БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи Код 57

УДК 574/577

Соколюк Анна Владимировна

Применение IT в молекулярно-генетических исследованиях бактерий

Выпускная работа по дисциплине:  
«Основы информационных технологий»

Магистранта кафедры генетики  
биологический факультет

Специальность: 1-31.80.01 – биология

Рецензент:   
\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Минск, 2017

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

[ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СИМВОЛОВ 3](#_Toc500149450)

[ВВЕДЕНИЕ 4](#_Toc500149451)

[Общая харрактеристика работы 5](#_Toc500149452)

[ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 7](#_Toc500149453)

[1.1 Характеристика молочной кислоты 7](#_Toc500149454)

[1.2 Молочнокислые бактерии и их использование 9](#_Toc500149455)

[1.3 Технологии улучшения инкубации продуцентов молочной кислоты 9](#_Toc500149456)

[ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 11](#_Toc500149457)

[2.1 Объект исследования 11](#_Toc500149458)

[2.2 Среды и растворы 11](#_Toc500149459)

[2.3 Методы исследования 13](#_Toc500149460)

[2.3.1 Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса 13](#_Toc500149461)

[2.3.2 Выделение плазмидной ДНК методом kit 14](#_Toc500149462)

[2.3.3 Протокол рестрикции 15](#_Toc500149463)

[2.3.4 Проверка эффективности применения методов на плазмидной ДНК в агарозном геме с помощью электрофореза 15](#_Toc500149464)

[2.3.5 Протокол подготовки вектора и вставки к лигированию. 16](#_Toc500149465)

[2.3.6 ПЦР. 16](#_Toc500149466)

[2.3.7 Трансформация клеток E.coli. 17](#_Toc500149467)

[ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 19](#_Toc500149468)

[ЗАКЛЮЧЕНИЕ 27](#_Toc500149469)

[БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК 28](#_Toc500149470)

[ПРИЛОЖЕНИЕ 31](#_Toc500149471)

[ПРИЛОЖЕНИЕ А 31](#_Toc500149472)

[Презентация выпускной работы 31](#_Toc500149473)

[ПРИЛОЖЕНИЕ В 32](#_Toc500149474)

[Ссылка и скриншот сайта выпускной работы 32](#_Toc500149475)

# ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СИМВОЛОВ

|  |  |
| --- | --- |
| АДФ | Аденозиндифосфат |
| АТФ | Аденозинтрифосфат |
| Мкл | Микролитр |
| НАД | никотинамидаденидинуклеотид |
| Нг | нанограммы |
| пм | пика моль |
| п. о. | пары оснований |
| т. п. н. | тысяч пар нуклеотидов |
| ldhD(LDG) | ген лактатдегидрогеназы Д |
| ldh L(LDG) | ген лактатдегидрогеназы Л |
| LDG1 | лактатдегтдрогеназа 1-го типа |
| LDG2 | лактатдегтдрогеназа 2-го типа |

# ВВЕДЕНИЕ

# Общая харрактеристика работы

Объекты исследования: *Enterococcus faecalis* БИМ B-1012

Целью работы является получение молекулярно-генетической модели организации и функционирования лактатдегидрогеназ штамма *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012, пригодной для отработки приемов повышения его биотехнологического потенциала как продуцента молочной кислоты

Методы исследования: микробиологические (проводилось культивирование целевых штаммов), молекулярно-генетические (производилось выделение и очистка ДНК, трансформация, ресктрикционный и электрофоретический анализы, ПЦР, клонирование), биоинформационные (моделировались пространственные структуры белков, определялись соответствующие им свойства).

В ходе работы были получены первичные нуклеотидные последовательности для генов *ldg1* и *ldg2*, анализ которых позволил подобрать праймеры для амплификации генов лактатдегидрогеназ первого и второго типов штамма *Enterococcus faecalis* БИМ И-1012.

Была получена генетическая конструкция на основе вектора pMTL21C, содержащая ген ldg1, пригодная для изучения функциональной активности лактатдегидрогеназ первого типа.

Осуществлен анализ последовательности генов *ldg1* и *ldg2* и детерминируемых ими продуктов штамма *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012. При сравнении полученных последовательностей видно, что белки LDG1и LDG2сходны в общей организации, в то время как гены *ldg1* и *ldg2* имеют низкую степень гомологии нуклеотидных последовательностей ‑ 44 % Было выяснено, что по пространственной структуре белки LDG1 и LDG2 представляют собой гомотетрамеры и имеют цитоплазматическую локализацию в клетке.

Молочная кислота достаточно широко распространена в природе и свое тривиальное название получила в связи с тем, что была выделена из прокисшего молока. Как правило, в природе она образуется в ходе молочнокислого брожения различных сахаров, появляясь в прокисшем молоке, вине и пиве. Образуется молочная кислота и в живых организмах, например у человека она присутствует в мышцах, являясь продуктом обмена в результате анаэробного гликолиза. Неоспоримой пользой лактата для живых организмов является его использование в виде источника энергии, а так же сырья для последующего синтеза гликогена и глюкозы. В настоящее время результаты исследований мышечной системы человека доказывают пользу молочной кислоты для роста мышц, в связи с тем, что она вызывает расширение сосудов, что приводит к улучшению кровотока, позволяя крови лучше транспортировать кислород к мышцам.

Свое применение молочная кислота находит в большинстве сфер жизни человека. Её используют и в пищевой, и в кожевенной, и в легкой промышленностях, так же лактат занимает значимое место по применению как в медицине, так и в ветеринарии.

По своему строению молочная кислота относится к простейшим гидроксикислотам, имея асимметричный атом углерода, который обеспечивает данному соединению наличие двух форм оптических изомеров – D(или R) и L(или S). D-изомер, в отличии от L-формы молочной кислоты, организмом не усваивается. В организме человека и животных вырабатывается именно L-молочная кислота. Так же она является безопасной добавкой в пище и используется при создании медикаментов, в связи с чем L-молочная кислота представляет большой интерес для медицинской промышленности. Благодаря широкому применению молочной кислоты в различных отраслях жизни человека, вопрос о создании её продуцентов, продуцирующих оптически чистую молочную кислоты, является весьма актуальным.

Молочная кислота может быть получена двумя способами: физико-химическим и биотехнологической ферментацией. Биотехнологическая ферментация осуществляется с привлечением инструментов генной инженерии. Подобный способ получения молочной кислоты является наиболее интересным, в связи с экологическими проблемами и ограниченностью нефтехимического сырья, необходимого для получения лактата физико-химическим способом. Рацемическую смесь D и L молочной кислоты получаются путем химического синтеза, но вот оптически чистую L- молочную кислоту или D- молочную кислоту можно получить путем микробной ферментации, использую как природных продуцентов молочной кислоты, так и генетически измененных организмов, обладающих увеличенным выходом одной из кислот. Природными продуцентами молочной кислоты являются такие виды бактерий как: *Streptococcus faecalis, Lactobacillus casei, Streptococcus lactis, Streptococcus faecium, Leuconostoc mesenteroides, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus lactis, Enterococcus faecalis*. Также в качестве продуцентов выступают дрожжи. [22].

# ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## Характеристика молочной кислоты

Молочная кислота впервые была выделенная в 1780г шведским ученым-химиком Шееле, и получила свое название благодаря тому, что найдена была в прокисшем молоке. В последующем выяснилось, что точно такая же кислота образуется в процессе закисания капусты и других различных овощей и плодов, а также при созревании сыра. Чуть позже, в 1832 г. благодаря Либиху, выяснилось, что кислота с таким же строением содержится и в мышечной ткани человека и животных. Позже выяснилось, что молочная кислота образовавшаяся в ходе брожения и образующаяся в процессе мышечной работы являются одинаковыми. [1]

Лактат, или молочная кислота, по физическим характеристикам является прозрачной вязкой жидкостью с кислым вкусом и характерным кислотным запахом. Его химическая формула СН3СН(ОН)СООН, а «молочная кислота» лишь тривиальное название. С точки зрения химического строения, каждая молекула молочной кислоты содержит асимметрически замещенный атом углерода, благодаря наличию которого она может существовать в виде двух оптически активных формах: L молочная кислота при температуре 25-26°С и D молочная кислота при температурной плотности 25-26°С как показано на рисунке 1. [2]

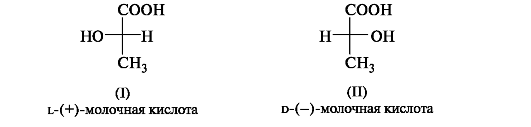


Рисунок 1.1 – Структурная формула молочной кислоты

Результатом молочнокислого брожения является образование рацемической смеси оптически неактивной молочной кислоты.

В повседневной жизни такая молочная кислота образовывается при скисании молока, квашенной капусты, в разнообразных соленьях, выполняя функцию консерванта, так как способна препятствовать развитию гнилостных бактерий.

Как правило правовращающая форма D молочной кислоты образуется в результате молочнокислого брожения. Левовращающая L –форма образуется в результате расщепления углеводов. Особенно много её накапливается в мышцах при больших физических нагрузках. [3]

Молочная кислота очень важна в жизни человека. Она и её производные активно применяются в пищевой промышленности, используются в медицине и ветеринарии, а также для различных технических целей. [4]

Лактат используется в консервной, мясоперерабатывающей, рыбной, молокоперерабатывающей, масложировой и других отраслях пищевой промышленности. Так же применяется для производства безалкогольных напитков и некоторых сортов пива, кондитерских изделий. [5] Молочная кислота как правило придает продуктам лучший вкус, а также обладает профилактическими свойствами и с успехом может использоваться вместе с уксусной и лимонной кислотами. [6] В пищевых продуктах разрешено использование таких лактатов, как лактат натрия (Е325), калия (Е326), кальция (Е327), аммония (Е328) и магния (Е329). Они применяются при изготовлении безалкагольных напитков, карамельных масс, различных кисломолочных продуктов.

В сельском хозяйстве лактат используется для приготовления и консервирования кормов. [4] Она давно применяется в виде противобродильного вещества преджелудков жвачных. Также она улучшает процессы обмена веществ, возбуждает деятельность пищеварительных желез и повышает половую активность [7]

В производстве косметики: увлажняющие свойства молочная кислота входит в состав комплекса веществ, обеспечивающих влагоудерживающие свойства; отшелушивание. Это качество молочной кислоты используется для удаления следов и рубцов после угрей; антираздражающие свойства; улучшает толщину и состояние кожи.[8]

Молочная кислота используется для вымачивания льна и кожи в кожевенной отросли промышленности. Лактаты применяются в качестве аналогов антикоррозионных агентов в растворах антрифризов. [4]

Молочная кислота в промышленности производится химическим (50%) и ферментативным (50%) синтезами. Химический синтез получения лактата основан на реакции ацетальдегида с цианистым водородом, в результате которой образуется лактонитрил, гидролиз которого дает собственно молочную кислоту. При получении молочной кислоты с помощью молочнокислых бактерий и химическим синтезом образуется оптически недеятельная D,L-молочная кислота. L(+)-Молочную кислоту образуют молочнокислые стрептококки, а *Lactobacillus lactis и Lactobacillus bukgaricus* продуцируют около 90% D (–)-молочной кислоты.

## 1.2 Молочнокислые бактерии и их использование

Молочнокислые бактерии принадлежат к таким семействам, как *Lactobacteria и Streptococcaceae*. Это морфологически гетерогенная группа бактерий, так как включает в себя и палочковидные,и сферические организмы. Эти бактерии относятся к грамположительным, не образуют эндоспор (кроме *Sporolactibacillus inulinus*) и практически все неподвижны.

Молочнокислые бактерии можно разделить на две подгруппы разделив и по образующимся в результате брожения из глюкозы продуктам:

Гомоферментативные образующие практически только одну молочную кислоту. Сюда относятся бактериивидов *Lactococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus helveticus, Lactobacillusplantarum, Enterococcus faecalis и* др.

Гетероферментативные образующие смесь молочной кислоты, этанола, углекислого газа, а иногда и уксусной кислоты. Сюда относят бактерий видов *Leuconostoc mesenteroides, Leuconostocdextranicum, Lactobacillusbrevis, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus celobiosus* и др.

В естественных условиях они встречаются: в молоке и молочных продуктах, а также в местах переработки молока; на поверхности растений, в качестве эпифитной микрофлоры и на разлагающихся растительных остатках, в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных как представители нормальной.

Молочнокислые бактерии используются для приготовления:

1) силоса;

2) квашеной капусты, огурцов и др. (*Leuconostos mesenteroides и Lactobacillus plantarum*);

3) молочнокислых продуктов.

4) сырокопченых колбас.

5) кислого теста в хлебопечении6) получения чистой молочной кислоты, которая применяется в кожевенной, текстильной, фармацевтической, пищевой промышленности и для получения биодеградируемых полилактидов, используемых для упаковки пищевых продуктов. [10]

## 1.3 Технологии улучшения инкубации продуцентов молочной кислоты

Для увеличения продуктивности процесса производства молочной кислоты существует ряд подходов, направленных на изменения условий инкубации молочнокислых бактерий: изменение состава питательной среды; изменения уровня оптимальной температуры и рН. [11]

Немаловажным фактором в процессе получения молочной кислоты является состав субстрата, на котором будет развиваться продуцент. Например, при использовании в качестве продуцентов обычные микроорганизмы, умеренно термофильных кисломолочных бактерий, *Rhizopus* и *Aspergillus*, в качестве субстрата используется концентрированный сырой свекольный сок, что является экономически выгодным в промышленных масштабах. [12]

Весьма интересным подходом выбора продуцентов для получения молочной кислоты является выбор смешанной бактериальной культуры. В такую культуру обязательно должны входить по меньшей мере один представитель гомоферментативных молочнокислых бактерий и гетероферментативных молочнокислых бактерий. Такой способ позволит данной культуре расщеплять не только гексозы, но и пентозы. [14]

Для того, чтобы сделать процесс получения молочной кислоты менее затратным и легким, существуют разработки по замене сахара. Одним из таких способ является осахаривание крахмала ферментированной и сжиженной смесью глюкоамилазы и альфа-амилазы. Дополнительным преимуществом данного способа является возможность использования сырого крахмала, так как низкие остаточные количества сахара, требуют использования небольшого количества очищенного крахмала в качестве исходного продукта. [13]

Как пример изменения условий инкубации молочнокислых бактерий – это изменение pH до 4 или даже меньше, при температуре от 30 до 50°С в питательной среде содержащей кукурузную воду. Кукурузная вода используется в качестве питательной среды, включает в себя глюкозу, фруктозу или их смесь, дрожжевой экстракт, неионогенные поверхностно-активные вещества, фосфат калия, сульфат магния, сульфат марганца, цитрат амония, карбонат кальция и др. Данный способ получения молочной кислоты включает в себя инкубирование гомоферментативных молочнокислых бактерий в питательной среде с получением ферментативного бульона с высоким уровнем свободной молочной кислоты. [15]

# ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 2.1 Объект исследования

Таблица 2.1 - Характеристика бактерий и плазмид использованных в работе

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Название штамма** | **Характеристика** | **Источник** |
| E. coli DH5α | fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 | [31] |
| E. coli XL1-Blue | F'::Tn10(TcR) proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1, gуrA96(NalR) thi hsdR17 (rk-mk+) glnV44 relA1 lac | [32] |
| **Название плазмиды** | **Характеристика** | **Источник** |
| pMTL21C | AmpR, CmR. ColE-репликон, tac-промотор, полилинкер (3,543kb). | [33] |

## 2.2 Среды и растворы

В работе использовались:

1.Питательный бульон:

Питательный бульон для культивирования микроорганизмов (на основе рыбного гидролизата) 20 г

Дистиллированная вода 1 л

С помощью NaOH pH доводили до 7

Стерилизовали путем автоклавирования при 0,5 атм. 30 минут .

2. Отмывающий раствор

Tris 25 мМ рН 8.0 на 500мл: Tris 1М рН 8.0 12,5мл

EDTA 10 мМ рН 8.0 EDTA 0,5 М рН 8.0 10,0мл

NaCl 150 мМ NaCl 5 М 15,0мл

Дистиллированная вода до 500мл

3. Физиологический раствор 0,9 %

NaCl 0.9г

Дистиллированная вода 1 л

Стерилизовали путем автоклавирования при 0,5 атм. 30 минут.

4. Раствор I

глюкоза 50мМ на 250мл: глюкоза 2,475г

EDTA 10мМ рН 8.0 EDTA 0,5М 5мл

Tris 25мМ рН 8.0 Tris 1,0М рН 8 6,25мл

Дистиллированная вода до 250мл

5. Раствор II

SDS 1% на 20мл: SDS 10% 2мл

NaOH 0,2н 2н NaOH 2мл

Дистиллированная вода 16мл

6. Раствор III

ацетат К 3(5)М рН4,8 на 500мл: 5М ацетат К 147,21г

титровать уксусной кислотой

Дистиллированная вода до 500 мл

7. ТЕ-буфер

10мМ Tris-HCl, рН=7,2 на 50 мл: Tris 1М рН 8.0 0,5мл

1мМ EDTA , рН=8 EDTA 0,5 М рН 8.0 0,2мл

Дистиллированная вода до 50мл

8. Агарозный гель для электрофореза:

Агароза 1 г

ТАЕ-буфер (1Х) до 100 мл

9.ТАЕ-буфер(1Х)

ТАЕ(50Х) 20 мл

Этидиум бромид 30мкл

Дистиллированная вода До 1 л

10.Агаризованная полноценная среда(на основе рыбного гидролизата):

|  |  |
| --- | --- |
| Агар-агар бактериологический (порошок) | 4.5 г |
| Питательный бульон для культивирования микроорганизмов | 300 мл |
| Доводили pH до 7,0-7,1.  Стерилизовали путем автоклавирования при 0,5 атм 45 минут. | |

## 2.3 Методы исследования

### 2.3.1 Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

Для выделения плазмидной ДНК подготавливаем ночную культуру.

Плазмидную ДНК из Escherichia coli GM2163 выделяли методом щелочного лизиса с модификациями по ниже изложенной методике:

Выделение из 2мл (V) культуры.

1. 1,5 – 2,0 мл ночной культуры, выращенной с селективным агентом, перенести в эппендорф, осадить ценрифугированием 8.000х5-7 мин, супернатант слить.
2. К осадку добавить 1.0 мл отмывающего раствора, ресуспендировать пипетманом или на блендоре (вортекс 10 –15 сек).
3. Биомассу осадить ценрифугированием 8.000х5-7 мин, супернатант слить.
4. К осадку добавить 200мкл (1/10 V) р-ра I, ресуспендировать пипетманом или на блендоре (вортекс 10 –15 сек). Инкубировать при 37˚С 15-30 мин.
5. Добавить 400мкл (2/10 V) р-ра II, перемешать, но не интенсивно (достаточно медленно перевернуть эппендорф 3-4 раза). Наблюдается полное просветление жидкости. Больше 10 мин не держать во втором растворе.
6. Добавить 300мкл (1,5/10 V) р-ра III. Выпадают белые хлопья. После можно и желательно перемешать, но не интенсивно (достаточно медленно перевернуть эппендорф 3-4 раза). Инкубировать 15-30 мин на льду (я всегда ставлю в морозилку на -20˚С).
7. Центрифугировать 18-20.000g 30 мин при 0… + 4˚С.
8. Отобрать супернатант, к нему добавить 600мкл (3/10 V или 0,6 от конечного объема) изопропанола, перемешать - перевернуть эппендорф 3-4 раза.
9. Центрифугировать от 8.000 до 13.000 об/мин 10-15 мин при 0… + 4˚С. Супернатант слить.
10. К осадку добавить 200мкл ТЕ-буфера, ресуспендировать: ДНК до 7-8 kb - пипетманом или вортекс 10 –15 сек, 7 – 15 kb аккуратно пипетманом, более 15 kb вращать эппендорф.
11. Добавить 200мкл (равный объем) 10-12М LiCl или 8М ацетата аммония, и инкубировать при -20˚С 3,5 и 0,5 часа соответственно.
12. Осадить белок центрифугированием 18-20.000g 15 мин при 0… + 4˚С. (режим как и в п.7.).
13. Отобрать супернатант, к нему добавить 250мкл (0,6 от конечного объема) изопропанола или 900мкл 96% этанола, перемешать - перевернуть эппендорф 3-4 раза и на 30 мин в морозильник на -20˚С.
14. Центрифугировать от 8.000 до 13.000 об/мин 10-15 мин при 0… + 4˚С. Супернатант слить.
15. К осадку добавить 100-200мкл 70% этанола, перевернуть эппендорф 1-3 раза, центрифугировать от 8.000 до 13.000 об/мин 10-15 мин при 0… + 4˚С.
16. Супернатант слить, можно отобрать пипетманом, эппендорф сушить на фильтровальной бумаге 0,5 – 2,0 часа (до полного исчезновения явных признаков жидкости).
17. Осадок растворить в 20 мкл (1/100 V исходный) TE-буфера или деионизированной воды. Хранить при -20˚С.

### 2.3.2 Выделение плазмидной ДНК методом kit

Выделение плазмиды с помощью набора для выделения ДНК Thermo Scientific GeneJet Plasmid Miniprep Kit( #K0502, #K0503). Все стадии проводить при комнатной температуре.

Центрифугирование 13000-14000 об/мин

1.Осадить клетки центрифугированием 2 мин. Супернатант слить, осадок ресуспензировать в 250 мкл Resuspension Solution.Затем центрифугировать 1-2 минуты и перемешать на вортексе.

2.Добавить 250 мкл лизирующего раствора, тщательно перемешать, аккуратно переворачивая эппендорф 4-6 раз, пока раствор не станет вязким и более прозрачным.

Примечание. Не использовать вортекс, чтобы не нарушить хромосомную ДНК и не инкубировать более 5 минут, чтобы избежать денатурации суперспиральной плазмидной ДНК.

3.Добавить 350 мкл Нейтрализирующего раствора. Перемешать быстро и тщательно, но не резко, переворачивая эппендорфы 4-6 раз. Примечание. Важно хорошо перемешать смесь после добавления Нейтрализирующего буфера во избежание осаждения бактериального клеточного мусора. Наблюдается помутнение раствора.

4.Центрифугирование 5 минут для осаждения клеточного мусора и хромосомной ДНК.

5.Супернатант перенести в GeneJET колонки. Избегать попадания белого осадка. Примечание. Плотно закрывать крышку колонки GeneJET после каждого использования!

6.Центрифугировать в течении 1 минуты. Вылить супернатант, колонку вернуть обратно в ту же пробирку.

7.К осадку добавить 500 мкл Промывочного раствора(предварительно добавить этанол),затем центрифугировать 1 мин, слить супернатант, колонку вернуть обратно в ту же пробирку

8.Повторяем пункт 7(2 или более раза)

9.Вылить супернатант, центрифугировать 1 мин. Происходит удаление остатков промывочного раствора.

10. Перенести колонки GeneJET в новые 1,5 мл эппендорфы.

Добавить 50 мкл Элюирующего буфера в центр мембраны GeneJET колонки для элюирования плазмидной ДНК. Не прикасаться наконечником к мембране.Инкубировать в течение 2 мин при комнатной температуре, затем центрифугировать в течение 2 мин.

10.Убрать колонку, эппендорф закрыть и хранить плазмидную ДНК при -20 ° С.

### 2.3.3 Протокол рестрикции

Таблица 2.2 Протокол рестрикции

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| *Наименование реагента* | *Исходная концентрация* | *Концентрация в конечном растворе* | *Объем реактива* |
| ДНК | 120 нг/мкг | 240 нг/мкг | 2мкг |
| Буфер Blue | 10 X | 1X | 2,0 мкг |
| Рестриктаза SmaI | 10 ед./мкг | 1ед.(1X), | 0,2 мкг |
| H2O |  | до 20 мкг | 15,8мкг |

### 2.3.4 Проверка эффективности применения методов на плазмидной ДНК в агарозном геме с помощью электрофореза

Электрофорез в агарозном геле проводили согласно руководству Маниатис [20]

0,7% агароза: 700 мг агарозы + 100 мл буфера

буфер: 100 мл ТАЕ буфера + 2,5 мкл EtBr (10 мкг/мл) м

### 2.3.5 Протокол подготовки вектора и вставки к лигированию.

Таблица 2.3 Протокол лигирования

|  |  |
| --- | --- |
| *Реагенты* | *Количество* |
| 5х буфер для Т4 ДНК полимеразы | 4 мкг |
| ДНК (линейная или ПЦР продукт) | До 1µg |
| dNTP, 2mM каждого | 2 мкг |
| Т4 ДНК полимеразав | 0,2 мкг(1ед.) |
| Вода | До 20 мкг |

Реакция проводится при 11°С 20 минут или 5 минут при комнатной температуре. Инактивация фермента осуществляется при 75-80 °С 10 минут.

### 2.3.6 ПЦР.

Таблица 2.4.программа ПЦР - реакции.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Номер стадии | Температура | Время | Кол-во циклов |
| I стадия  общая денатурация | 94 ˚С | 5 мин | 1 цикл |
| II стадия  1.денатурация 2.посадка праймеров 3.полимеризация | 94˚С 58-60˚С 68 ˚С | 30 сек 20 сек 1 мин 20 сек | 15циклов |
| III стадия  1.денатурация 2.посадка праймеров 3.полимеризация | 94 ˚С 60˚С 68 ˚С | 30 сек 20 сек 1 мин 20 сек | 20циклов |
| I стадия  Досинтез | 72 ˚С | 5 мин | 1 цикл |
| Хранение | 4 ˚С | | До 2 недель |

Таблица 2.5 Праймеры для ПЦР гена LDG 1

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Название | Последовательность 5’ – 3’ | Длина, н | Координаты (область гомологии) | Температура плавления (Tm), °С | Содержание GC, % |
| EF-L1-F | aaggaggaagcaggt ATG ACT GCA GCC GCA GGG AAT AAA | 24 | 1-24 | 57/65/60 | 50 |
| EF-L1-R | gacacgcacgaggt TTA TTT TGC TTC TTC TGC TTC AAA TTT AGC | 30 | 984-955 | 55/64/58 | 30 |

Таблица 2.6. Праймеры для ПЦР гена LDG 2.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Название | Последовательность 5’ – 3’ | Длина | Координа-ты | Температу-ра плавления (Tm), °С | Содержа-ние  GC, % |
| EF-L2-F | aaggaggaagcaggt ATG AAA GTA TTT AAC AAA AAA GTC GC | 15+26 | 1-26 | 50/58/52 | 27 |
| EF-L2-R | gacacgcacgaggt CTA AGC GTT CGG TTG TAA CGA | 14+21 | 954-934 | 52/60/54 | 48 |

### 2.3.7 Трансформация клеток E.coli.

Поставить ночную культуру: в 5 мл ПБ засеять бактериальную колонию.

1. Ночную культуру развели в 10 раз питательным бульоном.
2. Доращивали до log-фазы на качалке 200-250 оборотов 37°C, 1.5 до2.0 часа .
3. Бактериальную культуру перенесли в стерильные эппендорфы по 1,5 мл.
4. Центрифугировали 5000 об/мин 5мин 4°С.
5. Супернатант удалили, осадок мягко ресуспендировали в 100мкл 0,1М ледяного CaCl2. Эппендорфы оставили на ледяной бане, на 1час для достижения компетентности.(до 18 часов)
6. К компетентным клеткам добавил ДНК 1мкл (до 1 мкг)и оставили в тех же условиях на 30-45 мин.
7. Осуществили температурный шок: 40°С – 40 секунд; 2 мин на ледяной бане.
8. В эппендорфы добавили 1 мл бульона, поместили на качалку на 10-60мин, 200-250 оборотов 37°C (экспрессия).
9. Произвели высев 100 мкл культуры на чашки с селективной средой.

# ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе было необходимо получение промежуточной конструкции пригодной для изучения функциональной активности лактатдегидрогиназ в гомо- и гетерологичном окружении.

Для оптимизации условий амплификации *E.faecalis* БИМ-В1012 с помощью программы Clustal Omega были проанализированы геномы *Enterococcus faecalis* str. Symbioflor , *Enterococcus faecalis* 62, *Enterococcus faecalis* OG1RF, *Enterococcus faecalis* DENG1, *Enterococcus faecalis* V583, *Enterococcus faecalis* D32, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – используемые при анализе L-lactate dehydrogenase 1:

Start-codon

gb|AE016830.1| Enterococcus faecalis str. Symbioflor ATGACTGCAGCC …

gb|CP003726.1| Enterococcus faecalis 62 ATGACTGCAGCC …

gb|CP004081.1| Enterococcus faecalis OG1RF ATGACTGCAGCC …

gb|CP002621.1| Enterococcus faecalis DENG1 ATGACTGCAGCC …

gb|CP002491.1| Enterococcus faecalis V583 ATGACTGCAGCC …

gi|427183854| Enterococcus faecalis D32 ATGACTGCAGCC …

gi|295112306| Enterococcus faecalis ATCC 29212 ATGACTGCAGCC…

\* \* \* \* \*\*\* \* \* \* \* \*

Stop-codon

gb|CP008816.1|Enterococcus faecalis ATCC 29212 …GAAGCAAAATAA

gb|AE016830.1| Enterococcus faecalis str. Symbioflor …GAAGCAAAATAA

gb|CP003726.1| Enterococcus faecalis 62 …GAAGCAAAATAA

gb|CP004081.1| Enterococcus faecalis OG1RF …GAAGCAAAATAA

gb|CP002621.1| Enterococcus faecalis DENG1 …GAAGCAAAATAA

gb|CP002491.1| Enterococcus faecalis V583 …GAAGCAAAATAA

gi|427183854| Enterococcus faecalis D32 …GAAGCAAAATAA

gi|295112306| Enterococcus faecalis ATCC 29212 …GAAGCAAAATAA

…\* \* \* \* \* \*\* \* \* \* \* \*

Для LDG2 были проанализированы геномы таких штаммов как: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* DENG1, *Enterococcus faecalis* D32, *Enterococcus faecalis* 62, *Enterococcus faecalis* V583, *Enterococcus faecalis* OG1RF, *Enterococcus faecalis* str. Symbioflor 1

Start-codon

gb|CP008816.1| Enterococcus faecalis ATCC 29212 ATGAAAGTATTTAAC…

gb|CP004081.1| Enterococcus faecalis DENG1 ATGAAAGTATTTAAC …

gi|427183854| Enterococcus faecalis D32 ATGAAAGTATTTAAC …

gb|CP002621.1| Enterococcus faecalis 62 ATGAAAGTATTTAAC …

gb|AE016830.1| Enterococcus faecalis V583 ATGAAAGTATTTAAC…

gb|CP003726.1 Enterococcus faecalis OG1RF ATGAAAGTATTTAAC …

gb|CP002491.1| Enterococcus faecalis str. Symbioflor 1 ATGAAAGTATTTAAC …

\* \* \* \* \* \* \*\* \* \*\*\* \* \* \*…

Stop-codon

gb|CP008816.1| Enterococcus faecalis ATCC 29212 …CCGAACGCTTAG

gb|CP004081.1| Enterococcus faecalis DENG1 …CCGAACGCTTAG

gi|427183854| Enterococcus faecalis D32 …CCGAACGCTTAG

gb|CP002621.1| Enterococcus faecalis 62 …CCGAACGCTTAG

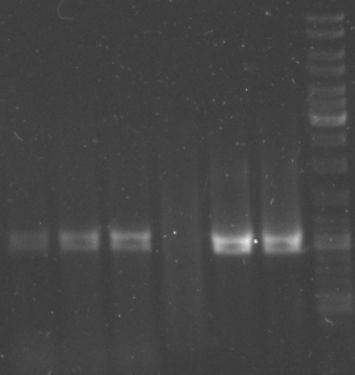
gb|AE016830.1| Enterococcus faecalis V583 …CCGAACGCTTAG

gb|CP003726.1 Enterococcus faecalis OG1RF …CCGAACGCTTAG

gb|CP002491.1| Enterococcus faecalis str. Symbioflor 1 …CCGAACGCTTAG

… \* \*\* \* \* \* \* \*\* \*\*\*

Определив консенсусные последовательности для каждого из генов лактатдегидрогеназы 1 и 2 , были подобраны праймеры для ПЦР-реакции этих генов. На рисунке представлена электрофореграмма ПЦР продукта гена LDG1 и LDG2, полученного с матричной ДНК E.faecalis БИМ-В1012



**1000 п.о.**

**1 2 3 4 5 6 7**

1 ( 9 нг/мкг), 2(26 нг/мкг), 3( 30 нг/мкг) – LDG2, 4 –отрицательный контроль, 5 ( 50 нг/мкг), 6 (45 нг/мкг) - LDG1, 7 -маркер молекулярного веса (1kb DNA Ladder)

Рисунок 3.1- Электрофореграмма ПЦР продукта гена LDG1 и LDG2, полученного с матричной ДНК *E.faecalis* БИМ-В1012.

Затем продукты амплификации были очищены для клонирования.

Следующим шагом была осуществлена подготовка вектора pMTL21C для клонирования продуктов амплификации для дальнейшей работы (секвенирования, мутагенеза и экспрессии генетического материала). Особенностью данного вектора является наличие только одного единственного сайта, который может быть применен для направленного клонирования - это сайт SmaI. Это было необходимо для дальнейшей трансформация штаммов E. coli XL1-Blue и E. сoli DH5 alpha вектором pMTL21C со вставкой ldg1

Для дальнейшей работы использовались продукты амплификации, полученные с матрицы штамма E.faecalis БИМ-В1012.

Для осуществления трансформации было необходимо произвести рестрикцию плазмиды pMTL21C по сайту SmaI.

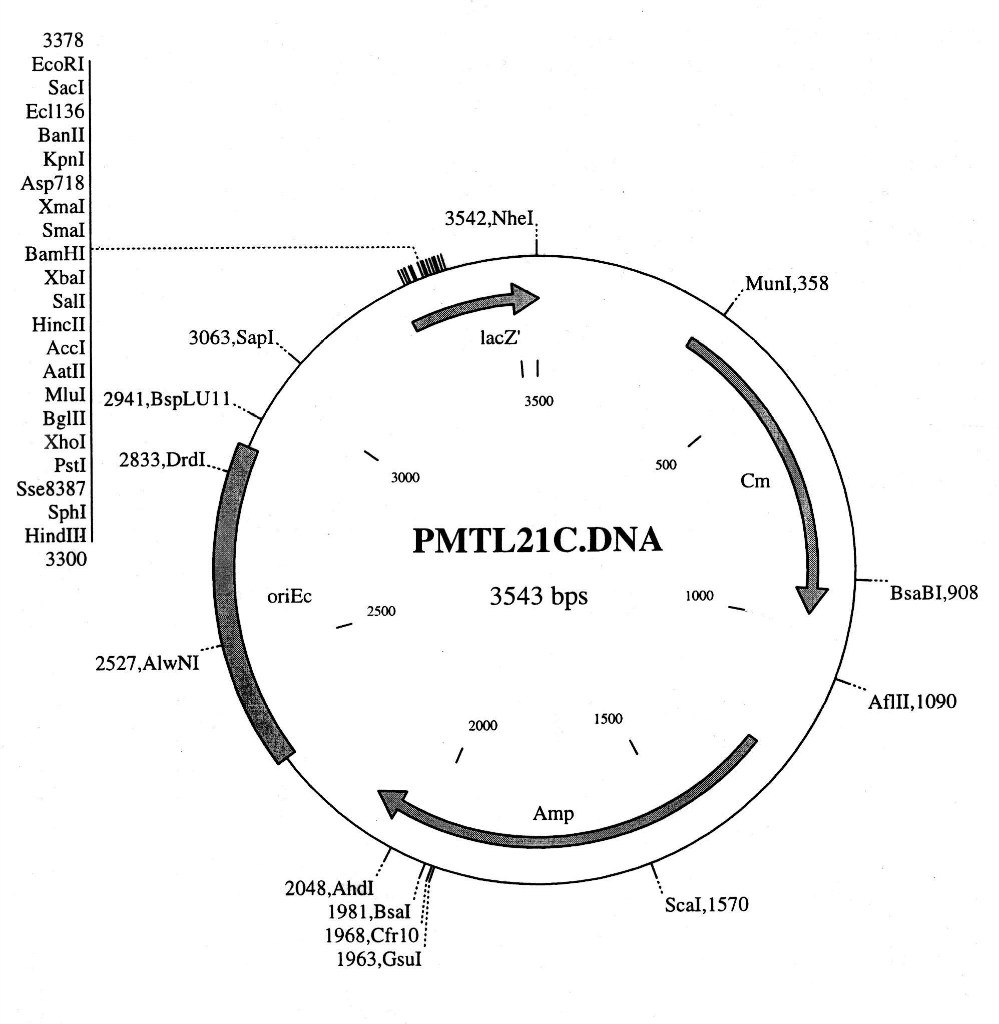
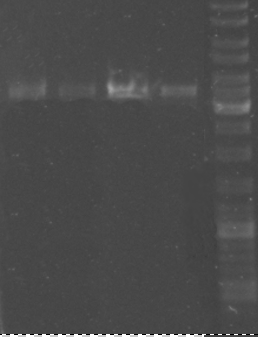


Рисунок 3.2 Карта плазмиды pMTL21C

Таблица 3.1 Протокол рестрикции:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Наименование реагента | Исходная концентрация | Концентрация в конечном растворе | Объем реактива |
| ДНК | 120 нг/мкг | 240 нг/мкг | 2мкг |
| Буфер Blue | 10 X | 1X | 2,0 мкг |
| Рестриктаза SmaI | 10 ед./мкг | 1ед.(1X), | 0,2 мкг |
| H2O |  | до 20 мкг | 15,8мкг |



**1 2 3 4 5**

**3500 п.о.**

1 (14,39 нг/мкг), 2 (8,6 нг/мкг), 3 (30 нг/мкг), 4(15.3 нг/мкг) – рестрикция плазмиды pMTL21C по сайту SmaI, 5 - маркер молекулярного веса (1kb DNA Ladder)

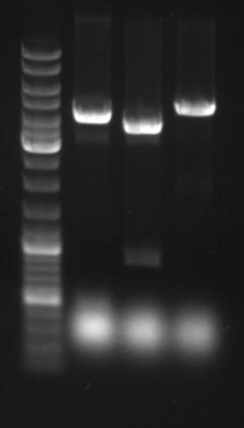
Рисунок 3.3. Электрофореграмма рестрикции плазмиды pMTL21C по сайту SmaI

Полученные в ходе амплификации с матричной ДНК E.faecalis БИМ-В1012 ПЦР продукты лигировали с линиаризированной ДНК плазмиды pMTL21C.

Таблица 3.2 Протокол подготовки вектора и вставки к лигированию.

|  |  |
| --- | --- |
| *Реагенты* | *Количество* |
| 5х буфер для Т4 ДНК полимеразы | 4 мкг |
| ДНК (линейная или ПЦР продукт) | До 1µg |
| dNTP, 2 милиM каждого | 2 мкг |
| Т4 ДНК полимераза | 0,2 мкг(1ед.) |
| Вода | До 20 мкг |

Лигированной смесью трансформировалии бактериальный штаммы *E. coli* XL1-Blue *и E. сoli* DH5α, наилучшим образом подходящие для осуществления данного этапа работы. Селекцию вели на полноценной питательной агаризованной среде, содержащей ампициллин, в концентрации 100мкг/мл, хлорамфеникол, в концентрации 20 мкг/мл, X-Gal, IPTG. Из клонов трансформантов, имеющих характерную белую окраску, выделяли плазмидную ДНК и проверяли путем рестрикционного анализа по сайтам рестрикции EcoRI, PstI, HindIII. По результатом последнего были отобраны конструкции, размер которых соответствует ожидаемому.



**3500 п.о**

**1 2 3 4**

1 - маркер молекулярного веса (1kb DNA Ladder), 2 – HindIII, фрагмен 4000п.о., 3 – PstI фрагмент 4000п.о и 1000п.о, 4 - EcoRI, фрагмент 4400п.о.

Рисунок 3.4 Электрофореграмма пдрф-анализа одного из полученных трансформантов

Следующим этапом работы тыл биоинформационный анализ последовательностей генов ldg1 и ldg2. В ходе анализа для определения пространственной структуры белков и его частичной характеристики использовались ранее полученные последовательности генов ldg1 и ldg2.

Этот этап работы осуществлялся при помощи биоинформационного анализа необходимых генов. Анализируя полученные данные, были расшифрованы первичные последовательности гена лактатдегидрогеназы 2-го типа и частично для мутантов M4, M5 и М6. С использованием программ BLASTP2.2.1[24] и ClustalW2[23] осуществлялась определение последовательностей, подвергшихся секвенированию. В результате экспериментальные последовательности были идентифицированы как гены лактатдегидрогеназ 2-типа, характерные для представителей *E. faecalis* (уровень идентичности более 95-99 %).

Характеристика генов лактатдегидрогеназы 1-го и 2-го типа проводилась с использованием программных ресурсов сервера Еxpasy пакета данных protparam.[25]

С помощью программы uniprot[26] было установлено расположение белков в клетке и их пространственная структура. Как *LDG1*, так и *LDG2* являются цитоплазматическими и для обоих этих белков характерна гомотетрамерная структура.

С использованием алгоритма множественного выравнивания, было продемонстрировано, что общая структура гена лактатдегидрогеназы 2-го типа штамма *E. faecalis* БИМ B-1012имееттипичное строение для лактатдегидрогеназ *E. faecalis*, последовательности которых представлены в интегрированных и специализированных базах данных, на основе чего можно сделать вывод о сходстве лактатдегидрогеназы 1-го типа с таковыми лактатдегидрогеназами *E. faecalis* .

Для дальнейшей характеристики лактатдегидрогеназ 1-го и 2- го типов осуществлялся анализ вторичной структуры. С помощью программы sopma[27] были получены сведения о вторичной структуре белков, представленные на рисунке 3.5.

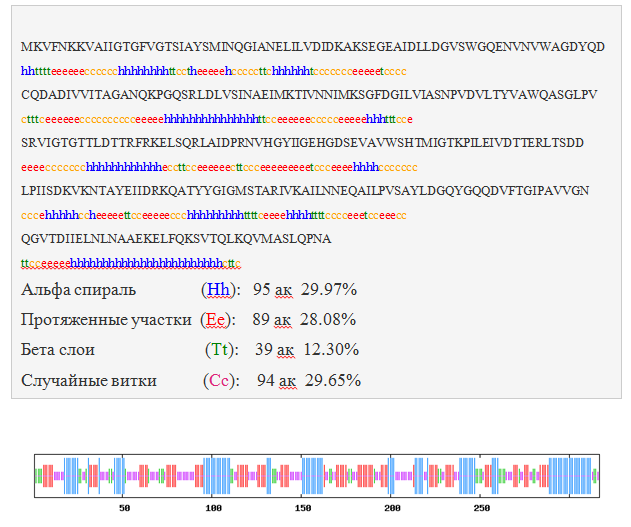


Рисунок 3.5 Визуальное отображение вторичной структуры *LDG1* и *LDG2*

Из этих рисунков можно сделать заключение, что *LDG1* и *LDG2*сходны в организации вторичной структуры.

Кроме вторичной структуры, у белка также существует третичная и четвертичная пространственная структуры. Также следует помнить, что помимо пространственных структур существует ещё и доменная организация белков. Благодаря интернет-ресурсу smart [28] на рисунке 3.6 и 3.7 проиллюстрирована доменная организация LDG1 и LDG2. Программа supfam[29] помогла при характеристике доменной организации, результаты которой представлены в таблице 3.4

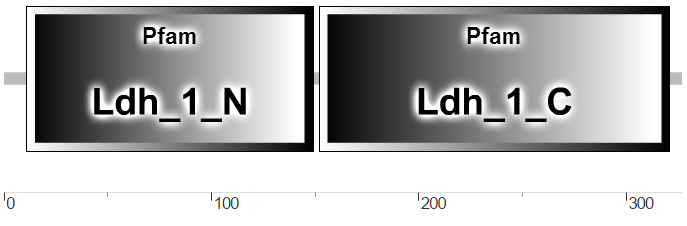


Рисунок 3.6 Доменная организация белка **LDG1**

Таблица 3.4 - Характеристика доменной организации белка LDG1 и LDG2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Сиквенс** | LDG1 | LDG2 |
| **Домен №1** | Регион :150-317 | Регион : 146-313 |
| **Суперсемейство** | [LDG C-концевой домен](http://supfam.org/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=56327) | [LDG C-концевой домен](http://supfam.org/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=56327) |
| **Семейство** | С-терминальная лактат/малат дегидрогеназ | С-терминальная лактат/малат дегидрогеназ |
| **Домен №2** | Регион**:** 7-151 | Регион**:** 4-145 |
| **Суперсемейство** | NAD(P)-связывающий домен | NAD(P)-связывающий домен |
| **Семейство** | N-терминальная лактат/малат дегидрогеназа | N-терминальная лактат/малат дегидрогеназа |
| **Домен №3** | Регион 179 – 185 Активный центр лактатдегидрогеназы 1 типа | Регион 175 – 181.  Активный центр лактатдегидрогеназы 2 типа |

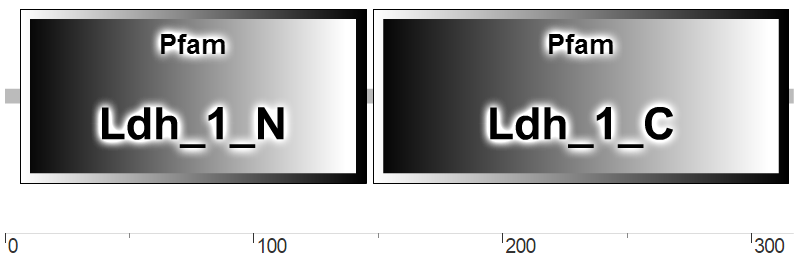


Рисунок 3.7 Доменная организация белка **LDG2**

Моделирование четвертичной структуры белков осуществлялось посредством программы swissmodel.еxpasy.[30] Ниже в иллюстрации 3.8 представлены результаты.

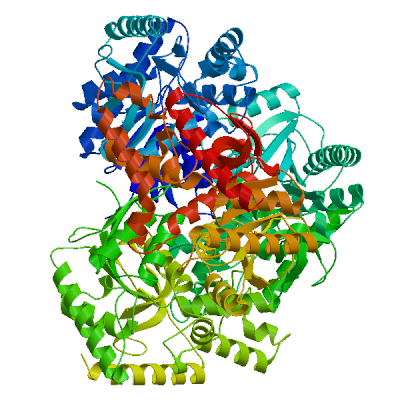
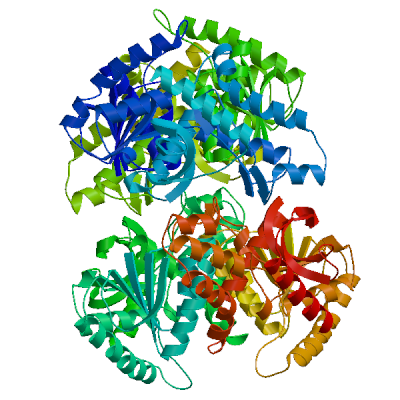


Рисунок 3.8 Четвертичная структура белка LDG1 и LDG2

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности для генов   
L-лактатдегидрогеназ 1-го и 2-го типов и их аминокислотной последовательности генных продуктов указывает на не только сходство их структурной и пространственной организации, но и существенные отличия между лактатдегидрогеназами обоих типов. Выявляемая идентичность по аминокислотному составу составляет только около 44 %. Однако, не взирая на различия в аминокислотном составе, эти белки имеют гомотетрамерную структуру и оба локализованы в цитоплазме.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены консенсусные последовательности, на основе анализа которых были подобраны праймеры для амплификации генов лактатдегидрогеназ первого и второго типов штамма *E. faecalis* БИМ И-1012. Образованные продукты амплификации подготовлены для дальнейшего клонирования.

Была получена генетическая конструкция на основе вектора pMTL21C, содержащая ген *ldg1*, пригодная для изучения функциональной активности лактатдегидрогеназ первого типа.

Осуществлен анализ последовательности генов *LDG1* и  *LDG2* и детерминируемых ими продуктов штамма *E.faecalis БИМ В-1012*. Лактатдегидрогеназа этого штамма имеет типичное строение для лактатдегидрогеназ рода *Enterococcus*, представленным двумя типами. Не смотря на существенные различия в аминокислотной последовательности, для белков LDG1 и LDG2 предсказана сходная пространственная структура и локализация в клетке.

Для лактатдегидрогеназ 1-го и 2-го типов была предсказана пространственная структура гомотетрамера, локализованного в цитоплазме клетки.

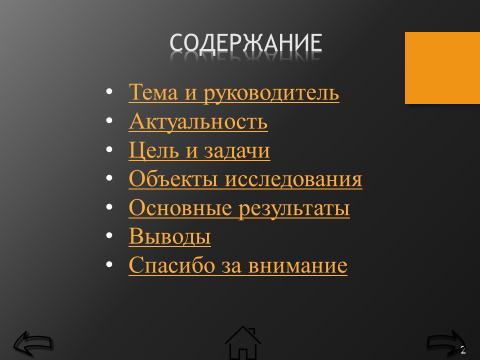
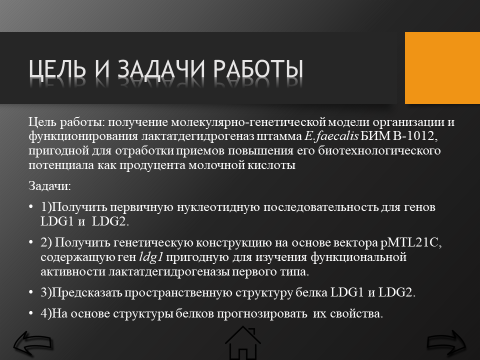
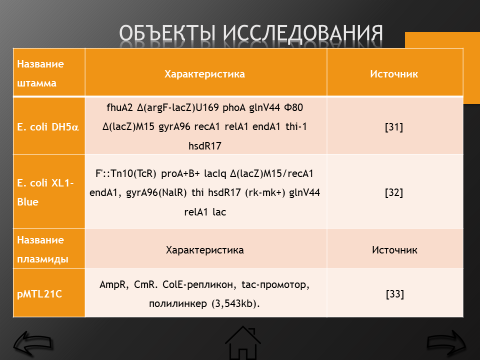
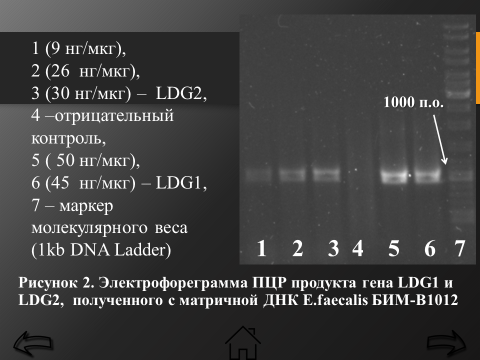
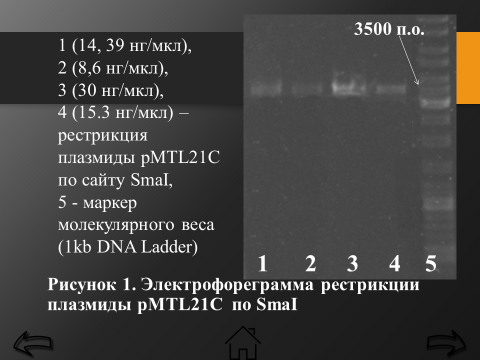
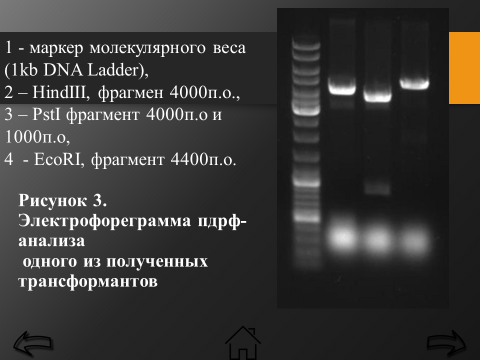
# БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

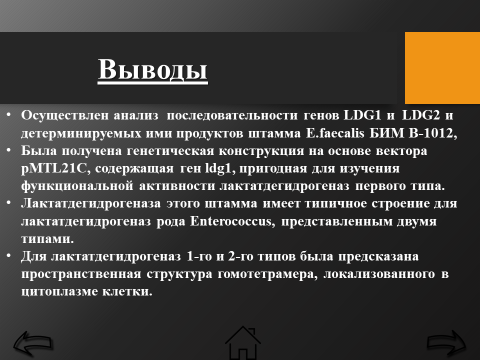
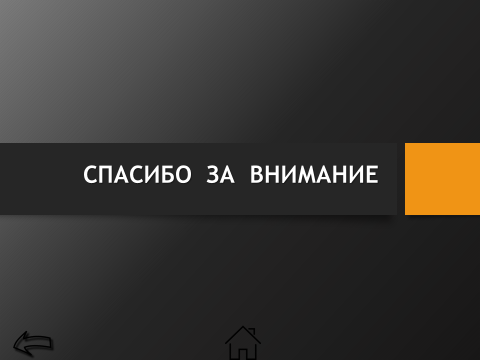
1. Грандберг, И.И. Органическая химия: Учебник для студентов вузов, обучающихся по агрономической специальности / И.И. Грандерг. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.:Дрофа, 2001. – 672с.
2. Нейланд, О.Я.Органическая химия: учеб. для хим. спец. вузов./ О.Я. Нейланд. – М.:Высш.шк., 1990. – 751с.
3. Органическая химия: учеб. лит. Для учащихся фарм. и мед. средних учеб. заведений/ А.П. Лузин [и др.]; под ред. Н.А. Тюкавкиной. – 2-е изд., перераб и доп. – М.:Медицина, 1998. – 496с.
4. Новый справочник химика и технолога: в 12 т./ редколл.: А.Столярова [и др.]. – Санк-Петербург: Профессионал, 2005. – Т. 3: Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Часть 2. / С.Н. Васильев [и др.]. – 2005. – 1142с.
5. Анализируй то, что ты ешь! Calorizator // E270 Молочная кислота [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: -http://www.calorizator.ru/addon/e2xx/e270 – Дата доступа: 20.04.2015.
6. Переработка молока // Применение молочной кислоты и лактатов [Электронный ресурс]. – 2013. – Режим доступа: - http://www.milkbranch.ru/publ/view/198.htмл - Дата доступа: 21.04.2015.
7. Кроликовед //Лекарства против вздутия, тимпании, метеоризма кроликов – молочная кислота [Электронный ресурс]. – 2014 – Режим доступа: - http://krolikoved.ru/node/141 - Дата доступа: 21.04.2015
8. ФудТехИнвест // Молочная кислота [Электронный ресурс]. -2013. – Режим доступа: - http://fti.by/molochnaya-kislota – Дата доступа: 21.04.2015
9. Сервер издательского дома «Медицинский бизнес» // Установки для производства молочной кислоты Uhde [Электронный ресурс]. - Режим доступа: - http://www.medbusiness.ru/65.php - Дата доступа: 20.04.2015.
10. Лысак, В.В. Систематика микроорганизмов /В.В.Лысак, О.В. Фомина. – Минск: БГУ, 2014. – 304 с.
11. Способ получения молочной кислоты. пат. 2175014 Российской Федерации, C12P7/56, C12P7/56, C12R1:225 / Д.М. Исакова; заявитель Исакова Д.М. - № а 2000109701/13; заявл. 20.04.00; опубл. 20.10.01.
12. Lactic acid production from concentrated raw sugar beet juice: pat. NL, C12P 7/56 / D/ Visser, J. Van Breugel, J.M. De Bruijn, P. A'Campo; Purac Biochem BV - № 8211675; filed 22.06.07; date issued: 03.07.12.
13. Method for the production of lactic acid or a salt thereof by simultaneous saccharification and fermentation of starch: pat NL, C12P 7/56; C12P 7/00; C12P 1/00; C12N 1/12; C12P 7/40 / R. Otto; Purac Biochem B.V. - № 8119376; filed 13.05.03; date issued 21.02.12.
14. Production of lactic acid from fermentations using mixed bacterial cultures, pat. China, PCT/CN2012/076993 / Fengjie Cui; Jiangsu University - № WO2013185344 A1, field 15.06.12; date issued 19.12.13.
15. Low PH lactic acid fermentation: pat. USA, US 08/949,420 / Ting Liu Carlson, Eugene Max Peters; Cargill, Inc. - № US 6475759 B1; field 14.10.97; date issued 05.11.02.
16. Штамм молочнокислых бактерий lactobacillus delbrueckii - продуцент молочной кислоты, пат. 2283345 Российской Федерации, C12N1/20, C12P7/56 / А.П. Бочкова, В.В. Евелева; заявитель Гос. учрежд. Всерос. научно-исслед. инсти. пищ. ароматизаторов, кислот и красителей Российской академ. селскохоз. наук - № а 2283345; заявл. 14.10.04; опубл. 10.09.06.
17. Штамм бактерий enterococcus faecium в-2240d - продуцент оптически чистой l(+)-молочной кислоты и промышленный способ получения l(+)-молочной кислоты или ее солей, пат. Российской Федерации, С12R/01 C12N1/20 / Г.В. Галкина, В.И.Илларионова, заявитель Г.В. Галкина, В.И. Илларионова - № 2205216; заявл. 10.10.00; опублик. 27.04.03.
18. Рекомбинантный штамм дрожжей Schizosaccharomyces pombe – продуцент молочной кислоты, пат. Российской Федерации 2539092, C12P7/56 C12N1/19 / С.П. Синеокий, Л.Н. Борщевская, Т.Л. Гордеева, заявит. Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов", заявл. 30.10.13, опублик.13.12.13.
19. Штамм Bacillus coagulans SIM-7 DMS 14043 для получения I(+)- лактата и способы получения I(+)- лактата, пат. Эстонии, C12P7/56 C12N1/20 / Я. Симискер, А. Нурк, А. Хейнару, заявит. Тартусский университет, № а 2288263, опубл. 27.11.06.
20. Маниатис ,Т. Методы генетической инженерии / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. // Молекулярное клонирование. Москва. «Мир», 1984– 436 с.
21. Joseph, P. Raid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in Bacillus subtilis./ P.Joseph, J.-R. Fantino, M.-L. Herbaud // FEMS Microbiology Letters 205 – 2001 – P. 91-97.
22. Yusuf М, Lactic Acid Bacteria: Bacteriocin Producer/ Moshood A. Yusuf, Tengku Haziyamin Abdul Tengku Abdul Hamid. – 2013 - IOSR Journal Of Pharmacy - v3, № 4 - p 44-50.
23. Multiple Sequence Alignment[Electronic resource/The European Bioinformatics Institute,Part of the European Molecular Biology Laboratory, 2016 - Mode of access: http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ - Date of access: 23.05.2016.
24. National Center for Biotechnology Information[Electronic resource]/ National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine - Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov- Date of access: 23.05.2016.
25. Bioinformatics resourse Portal [Electronic resource]/ SIB Swiss Institute of Bioinformatics. - Mode of access: http://www.expasy.org - Date of access: 23.05.2016.
26. Uniprot datebase [Electronic resource]/ UniProt Consortium, 2002 . - Mode of access: http://www.uniprot.org - Date of access: 23.05.2016.
27. Institute of Biology and Protein Chemistry [Electronic resource]/Copyright PBIL – IBCP-Lyon, 2016 - Mode of access: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\_sopma.htмл - Date of access: 23.05.2016.
28. Simple Modular Architecture Research Tool SWI[Electronic resource] / Schultz et al.-Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1995 - Mode of access: http://smart.embl-heidelberg.de - Date of access: 23.05.2016.
29. HMM libraryand genome assignments server [Electronic resource]/ The SUPERFAMILY authors and Julian Gough, 2013. - Mode of access: http://supfam.org/SUPERFAMILY/index.htмл - Date of access: 23.05.2016.
30. SWISS - MODEL [Electronic resource]/ Swiss Institute of Bioinformatics - Mode of access: http://swissmodel.expasy.org - Date of access: 23.05.2016.
31. Taylor R.G., Walker D.C., McInnes R.R. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing // Nucleic Acids Res – 1993. Vol. 21. № 7. – P. 1677-1678.
32. Bullock W.O., Fernandes J.M., Short J.M. // BioTechniques – 1987. – Vol. 5. – P. 376–379.
33. Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A., Minton N.P. The pMTL nic- cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing // Gene. – 1988. – Vol. 68, № 1. – P. 139–149.

# ПРИЛОЖЕНИЕ

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

## Презентация выпускной работы

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

## Ссылка и скриншот сайта выпускной работы

https://anaisad.github.io/Magistrach/