

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ *ASPERGILLUS NIGER* В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *PICHIA PASTORIS*

Е.А. Белаиш, Д.Н. Щербаков

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия

Глюкозооксидаза (ЕС 1.1.3.4) представляет собой флавопротеин, катализирующий окисление глюкозы до глюконовой кислоты и перекиси водорода в присутствии молекулярного кислорода. Получение биосенсоров на основе глюкозооксидазы (GOX) для мониторинга уровня сахара в крови является востребованным направлением, что способствовало увеличению спроса на данный фермент. Плесневые грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium* являются наиболее широко используемыми хозяевами для лабораторного и промышленного производства GOX. В связи с умеренной продуктивностью актуальной задачей является получение глюкозооксидазы в гетерологичных системах экспрессии. Дрожжевая система экспрессии на основе *Pichia pastoris* является наиболее популярной для получения гетерологичного белка, поскольку недорога, имеет относительно быстрое время экспрессии, обеспечивает высокие выходы целевых полипептидов.

Цель работы – получение штамма продуцента рекомбинантной глюкозооксидазы на основе дрожжей *Pichia pastoris*.

Кодон оптимизированный ген глюкозооксидазы *Aspergillus niger* длиной 1759 п.н. амплифицировали с использованием пары праймеров, содержащих на 5' конце сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции PstI и SalI соответственно. Полученный ПЦР-продукт и вектор pPICZ обрабатывали рестриктазами, затем лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамма Stbl3. Выросшие на агаризованной питательной среде LB, содержащей 50 мкг/мл зеоцина, индивидуальные

колонии анализировали на содержание плазмиды pPICZ-GOX путем проведения ПЦР. Полученным вектором pPICZ-GOX трансформировали клетки дрожжей *Pichia pastoris* штамма X33. Трансформанты отбирали на среде YPDS (глюкоза 2 %), содержащей антибиотик зеоцин в концентрации 1000 мкг/мл.

Отобранные колонии культивировали в среде BMGY в течение 16 часов. Клетки центрифугировали 10 минут при 3000g. Индукцию проводили в 15 мл среды BMMY. Культивирование продолжали в течение 3 суток при 30 и 250 об/мин. Каждые 24 часа добавляли метанол до конечной концентрации 1 %. В результате наблюдали полосу, соответствующую глюкозооксидазе с ожидаемой молекулярной массой около 72 кДа (рис 1).

Для детекции активности глюкозооксидазы использовались одноразовые тест-полоски к глюкометру Diacont, показывающие изменение концентрации глюкозы после инкубации с культуральной жидкостью, содержащей рекомбинантный белок. Таким образом, был сконструирован вектор pPICZ-GOX и получен штамм продуцент *Pichia pastoris*/GOX-BEA, обеспечивающий синтез рекомбинантной глюкозооксидазы *Aspergillus niger*.

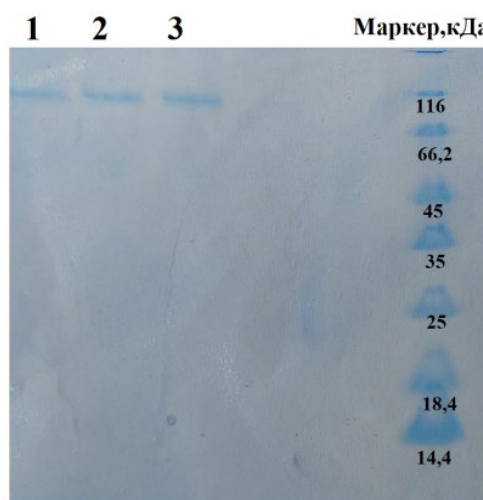


Рис. 1. Электрофореграмма разделения белковых препаратов в ПААГ, 1–3 – культуральная жидкость *Pichia pastoris* pPICZ-GOX после 3 суток индукции метанолом