

Гетерологичная экспрессия бациллярной протеиназы рекомбинантными дрожжами *Pichia pastoris*

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

Васильева Юлия Александровна

Студент (бакалавр)

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

E-mail: vasileva891@mail.ru

Биологически активные добавки на основе ферментов протеиназ активно применяются в кормлении сельскохозяйственных животных и птиц. На сегодняшний день в нашей стране используется ограниченное количество коммерческих препаратов протеиназ, поэтому поиск новых перспективных ферментов-кандидатов является важной задачей микробной биотехнологии. Субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus pumilus* 7P обладает активностью по отношению ко многим субстратам и стабильна в широких диапазонах рН и температуры. Благодаря своим свойствам данная протеиназа является потенциальным кандидатом для использования её в роли кормовой добавки в птицеводстве. Однако высокий уровень спорообразования у бацилл, а так же конкурентная секреция других внеклеточных белков во время ферментации могут препятствовать высокому выходу внеклеточного целевого белка. Данную проблему можно преодолеть, используя экспрессионную систему на основе дрожжей *Pichia pastoris*. Широкое внимание к данной платформе обусловлено такими факторами, как безопасный статус дрожжей, высокий выход гетерологичного белка в процессе производства, а так же низкая стоимость условий культивирования.

Целью данного исследования являлось получение стабильной экспрессии оптимизированного гена протеиназы в эукариотических клетках дрожжей. В работе использовали сигнальные пептиды лизоцима *Gallus gallus*, киллер-белка и α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* и интегративные вектора рPINK-НС/рPINK-ЛС. Клонирование конструкций проводили в клетках *E. coli* ДН5а, целостность вставки подтверждали секвенированием. Для получения эффективной экспрессии белка, в клетки *P. pastoris* трансформировали дрожжевой вектор с интегрированным геном бациллярной протеиназы. Эффективность трансформации для конструкций с вектором рPINK-ЛС составила в среднем 118 трансформантов/мкг плазмидной ДНК, а для конструкций с рPINK-НС - 83 трансформанта/мкг плазмидной ДНК. С помощью ПЦР подтвердили наличие интегрированного в геном дрожжей гена бактериальной протеиназы. Внеклеточное накопление рекомбинантного фермента проверяли с помощью белкового электрофореза и измерения протеолитической активности по гидролизу специфического субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Максимальная активность наблюдалась у трансформантов с низкокопийным рPINK-ЛС вектором под контролем сигнального пептида киллер-белка - 6 Ед/мл и высококопийного рPINK-НС вектора с сигнальным пептидом альфа-фактора - 4.3 Ед/мл. Таким образом, гидролиз специфического субстрата подтверждает специфичность рекомбинантной субтилизиноподобной протеиназы.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РНФ № 16-16-04062.