

Разработка эффективной системы экспрессии бациллярной протеазы в дрожжах *Pichia pastoris*.

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

Пудова Дарья Сергеевна

Студент (магистр)

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия

E-mail: DashulyaBaranova@mail.ru

Протеазы представляют собой гидролитические ферменты, которые широко используются в медицине, фармацевтике, биотехнологии и пищевой промышленности. Бактерии *Bacillus pumilus* эффективно секретируют субтилизиноподобную сериновую протеиназу в культуральную жидкость. Несмотря на стабильную секрецию, активности нативного фермента недостаточно для использования его в промышленных масштабах. Поэтому разработка высокоэффективных систем экспрессии является актуальной проблемой для медицины и сельского хозяйства. В данной работе с целью получения рекомбинантных ферментных препаратов бактериальной протеиназы разрабатывается система экспрессии этого гена в дрожжах *Pichia pastoris* на основе двух челночных векторов pPink-НС и pPink-LC. Вектора несут индуцируемый промотор гена *AOX1* и ген *ADE2*, который служит селективным маркером при отборе трансформантов. Кодон-оптимизированный ген субтилизиноподобной протеазы (*aprBp*) штамма *B. pumilus* 7P лигировали с векторами pPink-НС и pPink-LC. Для оптимизации секреции фермента использовали четыре разных сигнальных пептида: α -амилазы *Aspergillus niger*, инулиназы *Kluyveromyces marxianus*, лизоцима *Gallus gallus* и α -фактора скрещивания *Saccharomyces cerevisiae*. Полученные конструкции клонировали в клетки *Escherichia coli* DH5 α , целостность вставки проверяли секвенированием. Для получения системы экспрессии рекомбинантные челночные вектора трансформировали путем электропорации в клетки PichiaPink с последующим отбором трансформантов на селективной среде PAD без аденина. Эффективность трансформации в среднем составила 73 трансформанта/мкг плазмидной ДНК. Белые колонии тестировали на присутствие последовательности гена протеазы с помощью ПЦР. В результате получены рекомбинантные штаммы PichiaPink, несущие синтетический белок протеазы *B. pumilus*, под влиянием четырех сигнальных пептидов. Исследуются условия индукции рекомбинантного белка для эффективной экспрессии бактериального гена. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФИ № 16-16-04062.