

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Специальность: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

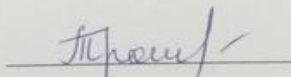
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ В
ДРОЖЖАХ *PICHLIA PASTORIS*

Работа завершена:

«31» 05 2017 г.



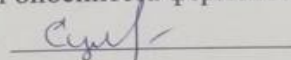
(Д.С. Трошагина)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., н.с. НИЛ Биотехнологии и биосинтеза ферментов

«31» 05 2017 г.



(А.Д. Сулейманова)

Заведующий кафедрой

ак. АН РТ, д.б.н., профессор

«1» июль 2017 г.



(О.Н. Ильинская)

Казань – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
Актуальность проблемы	4
Цель работы	5
Основные задачи исследования	5
Научная новизна	5
Структура и объем диссертации	6
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	7
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	7
Последовательности генов, плазмид и сигнального пептида	7
Штаммы бактерий и дрожжей	7
Питательные среды	8
Конструирование плазмид pPINK-НС/ <i>agpP</i> и pPINK-LC/ <i>agpP</i>	8
Трансформация клеток <i>E. coli</i> DH5 α плазмидной ДНК	9
Трансформация клеток <i>Pichia pastoris</i> плазмидной ДНК	10
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	10
Рестрикционный анализ	11
Гель-электрофорез ДНК	11
Выделение геномной ДНК из дрожжевых клеток	12
Индукция экспрессии белка рекомбинантными дрожжами <i>Pichia pastoris</i>	12
Белковый электрофорез	13
Вестерн-блоттинг	13
Определение фитазной активности	14
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	15
Оптимизация гена фитазы <i>Pantoea</i> sp. 3.5.1	15
Клонирование гена фитазы <i>Pantoea</i> sp. 3.5.1 в дрожжевые вектора pPINK-НС и pPINK-LC	17

Получение штаммов <i>Pichia pastoris</i> , несущих ген фитазы	
<i>Pantoea</i> sp. 3.5.1	19
Анализ экспрессии и секреции бактериальной фитазы	
<i>Pantoea</i> sp. 3.5.1 рекомбинантными штаммами <i>Pichia pastoris</i>	21
ВЫВОДЫ	23

Актуальность проблемы. В полноценном питании животных и птиц особое значение имеет фосфор. Это один из основных структурных компонентов организма, который принимает активное участие во многих обменных, энергетических и регуляторных процессах, входит в состав важнейших метаболитов. Фосфор семян растений, используемых в качестве кормов, недоступен для питания животных, поскольку основная его часть (до 80%) находится в форме нерастворимых фитатов. Кроме того, фитаты могут образовывать комплексы с белками и двухвалентными катионами, что также снижает их доступность для животных и птиц [Xiong *et al.*, 2005].

Микроорганизмы способны получать необходимый фосфор из фитата благодаря синтезируемым ферментам – фитазам. Фитазы гидролизуют фитат до спирта инозитола и свободных фосфатов. В желудочно-кишечном тракте животных с однокамерным желудком и птиц эти ферменты практически не вырабатываются, и неусвоенный фитиновый фосфор, проходя транзитом через пищеварительный тракт и адсорбируя ионы металлов, выводится с пометом животных. Часто навоз этих животных используется в качестве удобрения, что приводит к серьезным загрязнениям окружающей среды и эвтрофикации водоемов [Gontia *et al.*, 2012].

В современной индустрии кормления проблема недостатка усвояемого фосфора в питании животных является актуальной и решается по многим направлениям, одним из которых является вовлечение в питание сельскохозяйственных животных фитинового фосфора. На сегодняшний день задача решается путем использования микробных фитаз в качестве кормовых добавок. Это позволяет не только повышать продуктивность и прибыльность животноводства и птицеводства, что важно с экономической точки зрения, но и утилизировать фитаты, снижая тем самым загрязнения окружающей среды и сохраняя природные запасы фосфора. В свою очередь, использование ферментов в промышленности подразумевает масштабирование процессов их

синтеза и получения целевых продуктов. Поэтому, создание гетерологичных систем экспрессии на основе фитаз является одним из наиболее эффективных методов, позволяющих синтезировать достаточные количества ферментов, необходимые как для изучения их биохимических и энзиматических свойств, так и для их дальнейшего практического применения.

Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* на протяжении нескольких десятилетий широко используются для фундаментальных и прикладных исследований. Вместе с дрожжевыми векторами они представляют собой высокоэффективную систему экспрессии гетерологичных белков, обеспечивающую высокий уровень продукции за счет сильных и регулируемых промоторов и его секрецию при отсутствии протеолиза. Культура способна расти до высокой плотности клеток и синтезировать рекомбинантные белки в граммовых количествах на литр культуры как внутриклеточно, так и в процессе секреции.

Цель данной работы: клонирование и экспрессия гена бактериальной фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 в дрожжах *Pichia pastoris*.

Основные задачи исследования:

- 1) Получение генетических конструкций, содержащих оптимизированный ген фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 (*agpP*) под контролем индуцибельного промотора АОХ1 и сигнального пептида α -амилазы, с использованием интегративных бинарных дрожжевых векторов.
- 2) Электропорация дрожжевых клеток для интеграции бактериального гена фитазы в геном дрожжей и получения стабильных рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris* – продуцентов гетерологичных фитаз.
- 3) Анализ экспрессии и секреции бактериальной фитазы рекомбинантными штаммами *Pichia pastoris*.

Научная новизна. Как показывает практика, ни одна из известных фитаз не способна быть максимально эффективной для всех видов

сельскохозяйственных животных. Эти ферменты подразделены на группы, каждая из которых обладает уникальными свойствами, такими как оптимумы pH- и температуры, термостабильность, устойчивость к протеолизу, кислотности и действию металлов. Эти условия у разных видов животных, а также у животных одного вида, но разных возрастов и рационов питания, различаются. Поэтому, расширение арсенала препаратов фитаз с разными свойствами остается актуальным направлением.

На сегодняшний день все имеющиеся на рынке коммерческие препараты фитаз основаны на гистидиновых кислых фитазах. Используемая в работе фитаза AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1 также принадлежит данному семейству. Фермент обладает широкой субстратной специфичностью, pH-оптимум активности фермента составляет 4.5, а pH-стабильность находится в пределах 3.0 – 6.0. Стабильность фермента сохраняется в пределах от 10 до 45°C с оптимумом 37°C (Suleimanona et al., 2015). Низкие значения pH, при которых поддерживается активность и стабильность фермента, позволяют ему работать в кислой среде желудка животных и делают потенциально возможным использование фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 в качестве кормовой добавки.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов исследований и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 59 страницах машинописного текста, содержит 16 рисунков и 1 таблицу. Цитируемая литература включает 74 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Последовательности гена, плазмид и сигнального пептида

В работе использовали последовательность гена гистидиновой кислой фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 – *agpP* (AN KJ783401.1), из которой исключали последовательность собственного сигнального пептида. К структурной области гена добавляли С-терминальный гистидиновый таг (His-таг). Для корректной экспрессии целевого белка в дрожжах проводили оптимизацию кодонов нуклеотидной последовательности гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 (<http://www.genscript.com/codon-opt.html>). Кодон-оптимизированные гены были синтезированы и клонированы в вектор pUC57 компанией Genscript (США). Получена плазида pUC57-*agpP*, несущая оптимизированный ген фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1.

Для клонирования оптимизированного гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 в дрожжевой геном использовали интегративные дрожжевые вектора pPINK-НС и pPINK-LC (Invitrogen), в состав которых входит сильный индуцибельный промотор алкогольоксидазы (АОХ1), широко использующийся для экспрессии целевых генов.

Для секреции фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 в культуральную жидкость использовали сигнальный пептид гена α -амилазы *Aspergillus niger* (Invitrogen).

Штаммы бактерий и дрожжей

Для трансформации плазмиды pUC57-*agpP* с оптимизированным геном фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 и сконструированных плазмид pPINK-НС/*agpP* и pPINK-LC/*agpP* использовали штамм *E. coli* DH5 α .

Для гетерологичной экспрессии бактериальной фитазы в штаммах дрожжей мы использовали экспрессионную систему PichiaPink™ (Invitrogen), основанную на метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. Для работы использовали беспротеазный штамм дрожжей *Pichia pastoris* PichiaPink 4 (ade2,

per4, prb1) (Invitrogen) с делетированными генами секретируемых протеиназ: протеиназы А (*per4*) и протеиназы В (*prb1*). Штамм является *ade2* ауксотрофом.

Питательные среды

Культивирование бактерий проводили на среде Лурия-Бертани (LB): дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 5 г/л, триптон – 10 г/л. Агаризованная среда LB (LA) дополнительно включала 2% агара.

Культивирование дрожжей проводили на среде YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium, Invitrogen): дрожжевой экстракт – 10 г/л, глюкоза – 10 г/л, бактопептон – 10 г/л. Агаризованная среда YPD дополнительно включала 1.5% агара.

Культивирование дрожжей после электропорации проводили на среде YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol, Invitrogen): YPD среда, содержащая 1 сорбитол.

Отбор дрожжевых трансформантов проводили на синтетической среде PAD (Pichia Adenine Dropout Medium, Invitrogen): YNB (Yeast Nitrogen Base) – 13.4 г/л, CSM-ADE (Complete Supplement Mixture without adenine) – 1.25 г/л, биотин – 0.005 г/л, агароза – 20 г/л, 10X декстроза – 100 мл.

Для накопления биомассы рекомбинантные штаммы дрожжей культивировали на среде BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium, Invitrogen): 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 100 мМ фосфат калия (pH 6.0), 1.34% YNB (Yeast Nitrogen Base), 0.00004% биотин, 1% глицерол.

Для индукции экспрессии белка рекомбинантные штаммы дрожжей культивировали на среде BMMY (Buffered Methanol-complex Medium, Invitrogen): 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 100 мМ фосфат калия (pH 6.0), 1.34% YNB (Yeast Nitrogen Base), 0.00004% биотин, 0.5% метанол.

Конструирование плазмид pPINK-НС/ agpP и pPINK-LC/agpP

Клонирование оптимизированного бактериального гена в интегративные дрожжевые вектора pPINK-НС и pPINK-LC проводили путем трех-ступенчатого

лигирования вектора, бактериального гена и дрожжевого сигнального пептида. Для этого проводили рестрикцию векторов pPINK-НС и pPINK-LC рестриктазами EcoR I (10000 Ед/мл) и Kpn I (10000 Ед/мл) (New England Biolabs) с последующей обработкой щелочной фосфатазой (CIAP, 20 Ед/мкл) (Thermo Fischer Scientific), чтобы предотвратить самолигирование.

При клонировании использовали нуклеотидную последовательность сигнального пептида гена α -амилазы *Aspergillus niger*. Последовательность сигнального пептида содержала на 5'-конце EcoRI-совместимый фосфорилированный хвост для корректного встраивания в вектор, и тупой фосфорилированный 3'-конец. Последовательность встраиваемого гена так же должна иметь тупой фосфорилированный 5'-конец и KpnI-совместимый 3'-конец. Это было учтено при синтезе гена бактериального фермента, к 3'-концу которого добавили сайты рестрикции Kpn I. Для создания фосфорилированного 5'-конца вставки мы использовали фосфорилированный праймер – Agp-Ph-F (5'-Ph-gccgctgatggcgatatgc-3'). ПЦР-продукт с плазмиды pUC57-*agpP* с использованием пары праймеров Agp-Ph-F и M13R(-48) (5'-agcggataacaatttcacacagga-3') рестрицировали по сайту Kpn I.

Проводили трехступечатое лигирование вектора (pPINK-НС/ pPINK-LC), последовательности сигнального пептида и бактериального гена *agpP* с помощью Т4 ДНК-лигазы (5 Ед/мкл) (Thermo Fisher Scientific) с последующей трансформацией лигированной смеси в клетки *E.coli* DH5 α . Корректность встраивания сигнального пептида и целевого гена проверяли секвенированием с использованием праймеров к дрожжевым векторам: AOX1-For (5'-gactggtccaattgacaagc-3') и CYC1-Rev (5'- gcgtgaatgtaagcgtgac-3').

Трансформация клеток *E. coli* DH5 α плазмидной ДНК

Трансформацию клеток *E. coli* DH5 α плазмидной ДНК осуществляли химическим способом с использованием CaCl₂-метода [Sambrook *et al.*, 1989]. Для трансформации к 100 мкл компетентных клеток добавляли 1-2 мкг ДНК.

Суспензию клеток высевали на чашки Петри со средой LA и антибиотиком ампициллином (100 мкг/мл). Клетки выращивали при 37°C до появления колоний. Хранили при 4°C.

Трансформация клеток *Pichia pastoris* плазмидной ДНК

Для приготовления компетентных клеток 1 колонию дрожжей, выращенных при 28°C на чашках Петри с агаризованной YPD-средой переносили в 10 мл YPD-среды и выращивали в колбах объемом 150 мл в течение 1-2 дней при 28°C и 300 об/ мин. Полученной культурой засеивали 100 мл YPD-среды до достижения оптической плотности клеток $OD_{595} = 0.2$. Дрожжи выращивали дрожжи в колбах объемом 1 л при 28°C и 300 об/мин в течение 1-2 дней до достижения оптической плотности клеток $OD_{595} = 1.3-1.5$. Далее суспензию клеток осаждали центрифугированием при 1500 rcf и 4 °C в течение 5 мин, супернатант сливали. Клетки ресуспендировали сначала в 250 мл холодной стерильной воды, осаждали, затем в 50 мл холодной воды. Далее клетки ресуспендировали сначала в 10 мл холодного 1М сорбитола, осаждали, затем в 300 мкл 1 М сорбитола. Полученные компетентные клетки хранили во льду и использовали в тот же день.

Для трансформации к 80 мкл компетентных дрожжевых клеток добавляли 5-10 мкг плазмидной ДНК, предварительно линеаризированной рестриктазой SpeI (10000 Ед/мл) (New England Biolabs). Трансформацию дрожжевых клеток проводили методом электропорации [Madden *et al.*, 2015]. Суспензии клеток из высевали на чашки Петри с селективной PAD-средой. Клетки выращивали при 28°C в течение 3-10 дней до появления белых колоний. Хранили при 4°C.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для амплификации гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1. с плазмиды pUC57-agpP использовали праймеры Agp-Ph-For (5'-Ph-gccgctgatggcgatatgc-3') и M13R(-48) (5'-agcggataacaatttcacacagga-3'). Реакцию амплификации проводили с помощью

термоциклера «MJ mini» (BioRad). ПЦР-программа для амплификации: денатурация ДНК 30 сек при 98°C; затем 10 сек при 98°C, отжиг праймеров 25 сек при 61°C, элонгация 50 сек при 72°C, всего 30 циклов; заключительный синтез при 72°C в течение 10 мин, хранение при 4°C.

Для анализа бактериальных клонов проводили ПЦР с колоний трансформантов с использованием комбинации праймеров AOX1-For и CYC1-Rev. Одну колонию помещали в стерильный эппендорф с 15 мкл дистиллированной воды и перемешивали. Для ПЦР-реакции в качестве матрицы ДНК использовали 5 мкл полученного раствора. ПЦР-программа для амплификации: денатурация ДНК 2 мин при 95°C; затем 30 сек при 95°C, отжиг праймеров 30 сек при 55°C, элонгация 2 мин при 72°C, всего 35 циклов; заключительный синтез при 72°C в течение 5 мин, хранение при 4°C.

Рестрикционный анализ

Для проверки бактериальных трансформантов плазмиды выделяли с помощью набора реагентов GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Fisher Scientific) и рестрицировали по сайтам EcoRI и KpnI. Результаты визуализировали при помощи гель-электрофореза ДНК.

Гель-электрофорез ДНК

Электрофорез проводили в горизонтальном 1% агарозном геле. В качестве электродного буфера использовали 40 мМ трис-ацетатный буфер (pH 7.6), содержащий 1мМ ЭДТА. Для внесения в гель пробу смешивали с краской (6X DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) в соотношении 3:1. Электрофорез проводили при напряжении 100 В в течение 40 мин. Гель просматривался в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе (TCP – 20.MC / France / VILBER LOURMAT). В качестве маркера молекулярного веса ДНК использовался маркер 10 kb (Thermo Scientific).

Выделение геномной ДНК из дрожжевых клеток

Колонии дрожжей помещали в эппендорф с 1 мл стерильной воды, перемешивали и центрифугировали при 14 тыс/об в течение 10 секунд. Удаляли супернатант. К полученному осадку добавляли 200 мкл Smash-Grab-буфера (5 мл 10% додецилсульфат натрия (SDS), 5 мл 20% Triton X-100, 1.25 мл 4 М NaCl, 100 мкл 500 мМ ЭДТА, 500 мкл 1 М Tris, pH 8.0, 38.15 мкл воды), 200 мкл смеси [фенол:хлороформ:изоамиловый спирт] (25:24:1) и ресуспендировали. Далее к смеси добавляли 0.3 г стеклянных шариков (диаметром 0.45 мкм) и встряхивали на гомогенизаторе FastPrep-24 (Biomedicals) в течение 3 минут. После чего добавляли 200 мкл TE-буфера (10 мМ Tris, 1 мМ ЭДТА, pH 8.0) и перемешивали в течение 5 секунд. Центрифугировали при 14 тыс/об в течение 5 мин и переносили супернатант в чистый эппендорф. Добавляли 1 мл 100% этанола и центрифугировали при 14 тыс/об в течение 15 минут. Супернатант удаляли, а полученный осадок ресуспендировали в 400 мкл TE-буфера и 1 мкл РНКазы А. Инкубировали при 37°C в течение 5 минут. Добавляли 1 мкл 4 М NaCl, 10 мкл протеиназы К и 20 мкл 10% SDS. Инкубировали при 37°C в течение 5 минут. Добавляли 400 мкл раствора [фенола: хлороформ: изоамиловый спирт] (25:24:1), перемешивали и центрифугировали при 14 тыс/об в течение 5 минут. Супернатант (~400 мкл) переносили в новый эппендорф, добавляли 40 мкл 3 М ацетата натрия и 1 мл 100% этанола. Перемешивали и центрифугировали при 14 тыс/об в течение 15 минут. Супернатант удаляли, ДНК промывали 70% этанолом, центрифугировали при 14 тыс/об в течение 15 минут, осадок высушивали при 37°C в течение 10 минут и ресуспендировали в 200 мкл TE-буфера. Пробы хранили при -20°C.

Индукция экспрессии белка рекомбинантными дрожжами *Pichia pastoris*

Для индукции экспрессии белка рекомбинантными дрожжами *Pichia pastoris* использовали среду с глицеролом (BMGY) и метанолом (BMMY). Одну

колонию дрожжевых трансформантов переносили в 10 мл BMDY-среды и выращивали в колбах объемом 150 мл в течение 1-2 дней при 28°C и 300 об/мин. Далее клетки осаждали в центрифуге при 1500 gcf в течение 5 мин, супернатант сливали. Далее для индукции экспрессии белка к клеткам добавляли 2 мл BMDY-среды и растили их при 28°C и 300 об/мин в течение 12-15 часов. Далее в среду вносили 100 мкл метанола и растили еще 12-15 часов. После этого культуру центрифугировали при 1500 gcf в течение 10 мин, полученный супернатант замораживали в жидком азоте и хранили при - 20°C.

Белковый электрофорез

Разделение белков по молекулярной массе проводили в денатурирующих условиях в присутствии SDS в 12.5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли. Электрофорез проводили при напряжении 80 В – 30 мин и 140 В – 1 час с помощью прибора Mini-PROTEAN II Electrophoretic Cell (BioRad).

Краситель для проб: (4-х кратный раствор): Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8) – 3 мл, SDS – 0.4 г, дитиотреитол (DTT) – 0.3 г, бромфеноловый синий. Пробы с добавлением буфера нагревали в течение 5 минут при 95°C. Использовали молекулярный маркер PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas), состоящий из окрашенных белков от 10 до 180 кДа. После окончания электрофореза для детекции фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1, имеющей в своей структуре С-терминальный His-таг, проводили иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг).

Вестерн-блоттинг

Для проведения вестерн-блоттинга осуществляли перенос разделенных в результате электрофореза белков с ПААГ на поливинилиденфторид-мембрану (PVDF-мембрану), активированную в метаноле в течение 10 секунд и промытую дистиллированной водой, при напряжении 90 В в течение 50 мин в Transfer-буфере (Tris-HCl, глицин, метанол, 10 % SDS) с помощью прибора Mini-PROTEAN II Electrophoretic Cell (BioRad). После переноса для блокировки неспецифического связывания антител PVDF-мембрану помещали в раствор

5%-го молока следующего состава: PBS-буфер (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄), обезжиренное сухое молоко, 0.1% Твин-20.

Исследуемые белки на мембране детектировали с использованием первичных антител 6x-His Epitope Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8) (Thermo Scientific) с разведением 1:3000. Вторичные антитела Pierce Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase conjugated (Thermo Scientific) использовали в разведении 1:10000. В качестве субстрата для проявления мембраны использовали растворы SuperSignal West Pico Stable Peroxidase Solution и SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution (Thermo Scientific). Детекцию флуоресценции осуществляли с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (BioRad).

Определение фитазной активности

Активность фермента определяли по методу Грейнера по количеству высвободившегося фосфора при гидролизе субстрата фитата натрия (Sigma Aldrich, США) [Greiner, 2004]. За единицу активности принимали то количество фермента, которое расщепляло фитат натрия с образованием 1 мкМ неорганического фосфата за одну минуту. Фитазную активность рассчитывали по формуле:

$$U = (E_A - E_B) * F * \text{разведение}$$
, где E_A – значения $D_{\text{опт}}$ опыта, E_B – значения $D_{\text{опт}}$ контроля, $F = \frac{1}{t} * \frac{1}{d * \varepsilon} * \frac{V_{\text{общ}}}{V_{\text{ферм}}}$, где $d = 1$ см (кювета), $\varepsilon = 8.7$ см² (коэффициент экстинкции субстрата фитата натрия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Оптимизация гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1

Микробные фитазы привлекают особое внимание биотехнологов для практического использования в животноводстве, сельском хозяйстве и охране окружающей среды. Показано, что добавка фитазы в корм животных увеличивает биодоступность фосфора у животных с однокамерным желудком и снижает уровень выхода фосфора [Lei *et al.*, 2007]. Фитазы, принадлежащие к семейству гистидиновых кислых фитаз, успешно используются в качестве кормовых добавок. Хотя коммерческое производство фитаз в настоящее время сосредоточено на грибных фитазах, исследования показали, что бактериальные фитазы более перспективны из-за их термостабильности, более широкой субстратной специфичности, большей устойчивости к протеолизу и лучшей каталитической эффективности [Lei *et al.*, 2007].

В работе использовали последовательность гена гистидиновой кислой фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 – *agpP* (AN KJ783401.1). Фитаза *Pantoea* sp. 3.5.1 обладает широкой субстратной специфичностью по гидролизу таких фосфорилированных соединений, как фитат, глюкозо-1-фосфат и глюкозо-6-фосфат. pH-стабильность фермента находится в пределах 3.0 – 6.0, pH-оптимум составляет 4.5. Стабильность фермента сохраняется в пределах 10-45°C с оптимумом 37°C [Suleimanova *et al.*, 2015]. Широкие пределы pH, в которых поддерживается активность фермента, потенциально позволяют использовать фитазу *Pantoea* sp. 3.5.1 в качестве добавки к кормам животных.

Для эффективной экспрессии в дрожжах оптимизировали последовательность гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1: исключали последовательность собственного сигнального пептида, к последовательности структурной области гена добавляли C-терминальный His-таг, необходимый для

детекции фитазы с помощью иммуноблоттинга и очистки фермента из культуральной жидкости дрожжей при помощи аффинной хроматографии.

Для корректной экспрессии в дрожжах проводили оптимизацию кодонов нуклеотидной последовательности гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1, в процессе которой учитывали следующие параметры: частота встречаемости различных кодонов у дрожжей, содержание GC-пар, вторичная структура мРНК, преждевременные PolyA-сайты, прямые и обратные повторы в ДНК и др.

Для оценки кодирующего потенциала рассматриваемой ДНК последовательности используют индекс адаптации кодонов (CAI), который рассчитывается как произведение отношений частоты встречаемости в геноме каждого присутствующего в последовательности кодона к частоте встречаемости в геноме наиболее частого синонимичного кодона, кодирующего ту же аминокислоту. Установлено, что чем выше значение индекса, тем выше уровень экспрессии гена ($CAI_{max}=1.0$) [Sharp, Li, 1987]. На рисунке 1 приведены индексы адаптации кодонов гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 до и после оптимизации для экспрессии в клетках *Pichia pastoris*. Кодон-оптимизированный ген был синтезирован и клонирован в вектор pUC57 компанией Genscript (США).

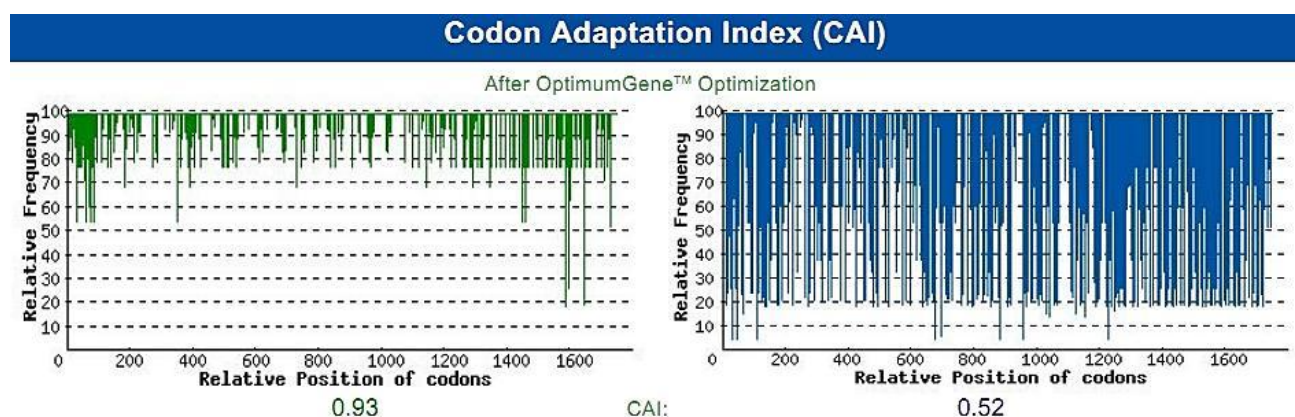


Рисунок 1 – Индекс адаптации кодонов (CAI) гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1. до (синий цвет, CAI=0.52) и после (зеленый цвет, CAI=0.93) (наилучшим значением CAI считается 0.8 – 1.0).

Клонирование гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 в дрожжевые вектора pPINK-НС и pPINK-LC

Для клонирования оптимизированного бактериального гена использовали интегративные дрожжевые вектора pPINK-НС и pPINK-LC, имеющие в своем составе сильный индуцибельный промотор алкогольоксидазы (AOX1). Для секретиции рекомбинантной фитазы дрожжевыми клетками использовали последовательность сигнального пептида гена α -амилазы *Aspergillus niger*.

Провели рестрикцию векторов pPINK-НС и pPINK-LC рестриктазами EcoRI и KpnI. Последовательность сигнального пептида α -амилазы *Aspergillus niger* содержала на 5'-конце EcoRI-совместимый фосфорилированный хвост для корректного встраивания в вектор, и тупой фосфорилированный 3'-конец. Последовательность встраиваемого гена так же должна иметь тупой фосфорилированный 5'-конец и KpnI-совместимый 3'-конец, что было учтено при синтезе гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1., к 3'-концу которого добавили сайты рестрикции KpnI. Для создания фосфорилированного 5'-конца вставки мы использовали фосфорилированный праймер – Agp-Ph-F. ПЦР-продукт (размером 1690 п.о.) с плазмиды pUC57-agpP с использованием пары праймеров Agp-Ph-F и M13R(-48) выделили из геля (рисунок 2) и рестрицировали по сайту KpnI.

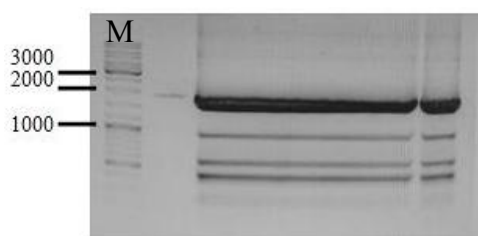


Рисунок 2 – Электрофорез продукта амплификации гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1. с плазмиды pUC57-agpP (М – ДНК-маркер).

Провели трехступечатое лигирование вектора (pPINK-НС/ pPINK-LC), последовательности сигнального пептида α -амилазы *Aspergillus niger* и гена

фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1. Лигазную смесь трансформировали в клетки *E.coli* DH5 α . Трансформанты отбирали на среде с ампициллином (100 мкг/мл).

Для анализа клонов провели ПЦР с колоний трансформантов с использованием праймеров AOX1-For и CYC1-Rev (прямой и обратный праймеры к промоторной и терминаторной области дрожжевого вектора, соответственно) (рисунок 3), а так же рестрикционный анализ выделенных из трансформантов плазмид (рисунок 4). Размер ожидаемых ПЦР-продуктов составлял ~2100 п.о. (ген + сигнальный пептид + промотор и терминатор). Размер ожидаемых рестриктов составлял ~1750 п.о. (ген + сигнальный пептид). По результатам рестрикционного и ПЦР-анализа для дальнейшей работы отобрали следующие трансформанты каждого варианта – pPINK-HC-agpP3, pPINK-HC-agpP4, pPINK-HC-agpP6 и pPINK-LC-agpP6.

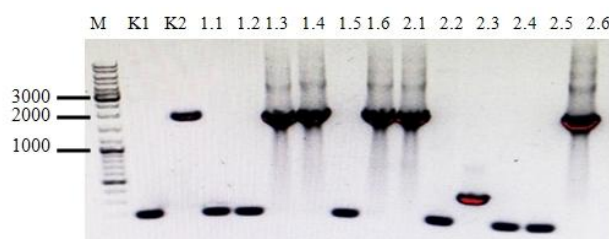


Рисунок 3 – Электрофорез продуктов амплификации гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 с трансформированных колоний *E.coli* DH5 α :

М – ДНК-маркер; K1 – отрицательный контроль (плазмиды pPINK-HC); K2 – положительный контроль (плазмиды pPINK-HC-agpP); 1.1-1.6 – трансформанты с pPINK-HC-agpP; 2.1-2.6 – трансформанты с pPINK-LC-agpP.

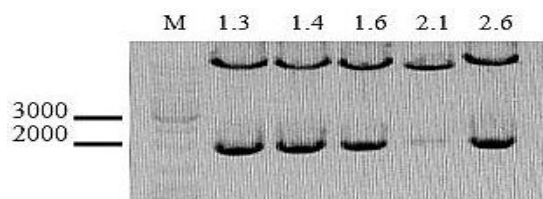


Рисунок 4 – Рестрикционный анализ выделенных из трансформантов плазмид с геном фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1:

М – ДНК-маркер; 1.3-1.6 – pPINK-HC-agpP; 2.1, 2.6 – pPINK-LC-agpP.

Получение рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*, несущих ген фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1

Для промышленного использования ферментов процессы их синтеза и получения должны быть масштабированы. Для таких целей широко зарекомендовали себя дрожжевые системы экспрессии, которые, во-первых, обеспечивают эффективную секрецию белков в культуральную жидкость, во-вторых, поддерживают большинство посттрансляционных модификаций белков, и в-третьих, их культивирование не требует дорогостоящих сред и оборудования [Macauley-Patrick, Fazenda, 2005]. В работе была использована экспрессионная система PichiaPink™ компании Invitrogen (США), основанная на метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* и характеризующаяся высоким уровнем выхода целевого белка (г/л) с возможностью для крупномасштабного производства (10³ л).

Перед трансформацией провели подготовку трансформирующей ДНК для интеграции в геном *Pichia pastoris*. Для этого выделили полученные вектора (pPINK-НС-agpP3, pPINK-НС-agpP4, pPINK-НС-agpP6, pPINK-LC-agpP6) из *E. coli* и рестрицировали их по сайту SpeI для получения линейной конструкции.

Для трансформации использовали беспротеазный штамм *Pichia pastoris* PichiaPink4, из генома которого делетированы гены двух протеаз (*prb1* и *per4*). Штамм является *ade2* ауксотрофом и не способен расти при отсутствии аденина в среде. Трансформация штамма векторами pPINK-НС и pPINK-LC, которые, напротив, содержат ген *ade2* под собственным промотором, позволяет штамму расти на среде без аденина; трансформированные колонии имеют белый цвет.

Трансформацию штамма *Pichia pastoris* PichiaPink4 провели следующими конструкциями – pPINK-НС-agpP3 и pPINK-LC-agpP6; в качестве контроля использовали линеаризованные вектора pPINK-НС и pPINK-LC. На 7 день инкубации оценивали результат, проводя бело-розовый скриннинг – розовые колонии экспрессировали минимальное количество продукта гена *ADE2*, тогда

как белые колонии, напротив, экспрессировали большое количество продукта маркерного гена *ADE2*, что свидетельствовало о большем количестве копий интегрированной конструкции (рисунок 5).

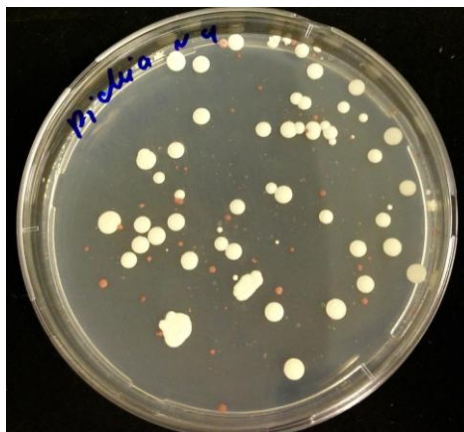


Рисунок 5 – Отбор дрожжевых трансформантов *Pichia pastoris* на селективной PAD-среде: белые колонии содержат большое количество копий интегративной конструкции, розовые – минимальное количество.

Для дальнейшей работы отбирали по 4 белых колонии с каждой трансформации. Из трансформантов выделяли геномную ДНК и проводили ПЦР с использованием праймеров к дрожжевому вектору AOX1-For и CYC1-Rev. Размер ПЦР-продуктов соответствовал ожидаемому (~2100 п.о.) (рисунок 6). Корректность интеграции подтверждена секвенированием.

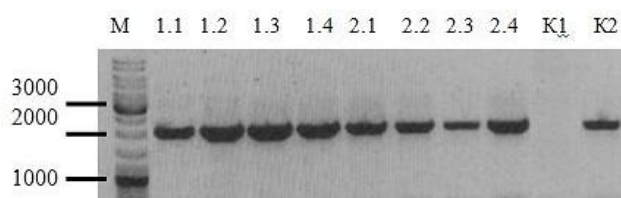


Рисунок 6 – Электрофорез продуктов амплификации гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 с геномной ДНК *Pichia pastoris*:

М – ДНК-маркер; 1.1-1.4 – трансформанты с pPINK-HC-agrP3; 2.1-2.2 – трансформанты с pPINK-LC-agrP6; K1 – отрицательный контроль (плазмида pPINK-HC); K2 – положительный контроль (плазмида pPINK-HC-agrP3).

Анализ экспрессии и секреции бактериальной фитазы *Pantoea* sp.

3.5.1 рекомбинантными штаммами *Pichia pastoris*

На первом этапе способность рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris* экспрессировать и секретировать фитазу *Pantoea* sp. 3.5.1 в культуральную среду оценивали с помощью вестерн-блоттинга. Для накопления биомассы рекомбинантные штаммы дрожжей сначала выращивали на среде, содержащей глицерол (BMGY). Поскольку промотор AOX1 индуцируется метанолом, то для анализа гетерологичной экспрессии бактериальной фитазы штаммами *Pichia pastoris* под управлением этого промотора, дрожжи переносили на среду с метанолом (BMMY). Для анализа использовали культуральную жидкость дрожжей. В качестве положительного контроля служила бактериальная фитаза AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1 размером 57 кДа, экспрессированная клетками *E.coli*. В качестве отрицательного контроля использовали культуральную жидкость нетрансформированных дрожжей *Pichia pastoris*. Результат вестерн-блоттинга культуральной жидкости трансформантов показал, что бактериальная фитаза *Pantoea* sp. 3.5.1 экспрессируется в дрожжевых клетках на уровне трансляции и секретируется в культуральную среду (рисунок 7).

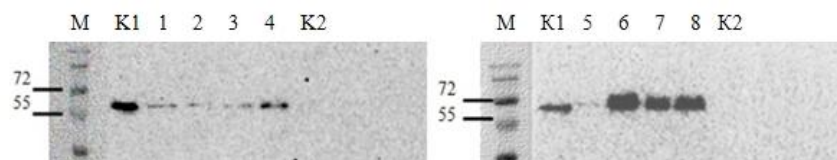


Рисунок 7 – Вестерн-блоттинг культуральной среды рекомбинантных дрожжей *Pichia pastoris*: М – молекулярный маркер; К1 – положительный контроль (бактериальная фитаза AgpP из клеток *E.coli* BL21 pLys); 1-4 – трансформанты pPINK-НС-agpP3-1, pPINK-НС-agpP3-2, pPINK-НС-agpP3-3, pPINK-НС-agpP3-4, соответственно; 5-8 – трансформанты pPINK-LC-agpP6-1, pPINK-LC-agpP6-2, pPINK-LC-agpP6-3, pPINK-LC-agpP6-4, соответственно; К2 – отрицательный контроль (белки культуральной жидкости нетрансформированных дрожжей *Pichia pastoris*).

Определяли фитазную активность в культуральной жидкости рекомбинантных дрожжей. Среди дрожжей, трансформированных конструкцией с pPINK-НС-agpP3, наибольшая фитазная активность обнаружена у трансформанта pPINK-НС-agpP3-1 (1.234 Ед/мл) (рисунок 8). У дрожжей, трансформированных конструкцией pPINK-LC-agpP6, наибольшая фитазная активность обнаружена у трансформантов pPINK-LC-agpP6-1, pPINK-LC-agpP6-3 и pPINK-LC-agpP6-4 (1.58, 1.45 и 1.37 Ед/мл, соответственно) (рисунок 8). В культуральной среде нетрансформированных дрожжей фитазной активности обнаружено не было (рисунок 8).

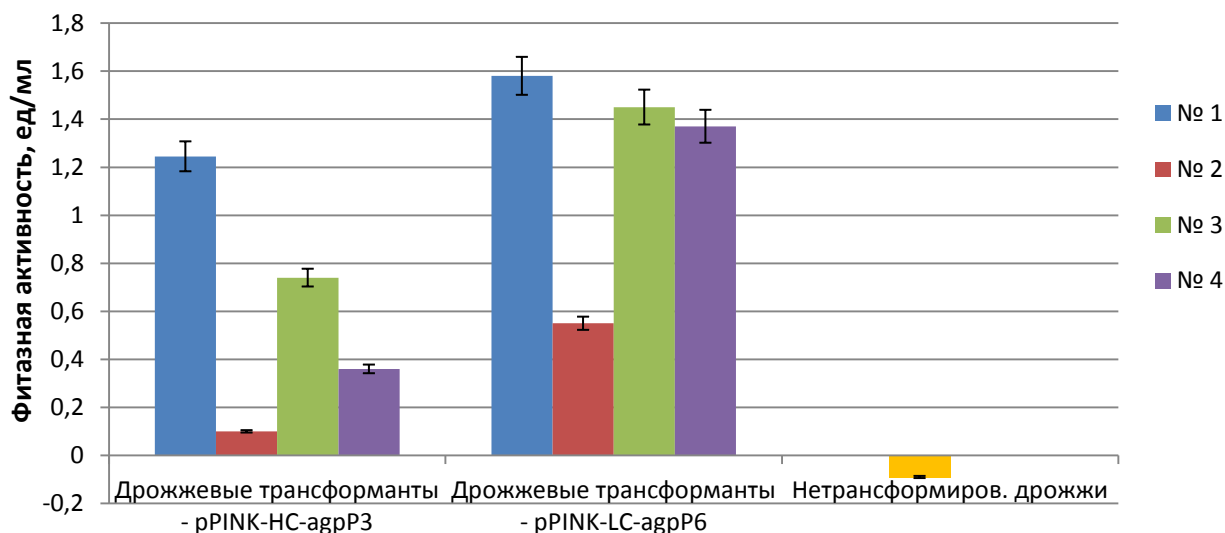


Рисунок 16 – Внеклеточная фитазная активность рекомбинантных дрожжей *Pichia pastoris*, содержащих интегрированный в геном ген бактериальной фитазы *agpP*.

ВЫВОДЫ

- 1) С использованием интегративных бинарных дрожжевых векторов получены генетические конструкции – pPINK-НС-agpP3, pPINK-НС-agpP4, pPINK-НС-agpP6, pPINK-LC-agpP6, содержащие оптимизированный ген фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 (*agpP*) под контролем индуцибельного промотора AOX1 и сигнального пептида α -амилазы.
- 2) Проведена электропорация дрожжевых клеток *Pichia pastoris* и получено 8 рекомбинантных штаммов *P. pastoris*, в геном которых интегрирован ген бактериальной фитазы *agpP*.
- 3) Результаты вестерн-блоттинга и анализа фитазной активности показали, что бактериальная фитаза AgpP экспрессируется на уровне трансляции и секретируется в культуральную жидкость рекомбинантными дрожжами *Pichia pastoris*.