

Разработка дрожжевых систем экспрессии на основе генов бациллярных ферментов

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

Иткина Дарья Леонидовна

Аспирант

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия

E-mail: laia9301@mail.ru

Фосфор - один из существенных микроэлементов, который необходим для осуществления множества важных обменных процессов в организме. Известно, что некоторая часть фосфора, содержащегося в кормовом сырье, нерастворима и неусвояема, поскольку связана фитиновой кислотой. Организм животных не способен синтезировать ферменты, способные расщеплять фитаты. Одним из качественных направлений решения проблемы дефицита фосфора в питании животных является возможное внесение в корма экзогенного фермента микроорганизмов — фитазы, которая осуществляет гидролиз фитата и высвобождает фосфор, который затем легко усваивается в пищеварительном тракте. Высоко-экспрессионная система на основе дрожжей *Pichia pastoris* широко используется в биоинженерии для получения рекомбинантных белков в исследовательских и прикладных целях.

Цель работы - получение дрожжевых систем экспрессии на основе гена бациллярной фитазы.

Для экспрессии бактериальных ферментов в дрожжевых клетках *Pichia pastoris* использовали последовательности генов бета- пропеллерной фитазы *Bacillus ginsengihumi* M2.11 - phyC, к структурным областям которых добавляли C-терминальный His-таг, позволяющий проводить очистку фермента из культуральной жидкости. Для корректной экспрессии бактериальных ферментов в дрожжах проводили оптимизацию кодонов нуклеотидных последовательностей генов, после чего гены ферментов были синтезированы и по отдельности клонированы в вектор pUC57 компанией Genscript (США). В работе использовали интегративные дрожжевые вектора pPINK-НС (высококопийный вектор) и pPINK-LC (низкокопийный вектор), а так же нуклеотидную последовательность высоко-эффективного сигнального пептида α amilase.

Проводили трехступчатое лигирование вектора (pPINK-НС/ pPINK-LC), последовательности сигнального пептида и гена фитазы (phyC), с последующей трансформацией лигазной смеси в клетки *E.coli* DH5 α . Отбор трансформантов проводили на среде с ампициллином (100 мкг/мл). Наличие генов идентифицировали с помощью ПЦР-анализа колоний трансформантов. Результаты секвенирования подтвердили корректность встраивания сигнального пептида и целевого гена в дрожжевые вектора. Затем были получены рекомбинантные штаммы *Pichia pastoris* под контролем индуцибельного дрожжевого промотора гена AOX1, содержащим области, обеспечивающие активацию транскрипции в присутствии метанола в культуральной среде, а также область инициации транскрипции.

Дальнейшее выделение и очистка фермента, изучение экспрессии и свойств данного фермента станет одним из этапов в решении фундаментальных проблем, связанных с регулированием фосфорного обмена и может стать важным этапом развития биотехнологического производства фитаз.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) Федерального Университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФИ № 16-16-04062.