клетак штаму *E. faecalis* БІМ В - 1012, вывучыць характар успадкоўвання плазмід у клетках *E. faecalis* В - 1012, вызначыць актыўнасць лактатдэгідрагеназы зыходнага штаму і яго мутантных форм, ампліфіцыраваць ген лактатдэгідрагеназы і ажыццявіць верыфікацыю з дапамогай ПДРФ-аналізу.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў, вывучэнне кінэтыкі росту і інтэнсіўнасці росту пры розных умовах, вызначэнне спектру і ўзроўню антыбіётыкарэзістэнтнасці, метады рэплік), малекулярна - генетычныя (электрапарацыя, вылучэнне і ачыстка ДНК, электрафарэтычны аналіз, рэстрыкцыйны аналіз, ПЦР, ПДРФ-аналіз), біяхімічныя (вымярэнне актыўнасці лактатдэгідрагеназы, спектрафотаметрыя).

У выніку праведзенай работы былі падабраны ўмовы для культывавання і электрапарывавання клетак штаму *E. faecalis* БІМ В- 1012. Ажыццяўлён аналіз успадкоўвання розных вектарных малекул у клетках штаму *E. faecalis* БІМ В - 1012, усталявана іх захаванасць праз 20 генерацый у неселектыўных умовах. Для плазміды рІІМ2279 захаванасць рэплікона ў клетках штаму *E. faecalis* БІМ В - 1012 складала каля 70 %, пры гэтым змяненняў у памеры і арганізацыі малекулы не было выяўлена.

Былі падабраны ўмовы для адтрымання клеткавага лізата з наступным вызначэннем ферментатыўнай актыўнасці. Паказана, што аптымальным спосабам разбурэння клетак з'яўляецца іх ультрагукавая дэзінтэграцыя. Вызначана актыўнасць лактатдэгідрагеназы ў штаме *E. faecalis* БІМ В- 1012 і яго кіслатаўстойлівых мутантаў. З дапамогай сканструяваных праймераў быў атрыманы прадукт ампліфікацыі, прадстаўлены паслядоўнасцю гена ЛДГ-1. З дапамога ПДРФ-аналізу быў выяўлены новы аллельны стан вывучаемага гена.

ABSTRACT

Diploma work with 59 p., 6 fig., 17 tables., 53 sources

LACTIC ACID, LACTATE DEHYDROGENASE, *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, PLASMIDS, ELECTROPORATION, INHERITANCE, RFLP-ANALYSIS

Objects of study: *Enterococcus faecalis* BИM B - 1012 , *Echerichia coli* DH5- α

Mission: to characterize the bacterial strain *E. faecalis* BИM B - 1012 and its mutants forms as a perspective producer of L-lactic acid: to select the conditions for cultivation and transformation (electroporation) of cells of the strain *E. faecalis* BИM B - 1012, to study the nature of inheritance of plasmids in the strain *E. faecalis* BИM B - 1012, to measure the activity of lactate dehydrogenase of initial strain and its mutants forms, to amplify the lactate dehydrogenase gene and perform verification using RFLP – analysis.

Methods of research: microbiological (cultivation of microorganisms, studying of the growth kinetics and growth rate under different conditions, identification of the spectrum and the level of antibiotic resistance , the replica method), methods of molecular genetics (electroporation, extraction and purification of DNA, electrophoresis analysis, restriction analysis, PCR, RFLP - analysis), biochemical (the measurement of lactate dehydrogenase activity) spectrophotometry.

As a result of a conducted work there have been chosen the condinions for cultivating and electroporation of cells of the strain *E. faecalis* BИM B - 1012. The analysis of the inheritance of different vector molecules in the cells of the strain *E. faecalis* BИM B- 1012 has been carried out, the preservation of it for 20 generations under nonselective conditions has been defined. Plasmid pJIM2279 shows high stability in the cells of the strain *E. faecalis* BИM B- 1012. Preservation of replicon in cells with non-selective culture conditions for 20 generations is more than 70 %, while the changes in the size and organization of molecules haven't been identified.

Conditions were chosen to obtain a cell lysate to provide the following determination of enzyme activity. It has been shown that the optimal method of destruction of cells is ultrasonic disintegration. The activity of lactate dehydrogenase of the strain *E. faecalis* BИM B- 1012 and its asid-resistant mutants has been defined. The product of amplification represented by the sequence of the gene LDH-1 has been obtained using designed primers. A new allelic state of the studied gene has been revealed by using RFLP-analysis.