

УДК 577.2

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНГИОГЕНИНА ЧЕЛОВЕКА В ДРОЖЖАХ *SACCHAROMYCES BOULARDII*

Е.А. Белаи, Д.Н. Щербаков, Е.А. Колосова, Д.В. Балабова

ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия

Человеческий ангиогенин является белком, участвующим в ангиогенезе. Ангиогенин – востребован как препарат, который способствует заживлению ран, трофических язв, ожогов, лечению инфарктов, церебральных тромбозов и других заболеваний, связанный с нарушением васкуляризации. Потенциальной областью применения ангиогенина может быть терапия и диагностика ряда заболеваний, в том числе онкологических и нейродегенеративных [1].

Рекомбинантный ангиогенин ранее был получен при помощи продуцентов на основе *Escherichia coli*[2], дрожжей *Pichia pastoris*[3], и клеток млекопитающих ВНК[4]. Также описан способ получения натурального ангиогенина из молока [5]. Получение ангиогенина при помощи каждого из рассматриваемых подходов не лишено недостатков, поэтому разработка новых штаммов-продуцентов является актуальным направлением. Пробиотические дрожжи *Saccharomyces boulardii* являются перспективной платформой для получения рекомбинантных белков, поскольку признаны безопасными и имеют статус GRAS, а также широко используются для лечения различных заболеваний кишечника и улучшения пищеварения. Безопасность, полностью секвенированный геном, оптимальный рост при 37 °С, устойчивость к кислой среде, способность к секреции и фолдингу эукариотических белков, делают дрожжи *S. boulardii* удобной системой экспрессии гетерологичных рекомбинантных белков. В настоящее время описано множество генетических инструментов, промоторов, маркеров отбора и потенциальных сайтов интеграции которые позволяют получать рекомбинантные белки в *S. boulardii*[6].

Целью нашей работы была разработка интеграционного вектора для получения рекомбинантного ангиогенина человека в дрожжах *S. boulardii*. На первом этапе был проведен дизайн вектора GH-TEF-Bul-Ang (рис. 1), позволяющий интегрировать экспрессионную кассету, содержащую ген ангиогенина человека, в дрожжевой геном по принципу гомологичной рекомбинации.

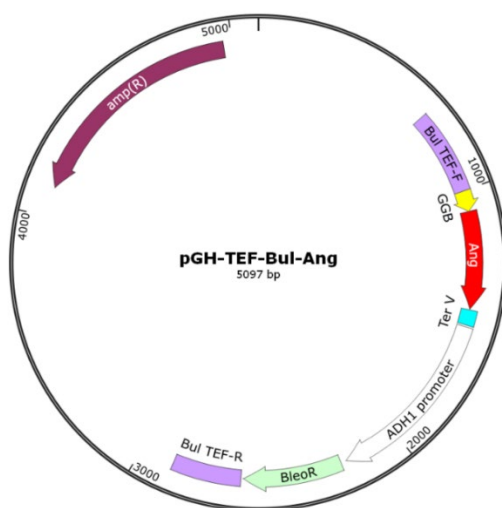


Рис. 1 – Генетическая карта плазмиды pGH-TEF-Bul-Ang

При разработке вектора было решено использовать сильный конститутивный промотор фактора элонгации трансляции (TEF), под контролем которого находится экспрессия ангиогенина человека (Ang). В состав кассеты также были включены: сигнальный пептид GGB, обеспечивающий секрецию белка во внеклеточное пространство; терминаторная последовательность TerV; промотор гена алкогольдегидрогеназы (ADH1 promoter) и ген устойчивости к зеоцину (BleoR) как селективный маркер.

С использованием олигонуклеотидных праймеров были получены ампликоны экспрессионной кассеты: промотор гена алкогольдегидрогеназы и гена устойчивости к зеоцину (рис. 1, 1512...2613), ген рекомбинантного ангиогенина человека с промоторной и терминаторной частью (рис. 1, 282...1518). Очищенные ПЦР-продукты клонировали в составе вектора pJET, нуклеотидный состав определяли секвенированием по Сенгеру.

Полученные векторы обрабатывали эндонуклеазами рестрикции F<sub>ri</sub>OI, AspA2I, CciNI. Продукты реакций гидролиза лигировали. Лигазной смесью проводили химическую трансформацию компетентных клеток *Escherichia coli* StbI3, которые высевали на селективную питательную среду, содержащую ампициллин. Полученный вектор секвенировали по методу Сенгера. В результате был получен вектор pGH-TEF-Bul-Ang.

Плазмиду pGH-TEF-Bul-Ang обрабатывали ферментом ZrmI и 1–2 мкг полученной ДНК трансформировали электрокомпетентные клетки *S. boulardii*. Была проведена электропорация клеток ранней логарифмической фазы при следующих параметрах: 2500 В, 25 мкФ и продолжительность импульсов 4,6 мс. Трансформанты отбирали на среде YPD, содержащей антибиотик зеоцин в концентрации 0,0064 мг/мл. Наличие встройки экспрессионных кассет подтверждали методом ПЦР с колонии (рис. 2).

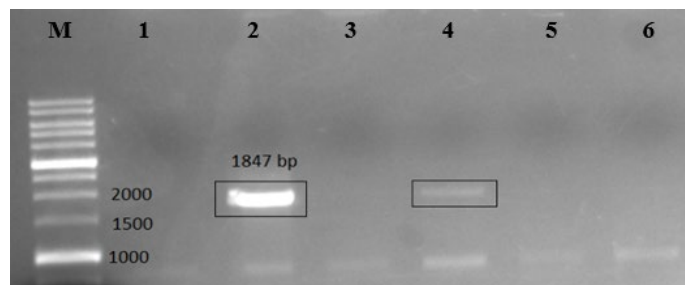


Рис. 2 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов в агарозном геле: М – маркеры молекулярных масс, 1–6 – номер индивидуальных колоний после электропорации

Из шести клонов, положительный результат был получен для второго и четвертого клона. Второй клон был протестирован на способность секретировать ангиогенин в культуральную среду. Для этого клетки переносили в 25 мл среды YPD, содержащей 2 % глюкозы, культивирование проводили при 37 °С и 200 об/мин в течение 144 часов. Отбор образцов культуральной жидкости проводили каждые 24 часа. Полученные алиquotы центрифугировали при 3000g 10 минут. Наличие целевого белка в образцах подтверждали методом белкового электрофореза в 15 %-ном ДСН-ПААГ по Лэммли, визуализацию гелей проводили окрашиванием кумасси.

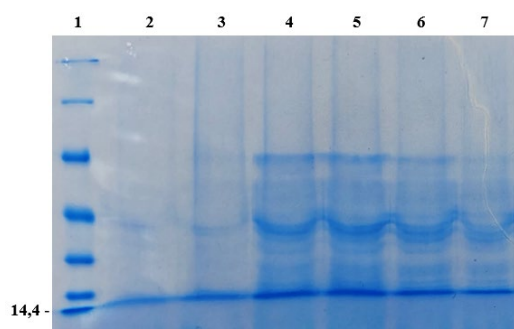


Рис. 3 – Электрофореграмма разделения белковых препаратов в ПААГ: 1 – маркеры молекулярных масс, 2–7 – продолжительность культивирования 24, 48, 72, 96, 120 и 144 часа соответственно

Полоса, соответствующая ангиогенину с ожидаемой молекулярной массой около 14 кДа, наблюдалась уже через 24 часа культивирования (рис. 3). Через 72–96 часа отмечали максимальный уровень синтеза. Таким образом, нами был сконструирован интеграционный плазмидный вектор, которым электропорировали компетентные клетки *S. boulardii*. В результате был получен продуцент рекомбинантного ангиогенина человека. Наличие целевого белка подтверждали методом белкового электрофореза. В дальнейшей работе запланирована очистка рекомбинантного ангиогенина человека, оценка иммуноспецифичности синтезируемого белка с использованием антител и оценка его специфической активности на хориоаллантоисной оболочке куриного эмбриона.

**Работа поддержана средствами программы развития  
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»  
«Приоритет-2030».**

## Литература

1. Sheng J., Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2015. – Vol.48. – P.399–410.
2. Shapiro R., Harper J.W., Fox E.A., Jansen H.W., Hein F., Uhlmann E. Expression of Met-(-1) angiogenin in *Escherichia coli*: conversion to the authentic less than Glu-1 protein // *Anal Biochem*, 1988. – Vol.175. – P.450–461.
3. Xia W.R., Fu W.L., Cai L. Expression, purification and characterization of recombinant human angiogenin in *Pichia pastoris* // *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012. – Vol.76. – P.1384–1388.
4. Kurachi K., Rybak S.M., Fett J.W. Expression of human angiogenin in cultured baby hamster kidney cells // *Biochemistry*, 1988. Vol.27. – P.6557–6562.
5. Fedorova T.V., Komolova G.S., Rabinovich M.L., Tikhomirova N.A., Shalygina A.M. Milk ultrafiltrate as a promising source of angiogenin // *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2002. – Vol.38. – P.221–224.
6. Douradinha B., Reis V.C., Rogers M.B., Torres F.A., Evans J.D., Marques E.T. Jr. Novel insights in genetic transformation of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Bioengineered*, 2014. – Vol.5. – P.21–29.