

Создание конструкции экспрессионной системы *Pichia pastoris* с геном β -пропеллерной фитазы и сигнальным пептидом.

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

Белей Е.В.¹, Иткина Д.Л.²

1 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: beley1ev@mail.ru*; 2 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: laia9301@mail.ru*

Основным источником фосфора в почве являются соли фитиновой (мио-инозитгексафосфорной) кислоты - фитаты, которые в питании играют роль антинутриента, так как способны к образованию труднорастворимых комплексов с металлами. Тем самым неусвоенный фосфор, выделяемый животными в окружающую среду в избытке, представляет значительную экологическую проблему. [1]

Сельскохозяйственные животные и птицы с однокамерным желудком, не приспособлены к гидролизу фитатов, из-за отсутствия или недостаточного количества фитатдеградирующих ферментов в желудочно-кишечном тракте. В настоящее время актуальным становится поиск продуцентов ферментов - фитаз, катализирующих отщепление неорганического фосфата от фитатов. Добавление экзогенной фитазы, при производстве корма для сельскохозяйственных животных и птиц, неспособных усваивать фитаты в труднодоступной форме, позволит решить проблему дефицита фосфора в питании животных.

В настоящее время известно, что бактериальные фитазы (бета-пропеллерные) отличаются высокой термостабильностью с температурным оптимумом от 55° до 70°, оптимальным рН в нейтральном диапазоне и высокими катализирующими свойствами. Экспрессионная система на основе дрожжевых клеток *Pichia pastoris* является преимущественной в биотехнологии за счет высоко уровня выхода фермента, легкости отбора экспрессионных клонов при ауксотрофии по аденину, которая обеспечивает высокую стабильность трансформантов во время экспрессии, а так же за счет использования дрожжевых векторов *pPink-HC* и *pPink-LC*, которые увеличивают выход трансформантов при использовании разнообразного набора высокоэффективных сигнальных последовательностей. [3]

Целью данной работы явилось создание генетических конструкций, содержащих оптимизированный ген фитазы *B.ginsengihumi* (*PhyC*) под контролем индуцибельного промотора АOX1 и сигнального пептида α -*amilase*, с использованием интегративных бинарных дрожжевых векторов.

Для экспрессии бактериальных ферментов в дрожжевых клетках *Pichia pastoris* использовали последовательность гена *phyC* бета-пропеллерной фитазы *Bacillus ginsengihumi* M2. В работе использовали дрожжевые вектора *pPINK-HC* (высококопийный вектор) и *pPINK-LC* (низкокопийный вектор), а так же нуклеотидную последовательность высокоэффективного сигнального пептида α -*amilase*.

Проводили трехступенчатое лигирование вектора (*pPINK-HC*/*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 LA с добавлением ампициллина (100 мкг/мл). Наличие встроенной генетической конструкции идентифицировали с помощью ПЦР-анализа колоний трансформантов и визуализировали при помощи геля электрофореза.

С помощью метода электропорации были получены рекомбинантные штаммы *Pichia pastoris* с соответствующими генетическими структурами (*pPINK-HC*/*pPINK-LC*, ген

phyC и сигнальную последовательность α -*amilase*) под контролем индуцибельного дрожжевого промотора гена *AOX1*, содержащим области, обеспечивающие активацию транскрипции в присутствии метанола в культуральной среде, а также область инициации транскрипции. Наличие встроенной конструкции было подтверждено с помощью ПЦР-анализа колоний трансформантов и визуализировано при помощи геля электрофореза.

Дальнейшее исследование уровня экспрессии белка и изучение его биохимических и энзиматических свойств станет предпосылкой для создания сельскохозяйственных биотехнологий по улучшению качества кормовой продукции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-38-90208.

Источники и литература

- 1) Haefner S. Biotechnological production and applications of phytases / S. Haefner, A. Knietsch, E. Scholten, J. Braun, M. Lohscheidt, O. Zelder // Applied Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 68. No. 5. P. 588-597.
- 2) Lei X.G. Phytase enzymology, applications, and biotechnology / X.F. Lei, J.M. Porres // Biotechnology Letters. 2003. Vol. 25. No. 2. P. 1787–1794.
- 3) PichiaPink™ Expression System. For high-level and large-scale expression and secretion of bioactive recombinant proteins in *Pichia pastoris* / Ausubel F.M. et al. // Life Technologies Corporation. 2014.