

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БАЦИЛЛЯРНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ
РЕКОМБИНАНТНЫМИ ДРОЖЖАМИ *PICHIA PASTORIS*

Ю.А. Васильева, Д.С. Пудова, М.Р. Шарипова

«Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

В настоящее время возрастает интерес к ферментным препаратам, применяемым в области сельского хозяйства, в частности как компоненты кормов для сельскохозяйственных животных и птиц. К ним, в частности, относятся ферменты протеиназы, которые расщепляют высокомолекулярные белковые соединения до коротких пептидов и аминокислот. Субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus* 3–19 обладает широкой субстратной специфичностью, сохраняет стабильность в широком диапазоне рН и температуры и проявляет максимальную активность при температуре 37° С и рН 9.0 [1]. Это позволяет предположить, что использование сериновой протеиназы *B. pumilus* 3–19 в качестве кормовой добавки может значительно улучшить качество кормов. На сегодняшний день, упрощение и снижение стоимости промышленного производства ферментов является актуальной задачей для биотехнологии. Одним из решений данной проблемы является использование гетерологичных систем экспрессии на основе клеток дрожжей *Pichia pastoris*. Система экспрессии на основе метилотрофных дрожжей *P. pastoris* обладает такими преимуществами, как низкая стоимость и легкость культивирования, способность производить функционально активные белки с правильной посттрансляционной модификацией, безопасный статус дрожжей, а так же высокая скорость увеличения биомассы за относительно короткое время [2].

Целью данного исследования являлось получение стабильной экспрессии оптимизированного гена протеиназы в дрожжах *P. pastoris*. В работе использовали сигнальные пептиды киллер-белка *Saccharomyces cerevisiae*, лизоцима *Gallus gallus* и интегративные вектора рPINK-НС/рPINK-LC. Клонирование конструкций проводили в клетках *E. coli* DH5а, целостность конструкций подтверждали секвенированием. Для эффективной экспрессии белка, клетки *P. pastoris* трансформировали дрожжевыми векторами с интегрированным геном протеиназы. Эффективность трансформации для конструкций с вектором рPINK-НС составила ~0.97x10³ трансформантов/мкг ДНК, для конструкций с вектором рPINK-LC ~1.42x10³ трансформантов/мкг ДНК. С помощью ПЦР анализа подтвердили наличие интегрированного в геном дрожжей гена бактериальной протеиназы. Внеклеточное накопление рекомбинантного фермента проверяли с помощью белкового электрофореза и измерения протеолитической активности по гидролизу специфического субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Было показано, что активность протеиназы у штаммов дрожжей, в геном которых были клонированы конструкции на основе низкокопийного вектора рPINK-LC показали более высокую специфическую активность, чем конструкции на основе вектора рPINK-НС. Максимальная активность была установлена у штамма дрожжей, в геном которого интегрировали ген протеиназы под контролем сигнального пептида лизоцима – 5.4 Ед./мл.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФ № 16–16–04062.

ЛИТЕРАТУРА

- Михайлова, Е.О. Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* aj73 на разных фазах роста бацилл [Текст] / Е.О. Михайлова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Биохимия. – 2007. – Т.2. – Р. 228–235.
- Balamurugan, V. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins – Vaccines [Text] / V. Balamurugan, G.R. Reddy, V.V.S. Suryanarayana // Indian Journal of Biotechnology. – 2007. – V.6. – P. 175–186.