

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *KLUYVEROMYCES LACTIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕГРАТИВНОГО ВЕКТОРА

Русь О.Б., Кулик Е.В., Антонович Е.Д., Евтушенков А.Н.
Белорусский государственный университет, Минск,
zrbio@mail.ru

Одним из современных способов повышения рентабельности технологического процесса в промышленности и снижения стоимости конечного продукта является использование дрожжевых штаммов-продуцентов рекомбинантных белков. Их создание проводят с помощью различных молекулярно-генетических манипуляций. Так, в 1988 г. появилось сообщение о получении стабильного продуцента глюкоамилазы *Aspergillus awamori* на основе полиауксотрофного штамма *Saccharomyces cerevisiae* C468 путем введения в клетки дрожжей кДНК глюкоамилазы микромицета в составе дрожжевого эписомного вектора YErPM18 [2]. Уровень ферментативной активности рекомбинантного белка составил 13,8 ед.а./мг белка или 2,9 ед.а./мг биомассы после 48 ч ферментации в среде с растворимым крахмалом. Оптимум глюкоамилазной активности наблюдался при 55 °С и рН 3,5–4,0 [2, 8]. W. Yongji с соавторами в качестве вектора экспрессии в клетках *S. cerevisiae* использовали бирепликонную плазмиду pAC1 с ориджином дрожжевой 2μ-плазмиды и ori_{pBR322} *E. coli* [12]. В состав этой конструкции также входил промотор и терминатор гена енолазы дрожжей ENO1, и маркер селекции – структурный ген биосинтеза лейцина LEU2. Трансформированные клетки *S. cerevisiae*, содержащие вектор pAC1 с кДНК глюкоамилазы *A. awamori*, продуцировали в культуральную жидкость рекомбинантный фермент с активностью 8,4 ед.а./мл.

В лабораторных условиях культивирования для суперэкспрессии клонированных генов в клетках штаммов *S. cerevisiae* подходят эписомальные плазмидные векторы благодаря их высокой копийности (50-200 копий). Тем не менее, обнаружено, что эти плазмиды нестабильны при митозе и в условиях отсутствия селективного давления в течение длительного процесса промышленной ферментации [9]. Трансформация промышленных штаммов *S. cerevisiae* может быть осуществлена путем интеграции чужеродных генов в хромосомы посредством гомологичной рекомбинации. В качестве сайтов интеграции в этом случае целесообразно использовать повторяющиеся последовательности ДНК, такие как δ-последовательности Ту ретротранспозона и участки рибосомальной ДНК, что способствует увеличению количества копий интегрированных генов и, следовательно, увеличению уровня их экспрессии и митотической стабильности [1, 4, 7].

Для получения этанола из крахмала созданы промышленные штаммы *S. cerevisiae*, экспрессирующие ген глюкоамилазы *A. awamori* (GA1), ген α -амилазы (AMY) и глюкоамилазы *Debaryomyces occidentalis*, проявляющей активность в отношении боковых цепочек в полимерах крахмала (GAM1) [6]. Трансформацию клеток *S. cerevisiae* проводили путем интеграции в геном генов GA1, AMY и GAM1 посредством гомологичной рекомбинации. В качестве сайтов интеграции для генов GA1 и AMY использовали δ -последовательности Ту ретротранспозона, а для генов GAM1 – 18S рДНК-интеграцию. Гены GA1, AMY и GAM1 конститутивно экспрессировались под контролем промотора ADC1 алкогольдегидрогеназы. δ -Последовательности также использовали для получения штамма-продуцента *S. cerevisiae*, у которого была проведена оптимизация кодонов гена глюкоамилазы *A. awamori*. В результате был получен рекомбинантный штамм с высокой ферментативной активностью в отношении как растворимого, так и сырого необработанного крахмала (2425 и 1 140 нкат/г сухого веса соответственно). При культивировании генно-инженерных дрожжей в среде с сырым крахмалом выход этанола составил 0,42 г/г, что соответствует 75% от теоретически рассчитанного максимума [3].

Кроме рода *Saccharomyces* для получения рекомбинантных эукариотических белков в последнее время стали применяться дрожжи других родов, например, *Pichia* и *Kluyveromyces* [10]. Для экспрессии чужеродной ДНК в клетках *K. lactis* используется экспрессионный вектор рKLAC2 производства New England Biolabs, который способен автономно реплицироваться в клетках *E. coli*, а также стабильно интегрироваться в геном дрожжей *K. lactis*. Данный вектор содержит универсальный полилинкер, позволяющий проводить клонирование целевых генов. В клетках *E. coli* вектор рKLAC2 реплицируется с точки начала репликации рBR322. В своей структуре он содержит ген *bla*, детерминирующий устойчивость к антибиотику ампициллину, который используется как маркер селекции для отбора трансформированных клеток *E. coli*.

С целью получения рекомбинантного штамма *K. lactis*, секретирующего глюкоамилазу гриба *A. awamori*, на кафедре молекулярной биологии биологического факультета БГУ на основе интегративного вектора рKLAC2 была создана генетическая конструкция рKGLA-1 с кДНК гена *glaA* *A. awamori*. Для интеграции фрагмента сконструированной плазмиды в дрожжевую хромосому в локус *LAC4* необходимым являлось предварительно линейаризировать ДНК с использованием либо эндонуклеазы *SacII*, либо – *BstI*, согласно карте вектора рKLAC2. Для оценки результата рестрикции продукты реакции подвергались электрофоретическому разделению в 1,5%-ном агарозном геле. Учитывая, что теоретически рассчитанный размер фрагмента плазмиды рKGLA-1 с кДНК гена *glaA* должен составлять около 8 000 п.н., а визуализированный на геле имел размерность в два раза меньше после рестрикции с использованием эндонуклеазы *BstXI*, было сделано заключение, что этот фермент расщепляет целевой ген. В то же время, обработка

рестрицирующей эндонуклеазой *SacII* не нарушала целостности нуклеотидной последовательности гена *glaA* и была признана пригодной для проведения манипуляции рестрикции.

Трансформацию дрожжевых клеток *K. lactis* линейной плазмидной ДНК проводили согласно протоколу Yeast Protocols Handbook, Clontech [11]. Отбор дрожжевых трансформантов осуществляли с использованием ацетамидазного селективного маркера (*amdS*), экспрессия которого находится под дрожжевым *ADHI* промотором. В трансформированных дрожжевых клетках в отличие от исходных должна происходить экспрессия ацетамидазы, что позволяет им утилизировать ацетамид в качестве единственного источника азота и расти на минимальной среде с этим химическим соединением (рис. 1).

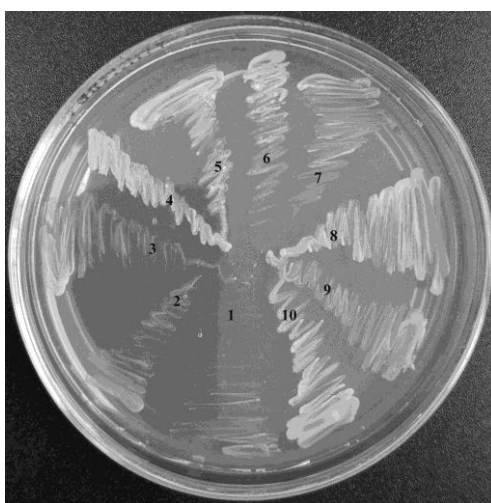


Рисунок 1 – Колонии *Kluyveromyces lactis* на YCB-среде с 5 ммоль/л ацетамида. 1-3 – *K. lactis* исходный вариант, 4-10 – трансформанты с плазмидой pKGLA-1.

Расположение полилинкера в векторе pKLAC2 позволяет осуществлять трансляцию единой структуры, состоящей из секреторного лидерного пептида и N-конца рекомбинантного целевого белка, что способствует направлению белка по общему секреторному пути, в то время как лидерный пептид отрезается *Kex*-протеазой в аппарате Гольджи. В результате этого процесса рекомбинантный белок секретируется из клеток *K. lactis* в культуральную жидкость.

Для оценки в полученных клетках трансформантов экспрессии гена *glaA*, секреции рекомбинантного целевого белка и его ферментативной активности дрожжевые колонии, отобранные на селективной среде, пересеивались на питательную среду с субстратом для глюкоамилазы – крахмалом. В результате проведенного анализа зоны гидролиза крахмала наблюдались у 24 из 32 клонов, что подтвердило эффективность проведенной генетической трансформации клеток *K. lactis* интегративным вектором с геном глюкоамилазы мицелиального гриба *A. awamori*.

Литература

1. Cho, K.M., Yoo, Y.J., Kang, H.S. δ -Integration of endo/exo-glucoamylase and β -glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol // *Enzyme Microb Technol.* 1999. Vol. 25. P. 23-30.
2. Cole, G.E., McCabe, P.C., Inlow, D., Gelfand, D.H., Benbassat, A., Innes, M.A. Stable expression of *Aspergillus awamori* glucoamylase in distiller's yeast // *Biotechnol.* 1988. Vol. 6. P. 417-421.
3. Favaro, L., Jooste, T., Basaglia, M., Rose, S.H., Saayman, M., Görgens, J.F., Casella, S., van Zyl, W.H. Codon-optimized glucoamylase sGAI of *Aspergillus awamori* improves starch utilization in an industrial yeast // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012. Vol. 95. P. 957-968.
4. Kang, N.Y., Park, J.N., Chin, J.E., Blaise, L.H., Im, S.Y., Bai, S. Construction of an amylolytic industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing the *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene // *Biotechnol Lett.* 2003. Vol. 25. P. 1847-1851.
5. Karim, K.M., Husaini A., Hossain M.A., Sing N.N., Mohd Sinang F., Hussain M.H., Roslan H.A. Heterologous expression and characterization of thermostable glucoamylase derived from *Aspergillus flavus* NSH9 in *Pichia pastoris* // *Biomed. Res. Int.* 2016. Vol. 2016. P. 1-10.
6. Kim, J.-H., Kim, H.-R., Lim, M.-H., Ko, H.-M., Chin, J.-E., Lee, H.B., Kim, I.-C., Bai, S. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase, α -amylase and debranching enzyme // *Biotechnol Lett.* 2010. Vol. 32. P. 713-719.
7. Lee, F.W.F., Silva, N.A. Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the δ sequences of *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997. Vol. 48. P. 339-345.
8. Pavezzi, F.C., Gomes, E., da Silva, R. Production and characterization of glucoamylase from fungus *Aspergillus awamori* expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using different carbon sources // *Brazilian Journal of Microbiology.* 2008. Vol. 39. P. 108-114.
9. Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review // *Yeast.* 1992. Vol. 8. P. 423-488.
10. Wang, R., Wang D., Gao X., Hong J. Direct fermentation of raw starch using a *Kluyveromyces marxianus* strain that expresses glucoamylase and alpha-amylase to produce ethanol // *Biotechnol. Prog.* 2014. Vol. 30, № 2. P. 338-347.
11. *Yeast Protocols Handbook*, Clontech, July 2009.
12. Yongji, W., Hongdi, L., Tong, S., Shuzheng, Z. Cloning of the *Aspergillus awamori* glucoamylase gene and expression in *Saccharomyces cerevisiae* // *Chinese Science Bulletin.* 1998. Vol. 43, № 10. P. 24-28.