

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ


Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ДРОЖЖЕЙ *PICHIA*
PASTORIS С ИНТЕГРИРОВАННЫМ ГЕНОМ БАЦИЛЛЯРНОЙ
ПРОТЕИНАЗЫ

Работа завершена:

« » _____ 2018г.  _____ (С.Р. Ногманова)

Работа допущена к защите:

Научные руководители

к.б.н., н. с.,

« » _____ 2018г.  _____ (Л.Р. Валеева)

д.б.н., профессор,

« » _____ 2018г.  _____ (М.Р. Шарипова)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор,

« » _____ 2018г.  _____ (О.Н. Ильинская)

Казань-2018

СОДЕРЖАНИЕ	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Протеолитические ферменты как основа биотехнологий	6
1.1.1 Бактериальные протеиназы	9
1.2 Бациллярные протеиназы-пробиотики в животноводстве	12
1.3 Гетерологичные системы экспрессии бактериальных протеиназ	14
1.3.1 Дрожжевые системы экспрессии	17
Заключение	22
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1 Штаммы и питательные среды	22
2.2 Плазмиды и конструкции экспрессионных систем	24
2.3 Выделение плазмидной ДНК	27
2.4 Рестрикция	27
2.5 Электрофорез ДНК в агарозном геле	28
2.6 Лигирование	28
2.7 Трансформация клеток <i>E. coli</i>	28
2.8 Анализ клонов	30
2.8.1 Генотипирование	30
2.8.2 Рестрикционный анализ	31
2.8.3 Геноинформационный анализ результатов секвенирования	31
2.9 Трансформация клеток дрожжей	31
2.9.1 Подготовка ДНК	
2.9.2 Электропорация	31

2.10 Протеолитическая активность	34
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	35
3.1 Получение гетерологичной системы экспрессии сериновой протеиназы <i>Bacillus pumilus</i> 3-19	35
3.2 Получение штамма дрожжей <i>Pichia pastoris</i> с интегрированным геном бактериальной протеиназы	38
3.3 Экспрессия бациллярной протеиназы в <i>Pichia pastoris</i>	39
ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	42

Одной из наиболее важных и хорошо изученных групп микробных ферментов являются протеазы, в связи с их широким распространением в живых организмах и разнообразием биологического действия, что обуславливает их широкое применение в фундаментальных исследованиях и промышленности. В живых организмах протеазы участвуют в механизмах молекулярного и внутриклеточного уровня, в процессах формирования тканей и пищеварения. Протеолитические ферменты используются в различных областях промышленности: пищевой, кожевенной, текстильной, в производстве фармацевтических препаратов. Бактерии рода *Bacillus* являются хорошо известными продуцентами секретируемых высокоактивных протеиназ различных классов. Актуальным направлением является разработка высокопродуктивных гетерологичных систем экспрессии бациллярных протеиназ, и наиболее подходящими продуцентами для рекомбинантной экспрессии являются дрожжи.

Получение гетерологичной системы экспрессии сериновой протеиназы *Bacillus pumilus* 3-19. Для создания гетерологичной системы экспрессии нами была использована последовательность гена сериновой щелочной протеиназы AprVp *B. pumilus* 3-19, из которой исключали последовательность собственного сигнального пептида. Для эффективной экспрессии бактериального гена в клетках дрожжей проводили оптимизацию гена *aprVp* с последующим химическим синтезом нуклеотидной последовательности. С 5'-конца гена протеазы добавляли последовательность сигнального пептида инвертазы *S. cerevisiae* для последующей секреции экспрессируемого рекомбинантного белка. С 3'-конца структурной области гена добавляли С-терминальную последовательность из шести остатков гистидина (His-tag), позволяющую детектировать белок с помощью иммуноблоттинга.

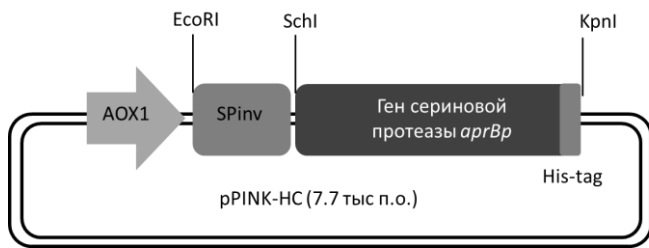


Рисунок 1 – Схема системы экспрессии гена бактериальной протеиназы AprBp. SPinv – последовательность сигнального пептида инвертазы; His-tag –

последовательность; АОХ1 – индуцируемый промотор алкогольоксидазы; EcoRI, KpnI, SchI – сайты рестрикции.

Последовательность гена *aprBp*-His-tag получали путем рестрикции несущего ее вектора рестриктазами SchI и KpnI. Размер последовательности составил около 1090 п.о., что соответствует ожидаемому размеру кодон-оптимизированного гена *aprBp*. Так же провели рестрикцию вектора рPINK-НС рестриктазами EcoRI и KpnI. Ожидаемый размер рестрицированного вектора рPINK-НС составлял 7667 п.о.

Провели субклонирование последовательности *aprBp*-His-tag совместно с сигнальным пептидом дрожжевой инвертазы SPinvertase в дрожжевой интегративный вектор рPINK-НС под контролем сильного индуцибельного дрожжевого промотора АОХ1. Клонирование проводили путем трехступенчатого лигирования вектора, бактериального гена и дрожжевого сигнального пептида. Полученную конструкцию рPINKSPinv::*aprBp*-His-tag трансформировали в клетки *E.coli* DH 5α. Отбор трансформантов проводили в стерильных условиях на среде LA с добавлением маркерного антибиотика – ампицилина (*Amp*). Наличие целевого гена обнаруживали с помощью ПЦР-анализа колоний *E.coli* DH5α, трансформированных вектором рPinkНС с геном протеазы. Результаты ПЦР подтвердили рестрикционным анализом с использованием рестриктаз EcoRI и KpnI. Размер ожидаемых рестриктов составлял ~ 1200 п.о. (ген + сигнальный пептид).

Таким образом, на основе интегративного дрожжевого вектора рPINK-НС нами получена генетическая конструкция SPinv::*aprBp*-His-tag, включающая дрожжевой сигнальный пептид инвертазы SPinv и кодон-оптимизированный ген щелочной сериновой протеиназы *Bacillus pumilus* 3-

19, интегрированный под контролем сильного индуцибельного дрожжевого промотора АОХ1

Получение штамма дрожжей *Pichia pastoris* с интегрированным геном бактериальной протеиназы. Провели трансформацию клеток дрожжей *P. pastoris* методом электропорации, интеграция конструкции проходила за счет гомологичной рекомбинации. Использовали ауксотрофный по аденину штамм *P. pastoris* PichiaPink 4 (*ade1*, *prb1*, *pep4*) (Invitrogen), у которого deletированы собственные протеазы, что позволяет избежать протеолиза рекомбинантного белка. Отбор клонов-трансформантов проводили на среде без добавления аденина. Наличие последовательности интегрированной конструкции рPINKSPinv::*aprVp*-His-tag в геноме дрожжей подтвердили генотипированием. Размер ПЦР-продуктов соответствовал ожидаемому (~1200 п.о.).

Таким образом, нами получены два рекомбинантных штамма *P. pastoris Apr1* и *P.pastoris Apr2*, содержащие интегрированный в геном ген сериновой протеиназы *Bacillus pumilus* 3-19.

Экспрессия бациллярной протеиназы в *P. pastoris*. Для подтверждения внеклеточной экспрессии сериновой щелочной протеиназы *AprVp* рекомбинантными штаммами *P. pastoris Apr1* и *Apr2* провели индукцию экспрессии конструкции SPinv::*aprVp*-His-tag добавлением индуктора (метанола) в питательную среду для активации промотора АОХ1. Исследовали динамику накопления биомассы, внеклеточного белка и экспрессии активной рекомбинантной протеиназы *AprVp*.

Измеряли внеклеточную протеолитическую активность в культуральной жидкости дрожжей. Протеолитическая активность штамма *P. pastoris Apr1* возрастала с 39 ч индукции экспрессии рекомбинантной протеиназы и достигала максимального значения на 63-71 ч индукции (1.24 Ед/мг±0.13).

Таким образом, нами получена система экспрессии оптимизированного гена щелочной сериновой протеиназы *AprVp B.pumilus* 3-

19 на основе дрожжевого интегративного вектора для внеклеточного синтеза бактериального белка клетками дрожжей *P.pastoris*. Показано, что рекомбинантные штаммы дрожжей *P.pastoris* с интегрированной конструкцией, содержащей ген бациллярной протеиназы и сигнальный пептид дрожжевой инвертазы под контролем сильного индуцируемого промотора, секретируют рекомбинантную протеиназу. Секреция активной рекомбинантной протеиназы соответствует 63-71 ч индукции экспрессии протеазы рекомбинантным штаммом *P. pastoris Apr1*. Максимальная протеолитическая активность AprVp составила 1.24 ± 0.13 Ед.акт/мг белка.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные протеиназы широко используются в различных областях промышленности, и имеют большой потенциал применения в качестве фармакологических препаратов и пробиотических средств, в частности, для улучшения усвоения кормов сельскохозяйственными животными. Бактерии рода *Bacillus* являются хорошо известными продуцентами секретируемых высокоактивных протеиназ различных классов. Сериновая щелочная протеаза почвенной бактерии *B. pumilus* 3-19 обладает широкой субстратной специфичностью и высокоактивна в диапазоне рН от 6.3 до 9.5 и температуре от 22 до 55 °С, что обуславливает перспективу ее использования в качестве пробиотической добавки. Однако экспрессия протеаз в клетках бацилл создает ряд трудностей в связи со сложностью проведения генно-инженерных работ в данных бактериях, а также с несоответствием полученных таким методом ферментов регламентам пищевой, сельскохозяйственной и фармацевтической индустрии. Решением данной проблемы является разработка высокопродуктивных гетерологичных систем экспрессии бациллярных протеиназ, и наиболее подходящими продуцентами для рекомбинантной экспрессии являются дрожжи *Pichia pastoris*.

Целью работы являлось получение рекомбинантных штаммов дрожжей *Pichia pastoris* с интегрированным геном бациллярной протеиназы *B. pumilus* 3-19.

В связи с поставленной целью решали следующие задачи:

1. Получение гетерологичной дрожжевой системы экспрессии сериновой протеиназы *Bacillus pumilus* 3-19.
2. Получение штамма дрожжей *P. pastoris* с интегрированным геном бактериальной протеиназы.
3. Экспрессия бациллярной протеиназы в *P. pastoris*.

ВЫВОДЫ

1. Получена гетерологичная система экспрессии сериновой щелочной протеиназы *B. pumilus* 3-19 с использованием интегративного бинарного дрожжевого вектора.

2. Получены штаммы дрожжей *P. pastoris*, с интегрированной в геном рекомбинантной конструкцией, включающей кодон-оптимизированный ген бациллярной протеиназы *aprVp* и сигнальный пептид под контролем индуцируемого дрожжевого промотора.

3. Рекомбинантная протеиназа *AprVp* секретируется клетками *P. pastoris* с 63 по 71 ч в условиях индукции метанолом. Максимальная протеолитическая активность рекомбинантной протеиназы составляет 1.24 ± 0.13 Ед.акт/мг белка.