Источник изображения: freepik.com

https://doi.org/10.21603/2073-4018-2024-4-10

УДК 602.3:579.8

Оригинальная статья

Экспрессионная система *Pichia pastoris* рекомбинантного химозина *Camelus dromedarius* с подбором оптимальных условий индукции белка*

Елена Ивановна Антонова, д-р биол. наук, профессор, директор научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
E-mail: antonov_67@mail.ru
Наталья Викторовна Фирсова, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
Наталья Анатольевна Ленгесова, канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории морфологии научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
Денис Александрович Викторов, канд. биол. наук, старший научный сотрудник научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
Атабег Батырович Ачилов, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
Павел Сергеевич Торутанов, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биологии научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
Ульяновский государственный педагогический университет имени И. Н. Ульянова, г. Ульяновск

В работе рассмотрена сопряженность между приростом клеточной массы трансформированных *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT, составом питательных сред и жизнеспособностью штаммов-продуцентов на основе источника углерода и устойчивости к зеоцину, с позиции подбора оптимальных условий для индукции белка химозина. После трансформации *P. pastoris* GS115/*his4* и получения штамма-продуцента *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT отмечена сопряженность между скоростью прироста клеточной массы и концентрациями зеоцина в среде YPD (не обогащенная глицерином и биотином) и YPD (обогащенная, биотин 0,00004 % и 1 % глицерина). Так, в частности, более динамично увеличивается плотность биомассы при культивировании на «обогащенной» среде, особенно в первые сутки, вне зависимости от концентрации зеоцина. Выявлена разнонаправленная динамика прироста клеточной массы на твердой и жидкой селективной среде. Колонии двух экспериментальных групп, выращенные на твердых селективных средах с дополнительным внесением 200 мкг/мл зеоцина, проявляли рост на третьи сутки культивирования с «обедненной» средой, и на «обогащенной» среде на третьи сутки роста не отмечено. Определена тенденция показателей оптической плотности клеточной массы, выращенной на жидкой селективной среде - после вторых суток на «обогащенной» среде скорость прироста биомассы постепенно снижается, а на «обедненной» среде наоборот, отмечается медленный прирост с увеличением интенсивности после вторых суток. Наращивание клеточной плотности штамма-продуцента *P. pastoris* GS115/*his4* целесообразнее проводить с предварительным внесением 0,5 % метанола в качестве источника углерода и активации метаболического пути MUT (methanol utilization), фермента AOX, так как в целом штамм GS115/*his4* относится к фенотипу Mut^+, который характеризуется высоким темпом роста и более высокой производительностью, следовательно, существует необходимость дополнительного внесения метанола. Таким образом полученные данные позволят в практической деятельности оптимизировать получение высокопродуктивного штамма-продуцента *P. pastoris* для дальнейшего высокого выхода рекомбинантного белка

Ключевые слова: генетическая конструкция, рекомбинантный химозин, *Camelus dromedarius*, дрожжи *Pichia pastoris*, вектор, плазмида, зеоцин, метанол, *E. coli*

Для цитирования: Экспрессионная система *Pichia pastoris* рекомбинантного химозина *Camelus dromedarius* с подбором оптимальных условий индукции белка / Е. И. Антонова, А. Б. Ачилов, Н. В. Фирсова [и др.] // Сыроделие и маслоделие. 2024. № 4. С. 101–110. https://doi.org/10.21603/2073-4018-2024-4-10

*Работа написана в рамках выполнения государственного задания «Разработка способа очистки ферментов, как продукта генетически сконструированной экспрессионной системы». Дополнительное соглашение №073-03-2024-060/1 от 13.02.2024 к Соглашению о предоставлении субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнения работ) № 073-03-2024-060 от 18.01.2024, заключенным между ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И. Н. Ульянова» и Министерством просвещения Российской Федерации. Регистрационный номер 124102300757-8.

Введение

Ферменты находят широкое применение в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства. Для реализации экономически эффективного производства ферментов необходимы продуценты с высокой секреторной способностью. Для увеличения их продуктивности обычно применяют подход, основанный на использовании методов генетической инженерии, которые позволяют быстро и эффективно модифицировать исходные высокоактивные штаммы-продуценты с целью получения целевых ферментов или ферментных комплексов [1]. Манипуляции с ДНК клетки-хозяина или внесение в ДНК реципиента экзогенного генетического материала дают возможность целенаправленно изменять как сами штаммы-продуценты, так и свойства белков. В последние десятилетия был создан ряд дрожжевых экспрессионных систем «хозяин-вектор» с высоким уровнем секреторной активности, что позволяет проводить биосинтез целевых ферментов или целых ферментных систем. Одним из самых ранних биотехнологических применений ферментов является производство сыра [2, 3].

Pichia pastoris (также известная как *Komagataella phaffi*) – эукариотическая экспрессионная система, представляет собой метилотрофные дрожжи, подходящие в качестве организма-хозяина для гетерологичной экспрессии белков, целевой белок секретируется в культуральную жидкость продуцента и, после активации, демонстрирует высокую ферментативную активность [4–10]. Метилотрофные дрожжи, такие как *P. pastoris*, имеют несколько преимуществ перед другими дрожжевыми системами для экспрессии [11]. Одним из важных преимуществ является наличие строго регулируемого и высокопродуктивного промотора гена алкогольоксидазы I (AOX1), способность достигать высокой плотности клеток (> 100 г/л сухой массы клеток) в культурах и относительно низкий уровень эндогенного белка, который секретируется в среду, быстрый рост при высокой плотности клеток с использованием минимальной среды в сочетании с легкостью ферментации [12]. Генерация высокого выхода рекомбинантного белка является основной целью при экспрессии чужеродного гена в любой системе экспрессии. В метилотрофных дрожжах *P. pastoris* распространенным средством достижения этой цели является отбор трансформантов, на основе устойчивости к зеоцину и источнику углерода – метанолу, глицерину [1, 13–15].

Цель работы – разработка экспрессионной кассеты химозина *Camelus dromedarius* в системе эксперсии *P. pastoris* и достижение оптимального баланса между составом питательных сред и жизнеспособностью штаммов-продуцентов, в связи с тем, что генерация высокого выхода рекомбинантного белка является основной целью при экспрессии чужеродного гена посредством отбора трансформантов, на основе источника углерода и устойчивости к зеоцину.

Объекты и методы исследования

Для стандартных генно-инженерных работ (конструирование плазмиды, наработка плазмидной ДНК) использовали штамм *XL1-Blue E. coli* (Invitrogen, США). Культуру растили при 37 °C в среде LB (состав, г/л: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5) при необходимости, добавляли ампициллин (Sigma, США) в концентрации 100 мкг/мл. Для конструирования экспрессионной кассеты использовали вектор pPICZ(alpha)B с промотором AOXI (Invitrogen, США). Ген был синтезирован компанией ООО «Евроген» (Россия). Коммерческий штамм GS115/his4 *P. Pastoris* (Invitrogen, США) служил в качестве штамма-продуцента.

Клонирование синтезированной последовательности в вектор pPICZ(alpha)B. Синтез гена proCYM_camel_pp_IDT проводили с использованием метода циклической сборки из олигонуклеотидов (PCA, polymerase cycling assembly). Сначала были синтезированы олигонуклеотиды, комплементарные обоим цепям гена, перекрывающиеся участками в 20–30 пар оснований. Далее с помощью ДНК-лигазы T4 и ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher, США) были достроены цепи с заполнением промежутков между олигонуклеотидами. На последнем этапе сконструированный ген амплифицировался путем стандартной ПЦР с использованием праймеров proCYM_camel_F1, GAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCTTC; proCYM_camel_R1, GATTAGTGATGGTGATGGTGATGGATA. Сборку финальной конструкции проводили по методу Гибсона. Для линеаризации вектора pPICZ(alpha)B использовали эндонуклеазы рестрикции XhoI и XbaI (Сибэнзим, Россия). Далее вектор и ПЦР-продукт помещали в реакционную смесь, содержащую T5-экзонуклеазу, Phusion-полимеразу и Taq-лигазу (Thermo Fisher, США), для проведения изотермической реакции. Амплификацию проводили при следующих условиях: 20 с при 98 °C, 15 с при 53 °C, 60 с при 72°C в присутствии Pfu-полимеразы (Сибэнзим, Россия). Фрагмент ДНК с геном химо-

зина лигировали с вектором pPICZ(alpha)B в рамку с сигнальным пептидом MFα. Точность конструкции подтвердили секвенированием ДНК.

Очистку плазмид для секвенирования проводили путем осаждения центрифугированием (MPW-55, Med.Instruments, Польша) ночной культуры *E. coli* (штамм *XL1-Blue*), отбрасывали супернатант, осадок ресуспендировали в 250 мкл ресуспендирующего буфера (1× PBS с добавлением РНКазы А, 0,5 мг/мл), добавляли 250 мкл лизирующего буфера (1%SDS, 0,2M NaOH), перемешивали. Далее вносили 350 мкл нейтрализующего буфера (3 М ацетат калия), перемешивали до образования творожистой хлопьевидной взвеси, центрифугировали, добавляли к супернатанту 700 мкл изопропанола, перемешивали на вортексе. Затем центрифугировали, удаляли супернатант, добавляли 1,0 мл 80 % этанола, импульсно откручивали пробирку на вортексе MICROSPIN FV-2400 (BioSan, Латвия) для удаления остатков спирта. К осадку добавляли 50–70 мкл 5 мМ Tris-HCl, pH 8.0, инкубировали 5–10 мин при 40–45 °С, перемешивали на вортексе. До проведения реакции Сенгера количественную оценку плазмдной ДНК (не менее 50 нг/мкл) проводили на агарозном гель-электрофорезе. Секвенирование плазмид и ПЦР-фрагментов выполняется на генетическом анализаторе 3500xL Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), амплификацию проводили на термоциклере CFX96 в режиме «реального времени» (BioRad, США).

Источник изображения: freepik.com

Таким образом ген прохимозина был клонирован в вектор pPICZ(alpha)B в сайтах Eco XhoI/XbaI, в результате чего была получена челночная плазмида pPICZ(alpha) B-proCYM_camel_pp_IDT. Кодируемый белок прохимозина несет N-концевой сигнальный пептид α-фактора для секреции в культуре дрожжей.

Для наработки плазмидной ДНК использовали штамм *E. coli XL1-Blue* (Евроген, Россия). Культуру растили при 37 °С в среде LB (состав, г/л: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5) при необходимости, добавляли ампициллин (Sigma, США) в концентрации 100 мкг/мл.

Трансформацию проводили методом теплового шока (химическая трансформация). Для этого колонию штамма *E. coli XL1-Blue* с чашки переносили в 2 мл жидкой среды LB и инкубировали в течение ночи при 37 °С, 200 об/мин. 200 мкл ночной культуры переносили в 10 мл жидкой среды LB, выращивали до OD-590 = 0.6–0.8 при 37 °С, 200 об/мин, 1,5–2 часа. Затем переносили 1,5 мл бульона с культурой в стерильную пробирку типа Эппендорф и осаждали центрифугированием при 3 тыс. об/мин в течение 10 минут, надосадочную жидкость удаляли. Клетки ресуспендировали в 200 мкл холодного стерильного раствора 0,1 М $CaCl_2$ и помещали в лед при температуре +4 °С на 2 часа. Далее к 200 мкл полученных таким образом компетентных клеток добавляли 0,5 мкл раствора плазмиды (примерно 100 нг) и выдерживали на льду 15 минут. Затем помещали в твердотельный термостат при 42 °С на 5 минут, затем переносили в лед на 10 мин. Добавляли 800 мкл жидкой LB комнатной температуры и инкубировали 1 ч при 37 °С, 200 об/мин. Затем рассевали содержимое пробирки на чашку Петри с плотной средой LB (1,5 % агар-агара) с добавлением 25 мкг/мл зеоцина, инкубировали сутки при 37 °С. Выросшие на среде с зеоцином колонии проверяли на результативность трансформации *E. coli XL1-Blue* и *P. pastoris* по встраиванию плазмиды методом ПЦР с колоний с праймерами на прохимозин:

- proCYM_camel_F1, GAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCTTC;
- proCYM_camel_R1, GATTAGTGATGGTGATGGTGATGGATA;
- proCYM_camel_F2, TGCGTTCTATGCCCACTGTT;
- proCYM_camel_FR, GCTTTGGCCAAGCCTACTCT.

Клоны, содержащие плазмиды, помещали в музей и использовали для наработки 50 мкг плазмидной ДНК с целью дальнейшей трансформации *P. pastoris*. Для этого клоны *E. coli* культивировали в термошейкере (LabTech, Италия) 24 ч, 37 °С, 200 об/мин. В 200 мл жидкой LB в колбе Эрленмейера (объемом 1 литр).

Выделение плазмидной ДНК из бактериальной массы *E. coli* проводили с помощью набора Plasmid Miniprep 2.0 (Евроген, Россия), согласно протоколу.

Наработка культуры *P. pastoris*. Коммерческий штамм GS115/*his4 P. pastoris* (Invitrogen, США) культивировали в термошейкере (LabTech, Италия) 48 ч, 30 °C, 200 об/мин. в колбе Эрленмейера (объемом 2 литра) на жидкой питательной среде YPD (состав, г/л: пептон – 20; дрожжевой экстракт – 15; глюкоза – 20) объемом 200 мл.

Для достижение оптимального баланса между составом питательных сред и жизнеспособностью штаммов-продуцентов *P. pastoris* моделировали две экспериментальные группы:
- первая группа – наработка культуры *P. pastoris* в «обедненной» питательной среде YPD (без дополнительного внесения биотина и глицерина), в присутствии 0,5 % метанола;
- вторая группа – наработка культуры *P. pastoris* в «обогащенной» питательной среде YPD (дополнительное внесения 0,00004 % биотина и 1 % глицерина) в присутствии 0,5 % метанола.

0,5 мл первичной культуры переносили в 25 мл YPD (1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона, 0,5 % метанола) и культивировали при 30 °C и 200 об/мин. Метанол добавляли к культуре каждые 24 часа. Через 3 дня культивирования культуру центрифугировали при 1800*g* в течение 10 минут Microfuge 22R (Beckman-Coulter, США). Предполагается, что содержание метанола в питательной среде существенно повлияет на плотность дрожжевой культуры. Метанол быстро потребляется растущими клетками в качестве источника углерода.

Среда YPD содержит пептон и дрожжевой экстракт в качестве источника азота, а в качестве источника углерода – глицерин. Биотин является витамином, который используется в богатой питательной среде для увеличения скорости роста и выхода биомассы, но другие комплексные источники витаминов, такие как дрожжевой экстракт также существенно влияют на плотность дрожжевой культуры [5].

Трансформация клеток *P. pastoris* и получение штамма-продуцента. Процедуру трансформации GS115/*his4 P. pastoris* методом электропорации проводили согласно руководству EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen, Россия). Выделенную из *E. coli* плазмиду pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT в количестве 50 мкг линеаризовали эндонуклеазой SacI (Thermo Fisher, США) в буфере O (Thermo Fisher, США). Линеаризованный вектор очищали экстракцией фенолом/хлороформом с последующим осаждением этанолом. *P. pastoris* (штамм GS115) электропорировали линеаризованным вектором согласно протолу – к 80 мкл клеток добавляли 10 мкг очищенной линеаризованной плазмидной ДНК, а затем суспензию пульсировали в кювете для электропорации с зазором 0,2 см при 2 кВ в течение 4,8 мс с помощью электропоратора (MicroPulser™, Bio-Rad, США). Полученные суспензии в количестве 200 мкл переносили на чашки с плотной селективной средой (YPD: 1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона, 2 % декстрозы, 1,5 % агара) и с зеоцином (50, 100 и 200 мкг/мл) в качестве антибиотика для отбора трансформированных клеток.

Полученные устойчивые к зеоцину колонии *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT инокулировали в 2 мл жидкой среды YPD, а также пересевали на чашки Петри с плотной селективной средой (YPD: 1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона, 2 % декстрозы, 1,5 % агара) с различным содержанием зеоцина – 50, 100 и 200 мкг/мл. Культивировали в течение 3 суток при 30 °C и 200 об/мин. На каждый срок культивирования измеряли оптическую плотность клеточной массы, на третьи сутки клоны, положительные на вставку pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT, консервировали с помощью глицерина при температуре –80 °C и использовали в качестве штамма-продуцента для пополнения музея штаммов. Наличие гена подтверждали методом ПЦР с образцами ДНК, выделенными из колоний или суспензии клеток, на термоциклере CFX96 в режиме «реального времени» (BioRad, США). Отобранные с использованием ПЦР колонии клеток культивировали в течении 24 ч. на шейкер-инкубаторе LSI-3016A (Daihan Labtech, Ю. Корея) в среде YPD, при 30 °C с 200 об/мин. Инокулят в соотношении 1/100 переносили в колбу Эрленмейера, содержащую среду YPD и культивировали в шейкер-инкубаторе в течение 48 ч. при 30 °C с 200 об/мин. По завершении культивирования клеточную биомассу осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 5000 g и 4 °C.

Для наработки клеточную массу переносили на среду BMGH 0,1 M фосфат калия, pH 6,2, 1,34 % YNB (стерилизована фильтрованием через 0,22 мкм фильтр), 4×10^{-5} % биотина (стерилизован фильтрованием через 0,22 мкм фильтр),

0,004 % гистидина (стерилизован фильтрованием через 0,22 мкм фильтр) и 0,5 % глицерина. Клетки собирали центрифугированием и переносили на среду BMMH 0,1 M фосфат калия, pH 6,2, 1,34 % YNB (стерилизована фильтрованием через 0,22 мкм фильтр), 4 × 10^{-5} % биотина (стерилизован фильтрованием через 0,22 мкм фильтр), 0,004 % гистидина (стерилизован фильтрованием через 0,22 мкм фильтр и 0,5 % метанола) для запуска индукции химозина.

Видовую принадлежность полученных колоний клеток проводили с использованием программно-аппаратного комплекса MALDI-TOF времяпролетной масс-спектрометрии серии FLEX (MALDI-TOF MS) с применением панели MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, Германия). Концентрацию плазмидной ДНК (нг/мкл), оптическую плотность (ОП, McF) клеточной массы определяли на спектрофотометре Micro Spectrophotometer Nano-500 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., Китай) при длине волны 260–280 nm. Серии экспериментов проводили в пяти повторностях.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программного обеспечения Prism 8.0.1 (Graphpad, USA). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Оценка достоверности различий независимых выборок проведена с использованием Т-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение

Нуклеотидная последовательность гена прохимозина Camelus dromedaries (NP_001290503.1) была получена из базы данных NCBI BLAST, ген состоит из 9 экзонов и 8 интронов и кодирует белок, который состоит из 381 аминокислотного остатка.

Конструкция челночной плазмиды включала в себя (рис. 1) ген прохимозина proCYM_camel_pp_IDT (1183-2334 п.н.); 2-940 п.н промотор *Pichia pastoris* AOX1; 941-1184 п.н. MF-alfa 1 (Альфа фактор); 941-2326 п.н. proCYM_camel_pp_IDT; 2306-2323 п.н. 6x His affinty tag; 2328-2332 п.н. MCS (multiple cloning site); 2331-2360 п.н. Myc (human c-Myc oncogen); 2376-2393 п.н. 6x His affinty tag; 2473-2719 п.н. terminator; 2759-3145 п.н. TEF1 promoter; 3153-3200 п.н. EM7 promoter (synthetic bacterial promoter); 3219-3593 п.н. antibiotic binding protein (BleoR); 3659-3906 п.н. CYC1 terminator; 3981-4569 п.н. rep-origin LEFT; CTCGAG – сайт рестриктазы XhoI; сиквенс, кодирующий EKRE для расщепления Kex2; скивенс, кодирующий EAEA для расщепления Ste13+; TAA – стоп-кодон; TCTAGAaa - сайт рестриктазы XbaI; 6HIS – CATCACCATCACCATCAC, промотор в векторе AOXI. Линеаризированный вектор pPICZ(alpha) с использованием эндонуклеазы рестрикции XhoI и XbaI представлен на рисунке 2.

Для наработки плазмидной ДНК в системе *E. coli* штамм *XL1-Blue* культивировали в среде LB (dd H2O – 200 мл, бульон LB по Miller) (Диаэм, Рос-

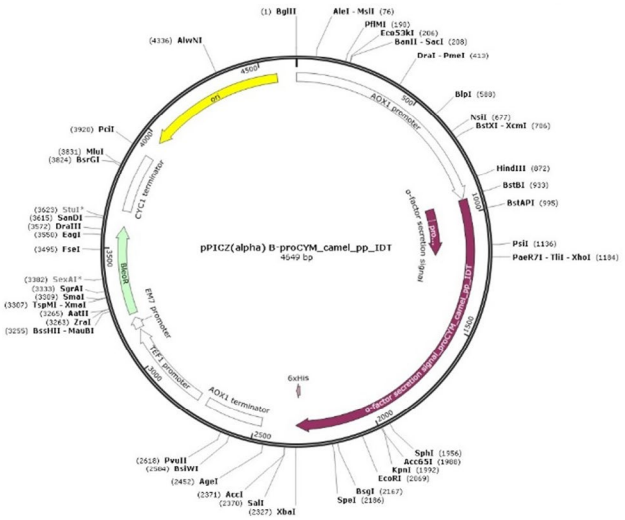

Рисунок 1. Челночная экспрессионная плазмида pPICZ(alpha) B-proCYM_camel_pp_IDT

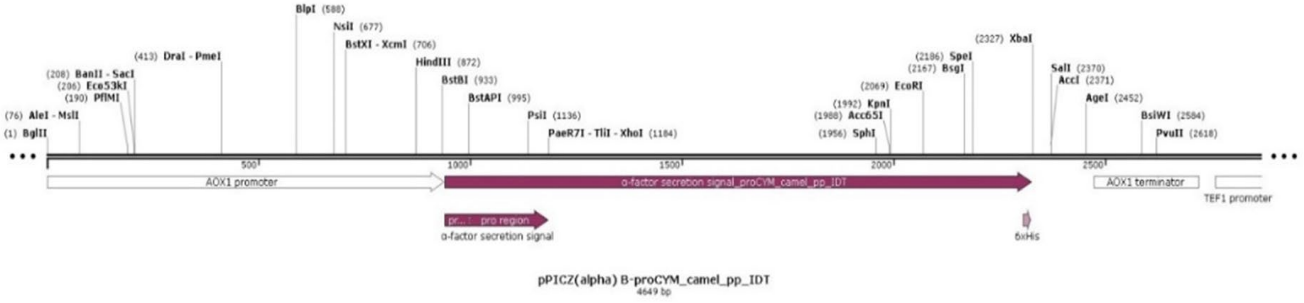

Рисунок 2. Линеаризация вектора pPICZ(alpha)

сия), при 37 °С в течении трех суток. По достижении необходимого количества клеточной массы с ОП 3,51 ± 0,25 McF, часть клеток использовали для создания музейного штамма, другая часть трансформировалась методом теплового шока, согласно протоколу.

Через 24 часа культивирования *E. coli* в объеме 500 мкл при 37 °С оценивали рост колоний. При посеве клеток с pPicz(alpha)B-proCYM_camel_pp на среду с зеоцином (25 нг/мкл) отмечался рост колоний (рис. 3а). ОП за 24 часа культивирования увеличилась на 14 % (рис. 3г). На твердой среде без зеоцина клетки с pPicz(alpha)B-proCYM_camel_pp сформировали колонии (рис. 3в) и ОП через 24 часа культивирования увеличилась также на 14 % (рис. 3г). В качестве отрицательного контроля провели посев *E. coli* без плазмиды на среду с зеоцином, рост колиний не наблюдали (рис. 3б) и значение ОП соответствует ОП культуральной среды (рис. 3г). Таким образом, трансформированные *E. coli* плазмидой pPicz(alpha)B-proCYM_camel_pp_ IDT проявляли антибиотикорезистентность к зеоцину.

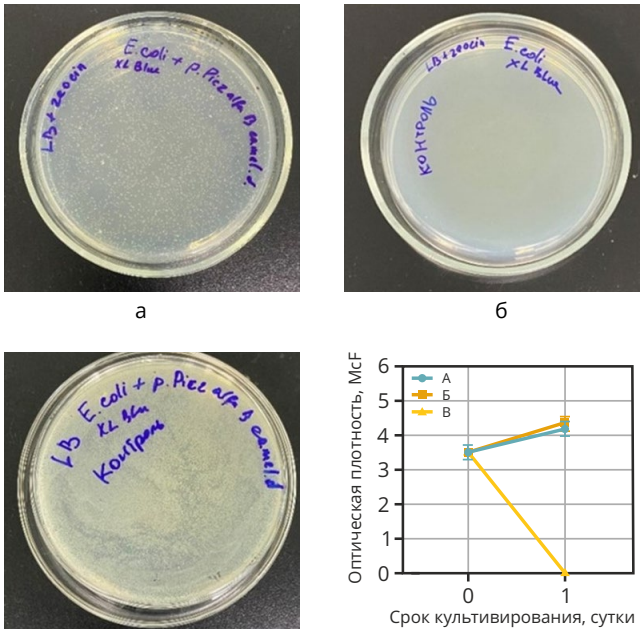

Рисунок 3. *E. coli* с плазмидой pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT: а) колонии на среде с зеоцином; б) отсутствие колоний *E. coli* без плазмиды на среде с зеоцином; в) колонии на среде без зеоцина; г) показатели оптической плотности на жидкой среде в день посева и через 24 часа (1 сутки)

Эффективность трансформации *E. coli XL1-Blue* плазмидой pPicz(alpha)B-proCYM_camel_pp_ IDT подтверждали методом Real-time ПЦР с колоний с использованием праймеров на прохимозин (рис. 4) в качестве интеркалирующего красителя использовали SYBR Green. Амплификацию проводили при следующих условиях: 5 мин при 95 °С, 10 мин при 95 °С, 15 с при 64 °С, 15 с при 72 °С, 5 мин при 72 °С. Праймеры, используемые в работе – proCYM_camel_dd For1+ proCYM_camel_dd Rev1 и proCYM_camel_dd For2+ proCYM_camel_dd Rev2. Реактивы – 5X ScreenMix-HS: в 1× реакционной смеси концетрация магния – 3 мМ, dNTP – 0,12 мМ.

Выделение плазмидной ДНК из бактериальной массы *E. coli* проводили с помощью набора Plasmid Miniprep 2.0 (Евроген, Россия), согласно протоколу. Клоны, содержащие pPicz(alpha)B-proCYM_camel_pp_ IDT, помещали в музей, а также для наработки плазмидной ДНК с целью дальнейшей линеаризации и трансформации *P. pastoris*. Линеаризацию 50 мкг плазмидной ДНК проводили эндонуклеазой рестрикции SacI (Fermentas) по протоколу производителя.

Наработка культуры *P. pastoris*. Коммерческий штамм GS115/*his4 P. pastoris* (чистая линия, которая служила контролем) культивировали в двух пробирках в объеме 10 мл жидкой питательной среды YPD (dd H2O – 200 мл, бульон LB по Miller) (Диаэм, Россия) – 40г/л, дрожжевой экстракт тип Б – 1 г, пептон (Диаэм, Россия) – 2 г. В первой пробирке к питательной среде добавляли 0,5 % метанола, во второй клетки росли без метанола. Обе серии эксперимента культивировали в термошейкере (LabTech, Италия) 30 °С, 200 об/мин. С дополнительным внесе-

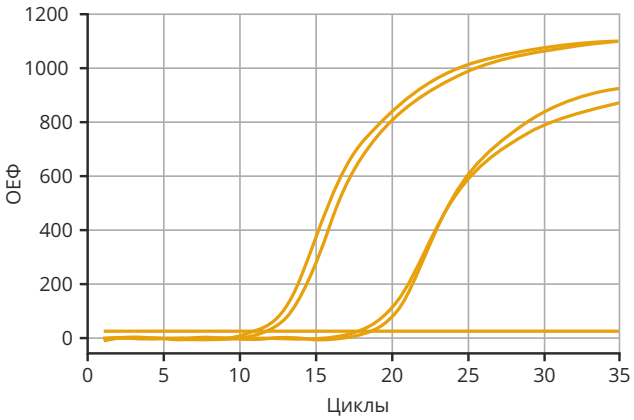

Рисунок 4. Real-time ПЦР детекции эффективности трансформации *E. coli* штамм XL1-Blue плазмидой pPicz(alpha)B-proCYM_camel_pp_IDT

нием в первую группу через 24 часа 0,5 % метанола в течении 4 суток (рис. 5). Отмечено, что показатель ОП культур, которые росли на среде без добавления метанола, за первые сутки культивирования увеличился в 6 раз, ко вторым суткам – на 13 %, к третьим – на 40 %, к четвертым – на 6 %.

Показатель ОП культуры клеток, которые росли на среде с добавлением метанола за первые сутки культивирования увеличился в 14 раз, ко вторым суткам – на 33 %, к третьим – на 18 %, к четвертым – на 6 %. Наблюдается динамика постепенного выхода на плато в обеих группах после третьих суток культивирования. Дисперсионный анализ выявил достоверно значимое влияние метанола как фактора на вариабельность показателя ОП ($F = 27{,}98$, $p < 0{,}0001$).

Известно, что выделяют три фенотипа *P. pastoris* в отношении утилизации метанола: Mut^+ (утилизация метанола), где оба гена AOX1 и AOX2 интактны и активны; $Мут^S$ (медленная утилизация метанола, где ген AOX1 отключен); Mut^- (не способен расти на метаноле как единственном источнике углерода вследствие нокаута обоих генов AOX). У штаммов $Мут^+$ и штаммов MutS транскрипция генов пути MUT (methanol utilization) репрессируется при выращивании в присутствии высокой концентрации глицерина. Ферментом первого этапа утилизации метанола является фермент алкогольоксидаза (AOX, КФ 1.1.3.13) [1]. В целом штаммы Mut^+ характеризуются более высоким темпом роста и более высокой производительностью. Более того, сильная продукция гена AOX1, соответственно и промотора (pAOX1-метанол-индуцируемый) в штаммах Mut^+

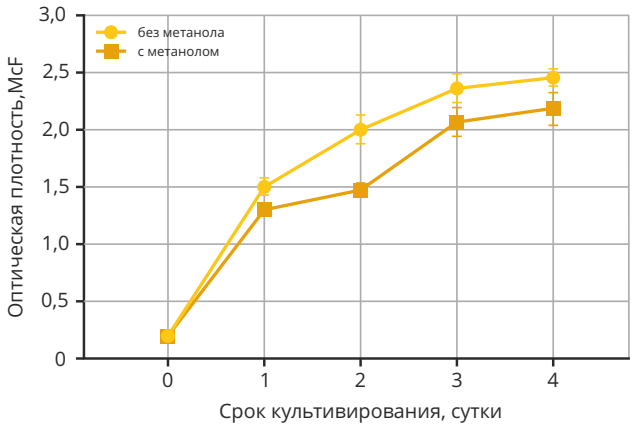

Рисунок 5. Показатели ОП клеточной массы *P. pastoris* с 0 по 4 сутки культивирования с внесением 0,5 % метанола и без дополнительного введения метанола

во время роста на метаноле может конкурировать с дальнейшей продукцией рекомбинантных белков. Однако штаммы Mut^+ очень чувствительны к временным изменениям высоких концентраций метанола, что усложняет биопроцессы. В связи с этим нами добавлялся 0,5 % метанола в одну из экспериментальных групп каждые 24 часа. Окисление метанола связано с образованием перекиси водорода как побочного продукта, который индуцирует окислительный стресс и гибель клеток, приводит к образованию тепла, что может представлять собой проблему в случае промышленного использования *P. pastoris*. Экспрессия промотор AOX1 (pAOX1) составляет до 30 % от общего растворимого белка в клетках *P. pastoris*, выращенных исключительно на метаноле [1, 2]. Присутствие метанола в концентрации 0,5 % (не более 5 %, так как более высокие концентрации токсичны для *P. pastoris*) не подавляет экспрессию генов AOX, индуцирует экспрессию в условиях не ограничивающих рост, в равной мере как и глицерин, который к тому же используется в качестве источника углерода в условиях ограниченной оксигенации [16].

Штамм *P. pastoris* GS115/*his4*, который мы используем в работе, признан как Mut+ – фенотип утилизации метанола [1], а клеточная линия с дополнительным внесением метанола показала более высокие значения плотности культуры, которые используют метанол в качестве источника углерода.

Трансформация клеток *P. pastoris* и получение штамма-продуцента. Процедуру трансформации GS115/*his4* *P. pastoris* двух экспериментальных групп методом электропорации проводили согласно руководству EasySelect Pichia Expression (Invitrogen, Россия). Выделенную из *E. coli* плазмиду pPICZ(alpha) B/proCYM_camel_pp_IDT в количестве 50 мкг линеаризовали эндонуклеазой SacI (Thermo Fisher, США) в буфере O (Thermo Fisher, США). Линеаризованный вектор очищали экстракцией фенолом/хлороформом с последующим осаждением этанолом. *P. pastoris* (штамм GS115) электропорировали линеаризованным вектором согласно протолу и детектировали эффективность трансформации методом Real-time ПЦР с колоний (рис. 6).

Далее *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT колонии инокулировали по 200 мкл суспензии клеток в чашки Петри со средами, содержащими зеоцин (500–2000 мкг/мл): первая среда YPD (не обогащенная глицерином и биотином) и вторая YPD (обогащенная, биотин 0,00004 % и 1 % глицерина).

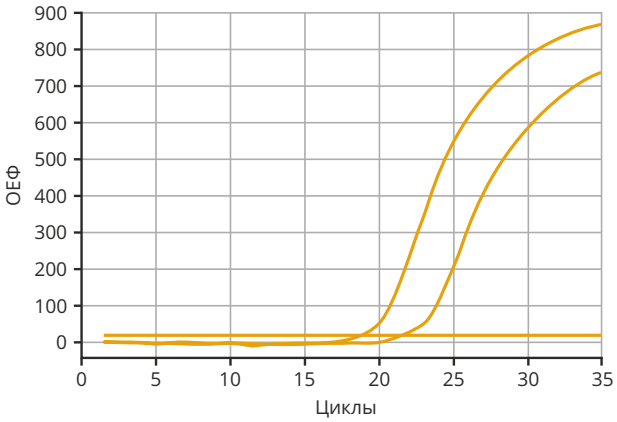

Рисунок 6. Real-time ПЦР детекции эффективности трансформации *P. pastoris* (штамм GS115) плазмидой pPicz(alpha)B-proCYM_camel_pp_IDT.

Колонии, выращенные в двух экспериментальных группах, были отобраны и подвергнуты скринингу на плотной и жидкой селективной среде (YPD: 1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона, 2 % декстрозы, 1,5 % агара) с зеоцином в трех концентрациях 50, 100 и 200 мкг/мл, в качестве антибиотика для отбора трансформированных клеток под контролем промотора pAOX1. Культивировали в течении трех суток (рис. 7). На каждый срок культивирования измеряли ОП клеточной массы (рис. 7), на третьи сутки клоны, положительные на вставку плазмиды pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT, консервировали с помощью глицерина при температуре –80 °C и использовали в качестве штамма-продуцента для пополнения музея штаммов.

Отмечено, что при внесении зеоцина в концентрации 50 мкг/мл ОП клеточной массы в «обедненной» среде через 24 после посева (первые сутки) увеличивается в 4,3 раза, на «обогащенной» среде – в 11,5 раз. Разница показателя ОП между двумя группами составляет 0,8788 ± 0,0408 McF ($p < 0{,}0001$). На вторые сутки культивирования ОП клеточной массы в «обедненной» среде увеличивается в 2 раза, на «обогащенной» среде – в 1,2 раза. Разница показателя ОП составляет 0,8002 ± 0,05980 McF ($p = 0{,}003$). На третьи сутки культивирования ОП клеточной массы в «обедненной» среде увеличивается в 2 раза, на «обогащенной» среде – в 1,1 раз. Статистически значимой разницы показателя ОП на третьи сутки культивирования не выявлено.

При дополнительном внесении зеоцина в концентрации 100 мкг/мл ОП клеточной массы в «обедненной» среде через 24 после посева увеличивается в 2,8 раза, на «обогащенной» среде – в 9,7 раз.

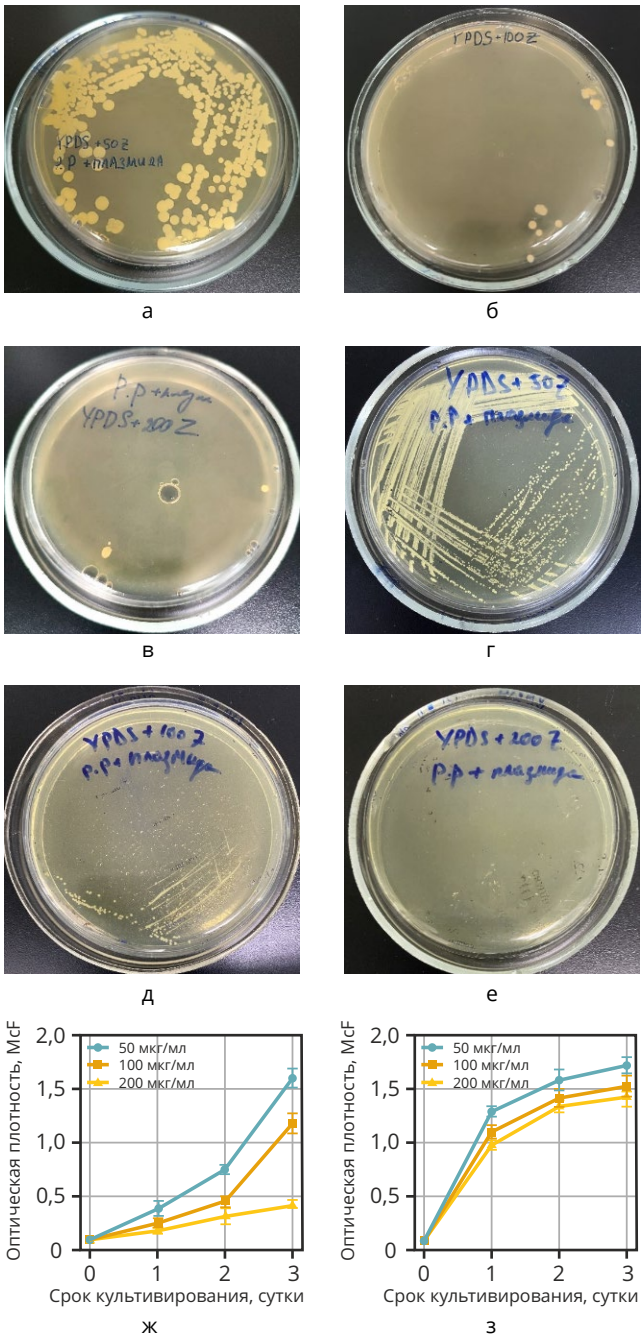

Рисунок 7. Рост трансформированных колоний *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT с разной концентрацией зеоцина. «Обедненная» среда:
а) колонии на среде с концентрацией зеоцина 50 мкг/мл;
б) колонии на среде с концентрацией зеоцина 100 мкг/мл;
в) колонии на среде с концентрацией зеоцина 200 мкг/мл.
«Обогащенная» среда:
г) колонии на среде с концентрацией зеоцина 50 мкг/мл;
д) колонии на среде с концентрацией зеоцина 100 мкг/мл;
е) колонии на среде с концентрацией зеоцина 200 мкг/мл.
Оптическая плотность клеточной массы двух экспериментальных групп:
ж) в «обедненной» среде; з) в «обогащенной» среде

Разница показателя ОП клеточной массы составляет 0,8147 ± 0,03965 McF (p = 0,0022). На вторые сутки культивирования ОП клеточной массы в «обедненной» среде увеличивается в 1,7 раз, на «обогащенной» среде – в 1,3 раза. Разница показателя ОП клеточной массы составляет 0,9341 ± 0,05944 McF (p = 0,0012). На третьи сутки культивирования ОП клеточной массы в «обедненной» среде увеличивается в 2,6 раз, на «обогащенной» среде – в 1,1 раз. ОП клеточной массы к третьим суткам культивирования на «обогащенной» среде больше, чем на «обедненной» на 0,3131 ± 0,07660 McF (p = 0,02).

При дополнительном внесении зеоцина в концентрации 200 мкг/мл ОП клеточной массы в «обедненной» среде через 24 часа культивирования увеличивается в 2,2 раз, на «обогащенной» среде – в 8,8 раз. Разница показателя ОП клеточной массы составляет 0,7705±0,0090 (p < 0,0001). На вторые сутки культивирования ОП клеточной массы в «обедненной» среде увеличивается в 1,7 раз, на «обогащенной» среде – в 1,4 раза. Разница показателя ОП клеточной массы составляет 0,9997±0,05345 McF (p < 0,0001). ОП клеточной массы на «обогащенной» среде больше, чем на «обедненной» на 0,9737 ± 0,05704 McF (= 0,002).

Таким образом, трансформированные *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT более динамично наращивают плотность биомассы при культивировании на «обогащенной» среде, особенно в первые сутки после посева, вне зависимости от концентрации зеоцина. В то же время необходимо отметить, что нами выявлена разнонаправленная динамика прироста клеточной массы на твердой и жидкой селективной среде. Так, в частности, при культивировании на твердой селективной среде с разной концентрацией зеоцина хорошо видна разница в количестве колоний – чем больше концентрация зеоцина, тем меньше колоний. Тогда как в жидкой селективной среде такой закономерности не выявлено.

Колонии двух экспериментальных групп, выращенные на твердых селективных средах с дополнительным внесением 200 мкг/мл зеоцина, проявляли рост на третьи сутки культивирования с «обедненной» средой. На «обогащенной» среде роста не отмечено.

Также отмечена тенденция показателей ОП клеточной массы, выращенной на жидкой селективной среде – после вторых суток на «обогащенной» среде скорость прироста биомассы постепенно снижается, а на «обедненной» среде наоборот, отмечается медленный прирост с увеличением интенсивности после вторых суток.

Выводы

Таким образом, нами успешно разработана челночная экспрессионная плазмида pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT, которая включала в себя вектор pPICZ(alpha)B с промотором AOXI, геном прохимозина *Camelus dromedarius*. Для наработки плазмидной ДНК использовали *E. coli* штамм *XL1-Blue* с отбором трансформированных колоний относительно антибиотикорезистентности к зеоцину.

Наращивание клеточной массы штамма-продуцента *P. pastoris* GS115/*his4* целесообразнее проводить с предварительным внесением 0,5 % метанола в качестве источника углерода и активации метаболического пути MUT (methanol utilization), фермента алкогольоксидаза (AOX, КФ 1.1.3.13). Так как в целом штамм GS115/*his4* относится к фенотипу Mut^+, который характеризуется высоким темпом роста и более высокой производительностью, следовательно, существует необходимость дополнительного внесения метанола.

Отмечено, что с позиции анализа экспрессионной кассеты химозина в системе экспрессии *P. pastoris* для достижения оптимального баланса между составом питательных сред и жизнеспособностью штаммов-продуцентов на основе источника углерода и устойчивости к зеоцину, после трансформации *P. pastoris* GS115/*his4* и получения штамма-продуцента P. pastoris/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT отмечена сопряженность между скоростью прироста клеточной массы и концентрациями зеоцина в среде YPD (не обогащенная глицерином и биотином) и YPD (обогащенная, биотин 0,00004 % и 1 % глицерина). Так, в частности, более динамично наращивают плотность биомассы при культивировании на «обогащенной» среде, особенно в первые сутки после посева, вне зависимости от концентрации зеоцина. Выявлена разнонаправленная динамика прироста клеточной массы на твердой и жидкой селективной среде. Колонии двух экспериментальных групп выращенные на твердых селективных средах с дополнительным внесением 200 мкг/мл зеоцина проявляли рост на третьи сутки культивирования с «обедненной» сре-

дой и на «обогащенной» среде на 3 сутки роста не отмечено. Также отмечена тенденция показателей ОП клеточной массы, выращенной на жидкой селективной среде – после вторых суток на «обогащенной» среде скорость прироста биомассы постепенно снижается, а на «обедненной» среде наоборот, отмечается медленный прирост с увеличением интенсивности после вторых суток. ■

Pichia pastoris Expression System of Recombinant Chymosin of *Camelus dromedarius*: Selecting Optimal Conditions for Protein Induction

Elena I. Antonova, Natalia V. Firsova, Natalia A. Lengesova, Denis A. Victorov, Atabeg B. Achilov, Pavel S. Torutanov
Ulyanov State Pedagogical University, Ulyanovsk

The paper introduces optimal conditions for chymosin protein induction. The research featured the correlation between the cell mass gain of transformed *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT and the composition of nutrient media with different carbon sources and zeocin resistance producer strains. *P. pastoris* GS115/*his4* was transformed to obtain *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT as a strain producer. The cell mass growth rate correlated with the zeocin concentrations in the YPD nutrient medium without glycerol and biotin and the YPD nutrient medium fortified with 0.0000% biotin and 1% glycerol. The biomass density increased faster when cultured on the fortified medium, regardless of zeocin concentration, especially during cultivation day 1. The cell mass growth on solid and liquid selective media was multidirectional. The two experimental samples on solid selective media with 200 μg/ml zeocin started growing on cultivation day 3 if the YPD medium was not fortified. The samples on fortified medium, on the contrary, showed no growth on day 3. The optical density of the cell mass grown on liquid selective medium demonstrated a particular pattern: the rate of biomass growth in the fortified medium samples decreased gradually whereas the unfortified medium samples demonstrated signs of growth, which intensified on cultivation day 2. To increase the cell density of *P. pastoris* strain GS115/*his4*, a preliminary application of 0.5 % methanol is recommended as a carbon source to activate the MUT metabolic pathway, i.e., methanol utilization. Adding the alternative oxidase enzyme is also recommended since strain GS115/his4 belongs to the MUT^{+} phenotype with a high growth rate and productivity, hence the need for additional methanol. The obtained data may help to optimize the commercial yield of *P. pastoris* as a producer of recombinant protein.

Keywords: genetic construct, recombinant chymosin, *Camelus dromedarius*, yeast *Pichia. pastoris*, vector, plasmid, zeocin, methanol, *E. coli*

Список литературы

1. **Malik, A.** A review on *Pichia pastoris*: A successful tool for expression of recombinant proteins / A. Malik [et al.] // The Pharma Innovation Journal. 2021. Vol. 10. № 11. P. 550–556.

2. **Akishev, Z.** Obtaining of recombinant camel chymosin and testing its milk-clotting activity on cow's, goat's, ewes', camel's and mare's milk / Z. Akishev [et al.] // Biology. 2022. Vol. 11. № 11. 1545. https://doi.org/10.3390/biology11111545

3. **Антонова, Е. И.** Генетические конструкции как источник получения рекомбинантного химозина / Е. И. Антонова, А. Н. Аббязова, Н. В. Фирсова [и др.] // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии : Сборник материалов VII Всероссийской научно-практической конференции. Чебоксары: ИД «Среда», 2024. С. 49–55. https://doi.org/10.31483/r-112097; https://www.elibrary.ru/bboeyl

4. **Obst, U.** A modular toolkit for generating Pichia pastoris secretion libraries / U. Obst, T. K. Lu, V. Sieber // ACS Synthetic Biology. 2017. Vol. 6. № 6. P. 1016–1025. https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00337

5. **Akishev, Z.** Constitutive expression of Camelus bactrianus prochymosin B in *Pichia pastoris* / Z. Akishev [et al.] // Heliyon. 2021. Vol. 7. № 5. e07137. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07137

6. **Wang, N.** Expression and characterization of camel chymosin in Pichia pastoris / N. Wang, [et al.] // Protein Expression and Purification. 2015. Vol. 111. P. 75–81. https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.03.012

7. **Мурашкин, Д. Е.** Анализ некоторых биохимических свойств рекомбинантного химозина сибирской косули (*Capreolus pygargus*), полученного в культуре клеток млекопитающих (CHO-K1) / Д. Е. Мурашкин, С. В. Беленькая, А. А. Бондарь [и др.] // Биохимия. 2023. Т. 88. №. 9. С. 1556–1569. https://doi.org/10.31857/S0320972523090087; https://www.elibrary.ru/wwnnwk

8. **Беленькая, С. В.** Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis* / С. В. Беленькая, В. В. Ельчанинов, Д. Н. Щербаков // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 5. С. 20–27. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-20-27; https://www.elibrary.ru/qzyxec

9. **Patra, P.** Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts / P. Patra [et al.] // Biotechnology Advances. 2021. № 47. 107695. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107695

10. **Küberl, A.** High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435 / A. Küberl [et al.] // Journal of Biotechnology. 2011. Vol. 154. № 4. P. 312–320. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.04.014

11. **Cereghino, G. P.** Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris / G. P. Cereghino [et al.] // Current Opinion in Biotechnology. 2002. № 13. P. 329–332. https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00330-0

12. **Inan, M.** Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris* / M. Inan, M. M. Meagher // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2001. Vol. 92. № 6. P. 585–589. https://doi.org/10.1263/jbb.92.585

13. **Sunga, A. J.** Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris* / A. J. Sunga, I. Tolstorukov, J. M. Cregg // FEMS Yeast Research. 2008. Vol. 8. № 6. P. 870–876. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00410.x

14. **Saitua, F.** Dynamic genome-scale metabolic modeling of the yeast *Pichia pastoris* / F. Saitua [et al.] // BMC systems biology. 2017. Vol. 11. 27. https://doi.org/10.1186/s12918-017-0408-2

15. **Jungo, C.** Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures / C. Jungo, I. Marison, U. Von Stockar // Journal of Biotechnology. 2007. Vol. 128. № 4. P. 824–837. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.12.024

16. **de Lima, P. B.** Novel homologous lactate transporter improves l-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris* / P. B. A. de Lima [et al.] // Microbial Cell Factories. 2016. № 15. 158. https://doi.org/10.1186/s12934-016-0557-9