

## Способ стабилизации генно-инженерных конструкций в промышленно значимых видах микроорганизмов на примере *Pichia pastoris*

Научный руководитель – Колб Вячеслав Адамович

Бугаев-Макаровский Н.А.<sup>1</sup>, Шецер В.О.<sup>2</sup>, Кулаева Е.Д.<sup>3</sup>, Рогачева А.В.<sup>4</sup>

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биотехнологический факультет, Москва, Россия, *E-mail: SantNickolas@yandex.ru*; 2 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра физиологии человека и животных, Казань, Россия, *E-mail: shetserv@gmail.com*; 3 - Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия, *E-mail: ked05685@gmail.com*; 4 - Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Кафедра генетики, Ростов-на-Дону, Россия, *E-mail: anapostana@gmail.com*

В силу особенностей метаболизма и культивирования дрожжи являются удобным объектом в биотехнологии, в частности, как продуценты рекомбинантных белков. Широко используется вид метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, т. к. этот вид отличается высокими темпами роста на простых средах, эффективностью продукции рекомбинантных белков на экспорт, в качестве системы экспрессии имеет преимущества по сравнению с бактериальными системами (например, *E. coli*). В дрожжевых клетках проводятся необходимые посттрансляционные модификации рекомбинантных эукариотических белков в отличие от бактериальных клеток [4], но уровень экспрессии целевых продуктов генетически модифицированными штаммами *P. pastoris* значительно снижается с течением времени [1]. Это связано с генетической изменчивостью дрожжей и нестабильностью искусственных систем экспрессии в геноме *P. pastoris* [6].

Нами предложен способ долговременной стабилизации генетических конструкций в клетках дрожжей *P. pastoris* и поддержания высокого уровня их экспрессии. Были выбраны плазмидные векторы, т. к. эти конструкции обладают ёмкостью от 2 до 40 тысяч п. о., удобством внедрения, высокой эффективностью, отсутствием побочных продуктов, а также в связи с их широким применением в науке и биотехнологии [2].

Нами предложена модель создания штамма *P. pastoris* с нокаутированием гена *ura3* в геноме и внедрения в неё искусственно созданной плазмиды для наработки целевого продукта. Ген *ura3* кодирует оротодин-5'-фосфатдекарбоксилазу, катализирующую одну из реакций синтеза пиримидинов, т. е. является геном «домашнего хозяйства».

Предлагается модифицировать вектор pPIC9 (“Invitrogen”, США), несущий ген *his4* дрожжей *P. pastoris*, который обеспечивает селекцию трансформантов по восстановлению прототрофности по гистидину. Фрагмент, содержащий последовательность гена *his4*, в составе pPIC9 замещается на последовательность гена *ppura3*. Штаммы, несущие делецию в гене *ppura3*, отбирают по способности к росту на среде с 5-фтороротовой кислотой и урацилом. Отбираются клоны с ауксотрофностью по урацилу. После внедрения плазмиды проводится негативная селекция штаммов.

### Источники и литература

- 1) Музаев Д.М. и др. Новые штаммы дрожжей *Pichia pastoris*-продуценты гетерологичных белков //Ecological genetics. – 2015. – Т.13, №.1.
- 2) Тюрин О.В. Разработка системы экспрессии генов на основе метилотрофных дрожжей *Komagataella kurtzmanii*//ФГУП “ГОСНИИГЕНЕТИКА”. - 2014, М.

