

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 315 (2016), 5 – 15

**CONSTRUCTION OF YEAST CHROMOSOME *HO* LOCUS
ORIENTED INTEGRATIVE EXPRESSION VECTOR****S. M. Taipakova, I. T. Smekenov, A. K. Kuanbay, A. C. Buribaeva, A. K. Bissenbaev***

Institute of Biology and Biotechnology Problems,
al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: Sabira.Taipakova@kaznu.kz; Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Kew words: *HO* locus, genomic integration, cellobiohydrolase, secretion, *Lentinula edodes*; *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract. By means of gene engineering methods the *pHO-GAPDH- α -cel7A-myc-6His-KanMX4-HO* integral cassette, including cellobiohydrolase *cel7A* gene of *L.edodes* with yeast α -factor signal peptide, *Myc*- and *His*-tags was assembled. New stable yeast strains carrying *cel7A* gene in genome were developed. Chromosomal integration of *cel7A* gene into *HO* locus of yeast genome was confirmed by PCR. The strain shows continuous expression of *cel7A* and secretion of the protein product into surrounding medium. Presence of *Myc*-tag in the protein allows to monitor the gene expression by western blot with *Myc*-specific antibodies. Moreover, the *His* sequence on C-end of protein can be used for purification by affinity chromatography.

УДК 577.216.3, 577.218

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО
ЭКСПРЕССИОННОГО ВЕКТОРА,
НАПРАВЛЕННОГО НА *HO* ЛОКУС ХРОМОСОМЫ ДРОЖЖЕЙ****С. М. Тайпакова, И. Т. Смекенов, А. К. Куанбай, А. С. Бурибаева, А. К. Бисенбаев***

ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии»
КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: *HO* локус; геномная интеграция; секреция, целлюбиогидролаза; *Lentinula edodes*; *Saccharomyces cerevisiae*.

Аннотация. С помощью генно-инженерных методов сконструирован *pHO-GAPDH- α -cel7A-myc-6His-KanMX4-HO* интегральная конструкция, включающий ген целлюбиогидролазы *cel7A* гриба *L. edodes* с сигнальным пептидом α -фактора дрожжей, *Myc*-эпитопом и гистидиновым хвостом. Созданы новые стабильные штаммы дрожжей с геном целлюбиогидролазы *cel7A* гриба *L. edodes* в хромосоме. Хромосомная интеграция гена целлюбиогидролазы *cel7A* гриба *L. edodes* в *HO* локус генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР. Данный штамм обеспечивает непрерывную экспрессию гена целлюбиогидролазы *cel7A* и секрецию продукта этого гена в окружающую среду. Наличие в составе гена *Myc*-эпитопа позволяет следить за экспрессией гена с помощью иммуноблоттинга с специфическими антителами к *Myc*-эпитопу. Кроме этого, присутствие на С-конце продукта гена последовательности *6xHis*-хвоста позволяет аффинной очистке белкового продукта на основе никель-основанной хроматографии.

В последние годы усилия в области генной инженерии, связанные с созданием дрожжей, в частности, *S.cerevisiae* способных сбраживать целлюлозу, сосредоточились на клонировании генов, кодирующих целлюлаз. Некоторые авторы с использованием эписомальной плазмиды YEp сконструировали рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae* для ферментации целлюлозы [1–5].

Известно, что трансформированные YEr многокопийными автономными векторными ДНК клетки дрожжей содержат до 40 копий плазмид на клетку. Непрерывная экспрессия большого количества чужеродных генов в *S.cerevisiae*, может приводить к истощению энергетических ресурсов и нарушению метаболизма клетки. Кроме этого, данный тип плазмид обычно трудно стабильно поддерживать в клетках и, как правило, с относительно высокой частотой утрачиваются клетками, особенно при отсутствии селективного давления по маркерам плазмид. С практической точки зрения для стабильности белка, а также для предотвращения потери рекомбинантного гена в отсутствие селективного фактора более подходящим является использование интегральных векторов – обеспечивающих внедрение генов в хромосому дрожжей [6]. В связи с этим δ -интеграционные векторы были использованы для стабильного повышения числа копий гена-мишени в *S.cerevisiae*. Длинные концевые повторы Tu-элемента, известные как δ -последовательность, являются хорошими мишенями для интеграции генов путем гомологичной рекомбинации, так как по всему геному дрожжей содержится приблизительно 425 копий данной последовательности [7]. Векторы для δ -интеграции были использованы для экспрессии человеческого фактора роста [8], антикоагулянта-гирудин [9], глюкоамилазы [10]. Относительно недавно были сконструированы рекомбинантные штаммы *S.cerevisiae*, содержащие множество копий генов эндоглюконазы, целлюбиогидролазы и β -глюкозидазы, интегрированные в хромосому посредством интегрального вектора на основе δ -последовательности [7,11]. Данный подход значительно увеличил целлюлолитическую активность рекомбинантного штамма. Однако все вышеперечисленные интеграционные векторы содержат ауксотрофные маркерные гены, такие как *LEU2-D*, *HIS3*, *TRP1* и *URA3*. Описанные подходы вынуждают работать с узким кругом хорошо охарактеризованных мутантных штаммов дрожжей. Такие штаммы дрожжей не пригодны для промышленного использования, поскольку в случае промышленных дрожжей не существует внутренних генетических маркеров, таких как потребность в аминокислотах или нуклеиновых кислотах и т.д.

Voth с соавторами [12] сообщили о создании нескольких интегральных дрожжевых векторов, способных включаться в хромосому дрожжей путем генного замещения с использованием участка гомологичной последовательности *HO* гена. Однако интегральные векторы, описанные в данной работе, не содержат промоторы и могут быть использованы только для интеграции генов с собственными промоторами.

HO ген кодирует эндонуклеазу, ответственного за превращение дрожжевой клетки в клетку противоположного типа спаривания и инициирует диплоидизацию гаплоидных клеток [13]. Показано что, делеция *HO* локуса не влияет на рост дрожжей и практически все лабораторные и промышленные штаммы *S. cerevisiae* имеют мутации в данном локусе [14, 15].

В настоящей работе конструирован интегральный плазмидный вектор с промотором глицероальдегид-дифосфат дегидрогеназы, сигнальным пептидом α -фактора дрожжей и гистидиновым тэгом. Показано, что конструированный плазмидный вектор обеспечивает непрерывную экспрессию гена целлюбиогидролазы *cel7A* и секрецию продукта этого гена в окружающую среду. Наличие в составе гена *Myc*-эпитопа позволяет следить за экспрессией гена с помощью иммуноблотинга с специфическими антителами к *Myc*-эпитопу.

Материалы и методы исследования

Штаммы и плазмиды. В ходе работы использовали клеточные линии: DH5 α (F⁺ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ -) для наработки плазмидной ДНК и дрожжевой экспрессионный штамм FF18733 (*MATa his7-2 leu2-3,112 lys1-1 trp1-289 ura3-52*) фирмы «Stratagene». Культивирование бактерий *E. coli* проводили при 37°C в полноценной среде LB при необходимости дополненной ампициллином в конечной концентрации 100 мкг/мл. Дрожжи выращивали при 30°C в среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза). Скрининг трансформированных дрожжевых клеток проводили в среде YPD с генетицином (G418) в конечной концентрации 100 мкг/мл.

В данной работе были использованы вектора и плазмиды представленные в таблице 1. Интегральный вектор *pHO-poly-KanMX4-HO* любезно предоставлен профессором Дэвидом Стилманом, университет Юты, США, конститутивный вектор YEPGAr – профессором Х. Кумагай, Киотский университет, Япония.

Таблица 1 – Плазмиды использованные в данной работе

Плазмиды	Особенности	Источник
pMETalphaB	Сигнальный пептид (α -фактор)	Invitrogen
pBAD/gIII A	<i>Myc</i> -эпитоп, <i>6xHis</i> *tag	Invitrogen
YEGAp	pGAPDH, tGAPDH	[16]
M4297	Интегральный вектор, KanMX4	[12]
pBAD/gIII A/ α - <i>cel7A</i>	α - <i>cel7A</i> - <i>myc</i> - <i>6xHis</i> *tag	В этой работе
YEPGAp/ α - <i>cel7A</i>	pGAPDH- α - <i>cel7A</i> - <i>myc</i> - <i>6xHis</i> *tag-tGAPDH	В этой работе
pHO-GAPDH- α - <i>cel7A</i> - <i>myc</i> - <i>6His</i> -KanMX4-HO	Экспрессионный вектор для интеграции в HO локус генома дрожжей	В этой работе

Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma», «Amresco», «Appllichem» и «Реахим». А так же в ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (Германия), «New England Biolabs» (Франция), «Fermentas» (Польша), «Promega» (США), «Roche» (США).

Выделение геномной ДНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Инокулят дрожжевых клеток в 5 мл богатой среды YEPD с антибиотиком G418 инкубировали в течение ночи при 30°C. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин и осадок клеток отмывали предворительно охлажденной стерильной dH₂O. Далее клетки ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (2% Triton X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA) добавили равный объем хлороформ-изоамилового спирта (24:1) и 300 мг стеклянных бусинок, промытых в кислоте и гомогенизировали вортексированием при максимальной скорости в течение 3-4 мин с перерывами каждые 1 мин. Далее к лизату добавляли 200 мкл TE, перемешали и центрифугировали со скоростью 12 000 об/мин при 4°C, 10 минут. Отбирали водную фазу и проводили экстракцию 2,5 объемом охлажденного изопропанола (-20 °C). Плавню перемешивали и инкубировали в морозильной камере в течение 30 минут. Препарат центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 минут. Затем супернатант сливали и осадок, содержащий НК, подсушивали под вакуумом и растворяли в 400 мкл TE с RNase для деградации РНК. Далее содержимое пробирки инкубировали 30 мин при 37 °C. После завершения времени инкубации добавили 10 мкл 4М ацетата аммония, 2,5 объема этанола и помещали на 30 мин в морозильник на -20°C. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 50 мкл dH₂O.

Полимеразная цепная реакция. Для аналитических и препаративных процедур использовали набор PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific # K0172). ПЦР-амплификацию проводили в следующем температурном режиме: денатурация - 94 °C – 1 мин, 30 циклов амплификации при 94 °C – 1 мин, 61°C – 30 сек, 72°C – 30 сек и заключительная элонгация при 72°C – 2 мин, 4°C 10 мин. Для определения эффективности интеграции методом ПЦР использовали специфические праймера (таблица 2).

Таблица 2 – Последовательность праймеров использованных для анализа эффективности интеграции рекомбинантной конструкции

Праймер	Последовательность
Pr-1	5'-GCGTTGTTACCACAACCTCTATGAG-3'
Pr-2	5'-TCTGAAAACACGACTATTCTGATGG-3'
Pr-3	5'-GGAGGCCCCAGAATACCCCTCCTTGA-3'
Pr-6	5'-GCGGCCGCCCCGGGATGAGATTTCCTTC-3'
Pr-7	5'-GCGGCCGCTTAAATTAAGGATCCTCAATGATGATGATG-3'
Pr-8	5'-CACGCTGCAGCCCAGCAAGCCGGAACA-3'
Pr-9	5'-CACGTCTAGACGCAAACATGACTGTAGT-3'

Экстракция белков и ДСН-ПААГ электрофорез. Трансформированные клетки культивировали в течение ночи в 20 мл среды YPD, содержащей G418. Затем ночную культуру инокулировали в 1000 мл свежей среды с генетицином (100 мкг/мл) и культивировали при 30°C в течение 3 суток. Клетки собирали центрифугированием в течение 7 мин при 3000 x g. Культуральную жидкость, содержащую секретируемые белки, центрифугировали повторно. Клетки ресуспендировали в 50мМ натрий-фосфатном буфере и лизировали соникированием в течение 20 секунд при мощности 14мА, до получения прозрачного лизата. Клеточный лизат центрифугировали при 14 000 x g в течение 30 мин для удаления клеточных остатков. Супернатант и культуральную жидкость использовали в качестве источника рекомбинантного белка. Содержание белка в образцах определяли по методу Бредфорда [17], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

Разделение белков по молекулярной массе проводили в 12% в денатурирующих условиях с 0,1 % ДСН (додecilсульфат натрия) по методу Laemmli [18]. Гель окрашивали в растворе Кумасси синего R-250.

Результаты и их обсуждение

Для создания интегрального вектора с промотором глицероальдегид-дифосфат дегидрогеназы, сигнальным пептидом α -фактора дрожжей и гистидиновым тэгом нами были использованы несколько плазмидных векторов в качестве источников промотора, сигнального пептида, *Muc*-эпитопа и *bxHis*-тэга (таблица 1).

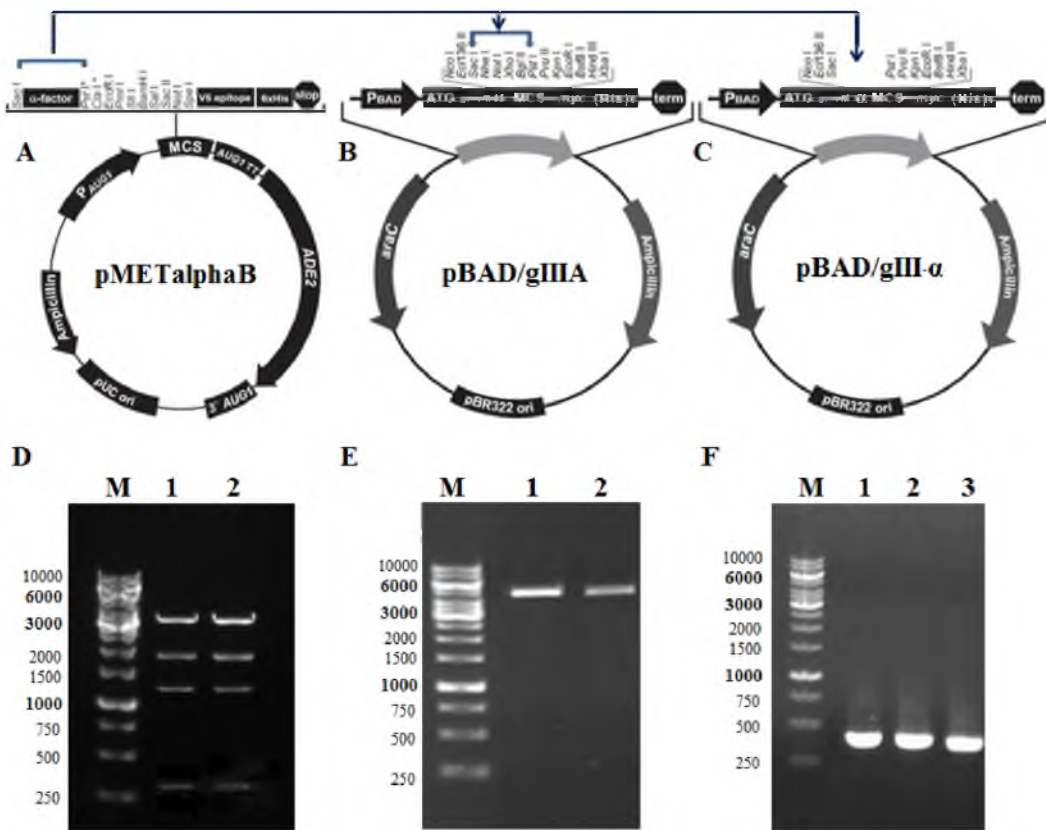
Известно, что для создания векторов секреции активно используют лидерную последовательность α -фактора. Этот феромон состоит из 13 аминокислот и первоначально синтезируется структурного гена *MFal* как часть белка-предшественника размером 165 аминокислот. Данный белок на N-конце содержит сигнальный пептид из 19 аминокислот, который расщепляется при секреции препробелка в эндоплазматическом ретикулуме. За сигнальным пептидом следует пропоследовательность длиной 64 аминокислот, имеющая три участка гликозилирования. Точная функция пропоследовательности не выяснена. Предполагают, что она может усиливать секрецию белка в окружающую среду [19, 20]. Поэтому для эффективной секреции клонируемого гена (*cel7A*) мы использовали последовательность нуклеотидов, кодирующий сигнальный пептид из 19 аминокислот и пропоследовательность длиной 64 аминокислот. В общей сложности нами использованный последовательность кодирующий сигнальный пептид α -фактора дрожжей состояла из 267 п.н. Последовательность, состоящая из шести кодонов аминокислоты гистидина, нами использована для последующей очистки продукта клонируемого гена на основе никель – основанной аффинной хроматографии.

Известно, молекулы ДНК, кодирующие эпитопы, которые распознаются известными антителами, могут быть «привязаны» к известным генам. В результате белковый продукт такого гена будет содержать соответствующий эпитоп, что позволяет следить за этим белком в условиях эксперимента с помощью коммерчески доступных антител к данному эпитопу. Так как продукту нами клонируемого гена нет доступных антител, мы решили использовать *Muc*-эпитоп. *Muc*-эпитоп состоит из 11 аминокислот и имеются коммерчески доступные специфические антитела.

Создание интегрального экспрессионного вектора с сигнальным пептидом α -фактора дрожжей, *Muc*-эпитопом и гистидиновым хвостом (*bxHis*) проводили в несколько этапов:

Конструировали вектор pBAD, содержащий сигнальный пептид для секреции α -фактора дрожжей (рисунок 1С). В качестве источника сигнального пептида α -фактора дрожжей использовали дрожжевой вектор pMETalphaВ (таблица 1, рисунок 1А). Для этого наработанную плазмидный вектор pMETalphaВ обрабатывали ферментами *SacI* и *PstI* (рисунок 1 А и D), полученный фрагмент длиной 267 нуклеотидов лигировали в вектор pBAD/gIIIА, обработанной по тем же сайтам рестрикции (рисунок 1В и E). Продукты лигирования трансформировали в клетки *E.coli* штамма DH5 для наработки плазмиды. Скрининг трансформантов проводили в агаризованной среде LB с ампициллином.

Для анализа плазмид, выделенных с трансформированных клеток, на наличие вставок провели рестрикционный и ПЦР анализ. В результате были отобраны 5 клонов, содержащие рекомбинантную

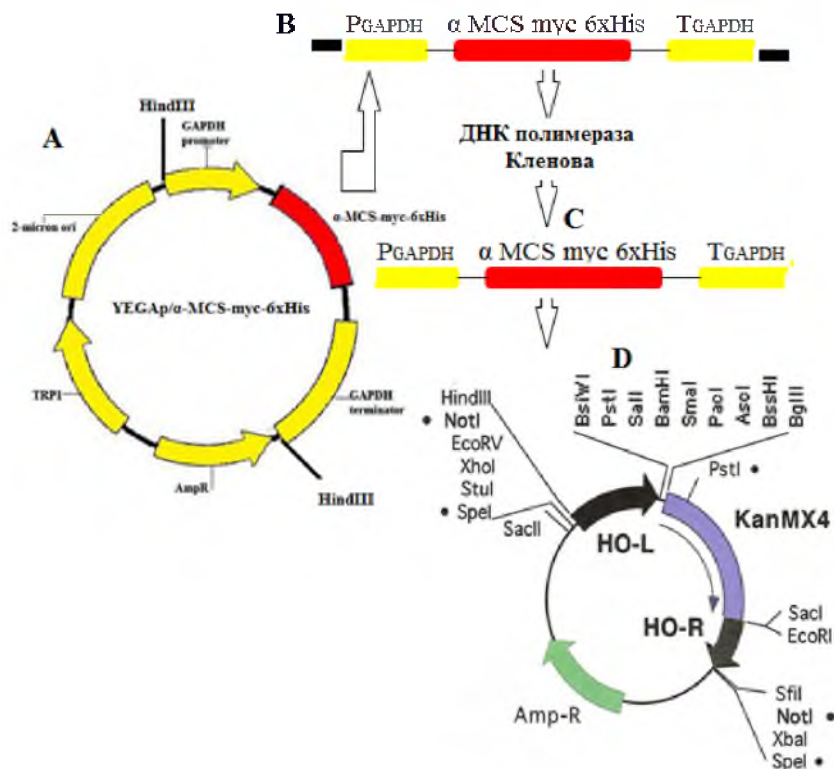


А – карта вектора pMETalphaB. В – карта вектора pBAD/gIII A. С – карта вектора pBAD/gIII- α -MCS-*myc-6xHis*. D – рестрикция pMETalpha B по *SacI/PstI*. М – ДНК маркер; 1, 2 – продукты рестрикции плазмиды. E – рестрикция pBADgIII A по *SacI/PstI*. М – ДНК маркер; 1, 2 – продукты рестрикции плазмиды. F – продукт амплификации α -MCS-*myc-6xHis* кассеты на матрице pBADgIII A/ α -MCS-*myc-6xHis*; М – ДНК маркер; 1–3 – продукты PCR.

Рисунок 1 – Конструирование рекомбинантной плазмиды pBAD/gIII- α -*myc-6xHis*

плазмиду pBAD/gIII- α -MCS-*myc-6xHis* (рисунок 1C). Далее полученную рекомбинантную плазмиду pBAD/gIII- α -MCS-*myc-6xHis* амплифицировали с помощью следующих праймеров: смысловой праймер 5'-Dir- GCGGCCGCCCCGGGATGAGATTTCCTTC и антисмысловый праймер 5'-Rev- GCGGCCGCTTAATGAAGGATCCTCAATGATGATGATG. В результате получили фрагмент длиной 404 нуклеотидов (рисунок 1F), состоящий из нуклеотидных последовательностей сигнального пептида, *Myc*-эпитопа и *6xHis* (α -MCS-*myc-6xHis*). Продукты ПЦР обработали с помощью *SmaI* и *NotI* для клонирования в вектор YEGAp/*eng1*. В результате фрагмент содержал в одном - тупой (*SmaI*), а в другом липкий конец характерный для *NotI*. Перед клонированием α -MCS-*myc-6xHis*, YEGAp/*eng1* обработали ферментом *EcoRI*. Затем 3' – концы наращивали с помощью фрагмента Кленова. После инактивации фрагмента Кленова проводили обработку ферментом *NotI*, что обеспечило соответствие концов плазмидного вектора к концам α -MCS-*myc-6xHis* фрагмента. Затем клонируемый фрагмент лигировали с YEGAp и получили YEGAp/ α -MCS-*myc-6xHis* конъюнкцию.

В следующем этапе мы приступили к созданию интегрального экспрессионного вектора на основе M4297 платформы. Схема создания интегрального вектора представлена на рисунке 2. Для этого по отдельности платформу M4297 (рисунок 2D, с геном устойчивости к канамицину) и YEGAp/ α -MCS-*myc-6xHis* (рисунок 2A) резали по сайтам рестрикции фермента *HindIII* (рисунок 2B). Затем обработали фрагментом Кленова для получения тупых концов (рисунок 2C). В результате полученный фрагмент длиной около 2700 п.н. лигировали с M4297. В результате была получена плазмиды pHO-GAPDH- α -*myc-6xHis*-KanMX4-*HO* экспрессионный вектор с промотором глицеральдегид-дифосфат дегидрогеназы, сигнальным пептидом α -фактора дрожжей и гисти-диновым тэгом.



А – YEGAp/α-MCS-myc-6xHis вектор, В – участок YEGAp/α-MCS-myc-6xHis вектора содержащий α-MCS-myc-6xHis с липкими концами, С – α-MCS-myc-6xHis с тупыми концами, D – M4297 платформа.

Рисунок 2 – pHO-GAPDH-α-myc-6xHis-KanMX4-HO

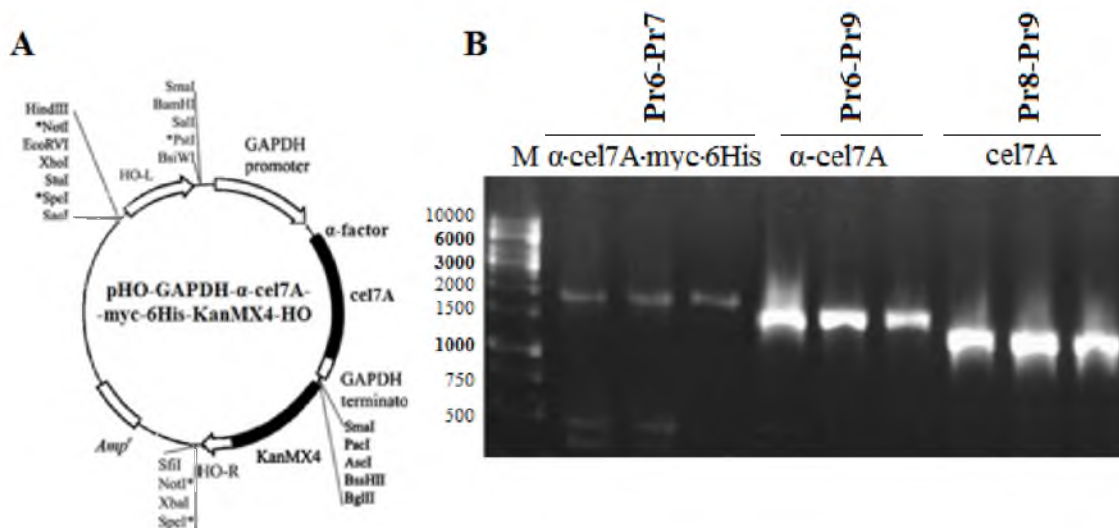
Ранее нами был выделен кДНК ген целлюбиогидролазы *cel7A* гриба *L. edodes* [21]. *CEL7A* – белок длиной 516 аминокислот с молекулярной массой 53,5кДа. По данным компьютерного анализа этот фермент должен секретироваться из клеток гриба, поскольку имеет на N-конце сигнальный пептид, который должен отщепляться между аминокислотами Gly18 и Gln19. Однако наши предыдущие эксперименты показали, что сигнальный пептид *CEL7A* не распознается секреторной системой *S. cerevisiae* [22]. В связи с этим мы решили для эффективной секреции использовать сигнальный пептид дрожжевого полового феромона – α-фактора дрожжей, которая способствует эффективной секреции рекомбинантного белка в окружающую среду [20].

В связи с этим для клонирования гена *cel7A* в созданную нами pHO-GAPDH-α-myc-6xHis-KanMX4-HO конструкцию необходимо с гена этого фермента удалить нативный сигнальный пептид для секреции (20 аминокислот) и стартовый кодон. Поэтому мы учли эти особенности при разработке праймеров для ПЦР амплификации гена *cel7A* *L. edodes*. Амплификацию целлюбиогидролазы *cel7A* на матрице полученной нами ранее плазмиды pET11d/*cel7A* проводили с использованием смыслового праймера 5'-*cel7A*-PstI-cacgCTGCAGCCCAGCAAGCCGGAACA с сайтом рестрикции *PstI* и антисмыслового праймера 5'-*cel7A*-XbaI-cacgTCTAGACGCAAACATTTGACTGTAGT с сайтом рестрикции *XbaI*.

Далее ПЦР продукт размером около 1500 п.н. был обработан ферментами рестрикции *PstI* и *XbaI*. Фрагменты ДНК полученные в результате рестрикции, были разделены электрофорезом в 1% агарозном геле. Фрагмент размером в 1494 п.н. соответствующий длине кДНК гена целлюбиогидролазы *cel7A* без нативного сигнального пептида, был выделен из геля и использована для клонирования в плазмиду pHO-GAPDH-α-myc-6xHis-KanMX4-HO, обработанную по тем же сайтам рестрикции. Продукты лигирования трансформировали в клетки *E. coli* штамма DH5 для наработки плазмиды.

Скрининг трансформантов проводили в агаризованной среде LB с ампициллином. В результате были отобраны 7 клонов, содержащие рекомбинантную плазмиду pHO-GAPDH-α-*cel7A*-myc-6xHis-

KanMX4-*HO*. Схема конструированной нами экспрессионного интегрального вектора с геном *cel7A*, включающий сигнальный пептид феромона – α -фактора дрожжей, *Мус*-эпитоп и *6xHis* хвост представлена на рисунке 3А. Далее для анализа плазмид выделенных с трансформированных клеток на наличие вставок провели ПЦР анализ (рисунок 3В). При этом для определения правильной ориентации гена *cel7A* по отношению к промотору, сигнальному пептиду и к *мус-6xHis* последовательностям нами разработан набор праймеров (таблица 2, Pr6 - Pr9) для ПЦР анализа.



А – карта pHO-GAPDH- α -*cel7A*-myc-6His-KanMX4-*HO*. В – ПЦР продукты, полученные на матрице рекомбинантной плазмиды с применением праймеров Pr1-Pr4.

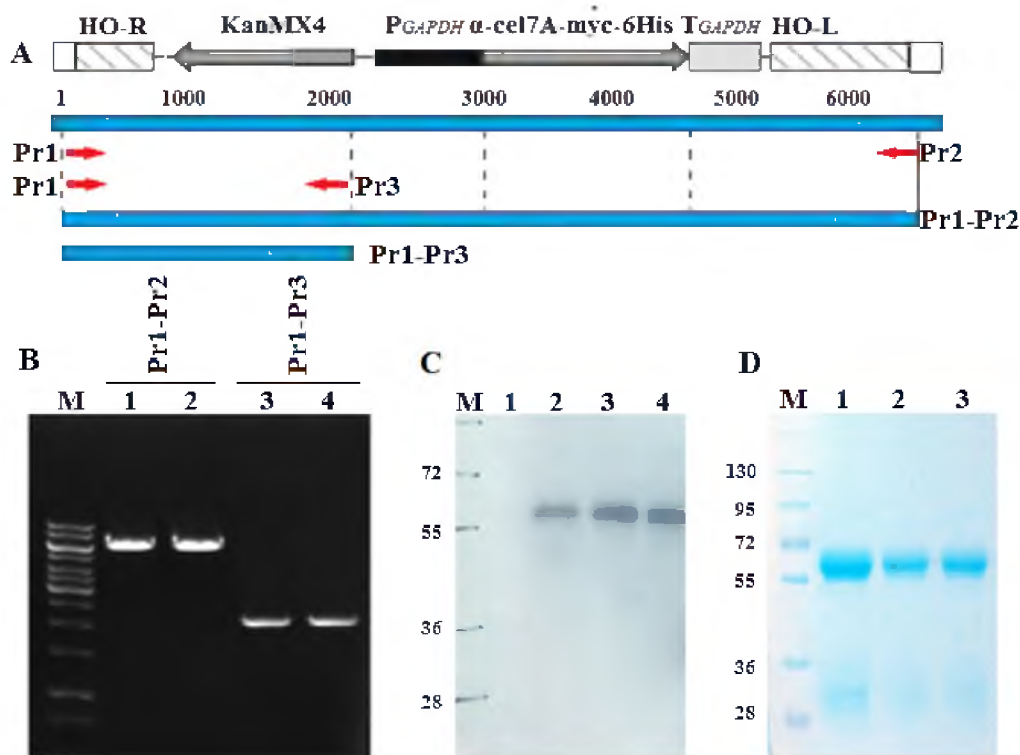
Рисунок 3 – Анализ рекомбинантной pHO-GAPDH- α -*cel7A*-myc-6His-KanMX4-*HO* на наличие вставки

В результате ПЦР с праймерами Pr6 (комплементарна к 3'-концу последовательности сигнального пептида) и Pr7 (комплементарна к 3'-концу кассеты с 6xHis хвостом), как ожидалось, амплифицирован фрагмент ДНК размером около 1900 п.н (рисунок 3В). При использовании праймеров Pr6 и Pr9 (Pr 9 – ген специфический антисмысловый праймер *cel7A*) обнаружился только один фрагмент длиной 1800 п.н (рисунок 3В). Наличие гена целлюбиогидролазы *cel7A* гриба *L. edodes* в интегрированной кассете проверяли применением ген-специфических праймеров Pr8 – Pr9 (рисунок 3В). Результаты этих экспериментов подтверждают правильную ориентацию гена *cel7A* по отношению к промотору, сигнальному пептиду и к *мус-6xHis* последовательностям.

В последующих экспериментах полученную рекомбинантную интегральную плазмиду pHO-GAPDH- α -*cel7A*-myc-6His-KanMX4-*HO* линейаризовали рестрикцией ферментами *EcoRV* и *XbaI* и использовали для трансформации клеток *S. cerevisiae* штамма FF18733. Скрининг трансформантов проводили в агаризованной YPD в присутствии G418. Хромосомная интеграция кассеты с геном α -*cel7A* в *HO* locus генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР с применением праймеров представленных в таблице 1 и с использованием геномной ДНК рекомбинантных штаммов в качестве матрицы (рисунок 4).

В результате ПЦР с праймерами Pr1 и Pr2, гомологичных к участкам хромосомы фланкирующие *HO* locus, как ожидалось, амплифицирован фрагмент ДНК размером около 6400 п.н. (рисунок 4В, 1-2). При использовании праймеров Pr1 и Pr3 (Pr3 гомологична к участку KanMX4 гена) обнаружился только один фрагмент длиной 2000 п.н (рисунок 4В, 3-4). Результаты этих экспериментов подтверждают эффективную интеграцию кассеты pHO-GAPDH- α -*cel7A*-myc-6His - KanMX4-*HO* в *HO* locus генома *S. cerevisiae*.

Таким образом, в результате работы был создан вектор интеграции pHO-GAPDH- α -*cel7A*-myc-6His-KanMX4-*HO*, способный встраиваться в хромосому штамма *Saccharomyces cerevisiae* за счет гомологичной рекомбинации. На основе штамма FF18733 *Saccharomyces cerevisiae* с помощью вектора pHO-GAPDH- α -*cel7A*-myc-6His-KanMX4-*HO* получен рекомбинантный штамм *S. cerevisiae*/pGAPDH- α -*cel7A*.



А – линейная форма рНО-PGAPDH- α -cel7A-KanMX4-HO кассеты с картой праймеров. В – продукты ПЦР, полученные на матрице геномной ДНК с применением Pr1-Pr3 праймеров.

Рисунок 4 – Эффективность интеграции рНО-PGAPDH- α -cel7A -myc-6xHis -KanMX4-HO кассеты в хромосомную ДНК *Saccharomyces cerevisiae*

Как отмечалось выше, данная конструкция должна обеспечивать не только экспрессию рекомбинантного белка, но и секрецию в среду культивирования, а также следить за экспрессией гена с помощью иммуноблоттинга со специфическими антителами к Myc-эпиту. В связи с этим в последующих экспериментах для доказательства экспрессии рекомбинантного *CEL7A L. edodes* использовали иммуноблоттинг с коммерческими *c-Myc* антителами. Для этого образцы белков клеточного экстракта рекомбинантных клеток *S. cerevisiae/pGAPDH- α -cel7A* фракционировали с помощью ДСН-ПААГЭ и перенесли на PVDF мембрану и инкубировали с *c-Myc* антителами. Иммуноблоттинг выявил мажорную белковую полосу с молекулярной массой незначительно большей, чем рассчитанная молекулярная масса *CEL7A* (рисунок 4С, 2-4). Тогда как белки, полученные из не трансформированных клеток, не содержали белковой полосы с искомой массой (рисунок 4С, 1).

Для анализа секреции и очистки секретируемого рекомбинантного белка культуральную жидкость, отобранную через 72 часа культивирования рекомбинантных клеток *S. Cerevisiae/pGAPDH- α -cel7A*, дополнительно центрифугировали в течение 7 мин при 3000xg для осаждения остаточных клеток, фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм. Далее состав культуральной жидкости уравнивали составом буфера А (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 500 mM NaCl, 0.1% NP40 20mM Имидазол) и загрузили на хелатирующую колонку HiTrap Chelating HP column (Amersham Biosciences, GE Health) заряженную ионами Ni²⁺. Связавшийся белок элюировали буфером, содержащим 500mM имидазола (pH 8,0). Следует отметить, что все процедуры хроматографической очистки проводили при температуре 0-4°C. На каждом этапе выделения и очистки отбирали аликвоты для электрофоретического анализа белков. Степень очистки полученного белка определяли с помощью гель-электрофореза по Лэммли с последующим окрашиванием раствором Coomassie G-250 (рисунок 4D). Как видно из представленных данных, рекомбинантный белок был очищен до гомогенного состояния с помощью никель-хелатной хроматографии. Однако молекулярная масса очищенной секретируемой целлюбиогидролазы в ДСН-ПААГ превышала расчетную молекулярную массу (53 кДа) фермента. Эти данные указывают на то, что секреторная форма

CEL7A в трансформированных дрожжевых клетках представлено формой с более высокой молекулярной массой. Увеличение молекулярной массы свойственно гликозилированным белкам, так как они часто представлены в виде набора различных по молекулярной массе гликоформ, отличающихся длиной и составом олигосахаридных цепей [23].

Таким образом, было показано что рекомбинантный штам *S. cerevisiae/pGAPDH- α -cel7A*, полученный с помощью конструированного нами интегрального вектора *pHO-GAPDH- α -cel7A-*myc-6xHis-KanMX4-HO** обеспечивает непрерывную экспрессию гена целлюбиогидролазы *cel7A* и секрецию продукта этого гена в окружающую среду. Наличие в составе гена *Myc*-эпитопа позволяет следить за экспрессией гена с помощью иммуноблотинга с специфическими антителами к *Myc*-эпитопу. Кроме этого, присутствие на С-конце продукта гена последовательности *6xHis*-хвоста позволяет аффинной очистке белкового продукта на основе никель-основанной хроматографии.

Благодарности. Работа поддержана грантом ГФ4/1324 МОН РК.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70. – P. 1207-1212.
- [2] Wen F., Sun J., Zhao H. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 76. – P. 1251-1260.
- [3] Den Haan R., Rose S.H., Lynd L.R., Van Zyl W.H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // *Metab. Eng.* – 2007. – Vol. 9. – P. 87-94.
- [4] Tsai S.L., Goyal G., Chen W. Surface display of a functional minicellulosome by intracellular complementation using a synthetic yeast consortium and its application to cellulose hydrolysis and ethanol production // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 76. – P. 7514-7520.
- [5] Fan L.H., Zhang Z.J., Yu X.Y., Xue Y.X., Tan T.W. Self-surface assembly of cellulosomes with two mini scaffolds on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2012. – Vol. 109. – P. 13260-13265.
- [6] Yamada R., Hasunuma T., Kondo A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing // *Biotechnol. Adv.* – 2013. – Vol. 31. – P. 754-763.
- [7] Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Kondo A. Gene copy number and ploidy on products formation in yeast // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 88. – P. 849-857.
- [8] Sakai A., Shimizu Y., Hishinuma F. Integration of heterologous genes into chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1990. – Vol. 3. – P. 302-306.
- [9] Kim M.D., Rhee S.K., Seo J.H. Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal delta-integration // *J. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 85(1). – P. 41-48.
- [10] Kim J.H., Kim H.R., Lim M.H., Ko H.M., Chin J.E., Lee H.B., Kim I.C., Bai S. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase, α -amylase and debranching enzyme // *Biotechnol. Lett.* – 2010. – Vol. 32. – P. 713-719.
- [11] Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H. Cocktail delta-integration a novel method to construct cellulolytic enzyme expression ratio-optimized yeast strains // *Microb. Cell Fact.* – 2010. – Vol. 9. – P. 32.
- [12] Voith W.P., Richards J.D., Shaw J.M., Stillman D.J. Yeast vectors for integration at the HO locus // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – P. E59-59.
- [13] Bakhrat A., Jurica M.S., Stoddard B.L. and Raveh D. Homology modeling and mutational analysis of Ho endonuclease of yeast // *Genetics.* – 2004. – Vol. 166. – P. 721-728.
- [14] Baganz F., Hayes A., Marren D., Gardner D.C., et al. Suitability of replacement markers for functional analysis studies in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast.* – 1997. – Vol. 13. – P. 1563-1573.
- [15] Walker M.E., Gardner J.M., Vystavelova A., McBryde C., et al. Application of the reusable, KanMX selectable marker to industrial yeast: construction and evaluation of heterothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*, possessing minimal foreign DNA sequences // *FEMS Yeast Res.* – 2003. – Vol. 4. – P. 339-347.
- [16] Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., et al. Cloning of a gene encoding a highly stable endo-1,4- β -glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast // *J. Biosci. Bioeng.* – 2001. – Vol. 92. – P. 434-441.
- [17] Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
- [18] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
- [19] Michaelis S., and Herskowitz I., et al. The a-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating // *Mol. Cell Biol.* – 1988. – Vol. 8, N 3. – P. 1309-1318.
- [20] Strazdis J.R., MacKay V.L. Induction of yeast mating pheromone a-factor by alpha cells // *Nature.* – 1983. – Vol. 305, N 5934. – P. 543-545.

[21] Taipakova S.M., Smailov B.B., Stanbekova G.E., Bissenbaev A.K. Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase gene in *E. coli* and characterization of recombinant enzyme // *Journal of Cell and Molecular biology*. – Turkey, 2011. – Vol. 9, N 1. – P. 53-63.

[22] Бисенбаев А.К. Тайпакова С.М. Клонирование и экспрессия кДНК целлюлогидролазы CEL7A гриба *Lentinula edodes* в про- и эукариотических системах и изучение физико-химических свойств рекомбинантного фермента // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2012. – № 3(291). – С. 39-46.

[23] Kasturi L., Chen H., Shakin-Eshleman S.H. Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 323. – P. 415-419.

REFERENCES

[1] Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, 70, 1207-1212 (in Eng.).

[2] Wen F., Sun J., Zhao H. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2010**, 76, 1251-1260 (in Eng.).

[3] Den Haan R., Rose S.H., Lynd L.R., Van Zyl W.H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.*, **2007**, 9, 87-94 (in Eng.).

[4] Tsai S.L., Goyal G., Chen W. Surface display of a functional minicellulosome by intracellular complementation using a synthetic yeast consortium and its application to cellulose hydrolysis and ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2010**, 76, 7514-7520 (in Eng.).

[5] Fan L.H., Zhang Z.J., Yu X.Y., Xue Y.X., Tan T.W. Self-surface assembly of cellulosomes with two mini scaffolds on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2012**, 109, 13260-13265 (in Eng.).

[6] Yamada R., Hasunuma T., Kondo A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing. *Biotechnol. Adv.*, **2013**, 31, 754-763 (in Eng.).

[7] Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Kondo A. Gene copy number and polyploidy on products formation in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, 88, 849-857 (in Eng.).

[8] Sakai A., Shimizu Y., Hishinuma F. Integration of heterologous genes into chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1990**, 3, 302-306 (in Eng.).

[9] Kim M.D., Rhee S.K., Seo J.H. Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal delta-integration. *J. Biotechnol.*, **2001**, 85(1), 41-48 (in Eng.).

[10] Kim J.H., Kim H.R., Lim M.H., Ko H.M., Chin J.E., Lee H.B., Kim I.C., Bai S. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase, α -amylase and debranching enzyme. *Biotechnol. Lett.*, **2010**, 32, 713-719 (in Eng.).

[11] Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H. Cocktail delta-integration: a novel method to construct cellulolytic enzyme expression ratio-optimized yeast strains. *Microb. Cell Fact.*, **2010**, 9, 32 (in Eng.).

[12] Voth W.P., Richards J.D., Shaw J.M., Stillman D.J. Yeast vectors for integration at the *HO* locus. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, 29, E59-59 (in Eng.).

[13] Bakhrat A., Jurica M.S., Stoddard B.L. and Raveh D. Homology modeling and mutational analysis of Ho endonuclease of yeast. *Genetics*, **2004**, 166, 721-728 (in Eng.).

[14] Baganz F., Hayes A., Marren D., Gardner D.C., et al. Suitability of replacement markers for functional analysis studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **1997**, 13, 1563-1573 (in Eng.).

[15] Walker M.E., Gardner J.M., Vystavelova A., McBryde C., et al. Application of the re-useable, KanMX selectable marker to industrial yeast: construction and evaluation of heterothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*, possessing minimal foreign DNA sequences. *FEMS Yeast Res.*, **2003**, 4, 339-347 (in Eng.).

[16] Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., et al. Cloning of a gene encoding a highly stable endo-1,4- β -glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, **2001**, 92, 434-441 (in Eng.).

[17] Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248-254 (in Eng.).

[18] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227, 680-685 (in Eng.).

[19] Michaelis S., and Herskowitz I., et al. The a-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating. *Mol. Cell Biol.*, **1988**, 8(3), 1309-1318 (in Eng.).

[20] Strazdis J.R., MacKay V.L. Induction of yeast mating pheromone a-factor by alpha cells. *Nature*, 1983, 305(5934), 543-545 (in Eng.).

[21] Taipakova S.M., Smailov B.B., Stanbekova G.E., Bissenbaev A.K. Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase gene in *E. coli* and characterization of recombinant enzyme. *Journal of Cell and Molecular biology*, Turkey, **2011**, 9(1), 53-63 (in Eng.).

[22] Taipakova S.M., Bissenbaev A.K. Cloning and expression of DNA ce cel7A of mushroom *Lentinula edodes* in the pro-and eukaryotic systems and studying of the physicochemical properties of the recombinant enzyme. *News of the National academy of sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biological and medical*, **2012**, 3(291), 39-46 (In Russ.).

[23] Kasturi L., Chen H., Shakin-Eshleman S.H. Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem. J.*, **1997**, 32, 415-419 (in Eng.).

АШЫТҚЫЛАР ХРОМОСОМАСЫНЫҢ *HO* ЛОКУСЫНА БАҒЫТТАЛҒАН ИНТЕГРАЦИЯЛЫҚ ЭКСПРЕССИЯЛАУШЫ ВЕКТОРДЫ ҚҰРАСТЫРУ

С. М. Тайпақова, И. Т. Сметенов, А. Қ. Қуанбай, А. С. Бурибаева, А. К. Бисенбаев*

ЕМК «Биология және биотехнология мәселелері ғылыми-зерттеу институты»
аль-Фараби ат. ҚазҰУ, Алматы, Қазақстан

Түйін сөздер: *HO* локус, геномды интеграция, секреция, целлобиогидролаза, *Lentinula edodes*; *Saccharomyces cerevisiae*.

Аннотация. Гендік инженерия әдістерінің көмегімен құрамында ашытқылар α -факторының сигналдық пептиді. Мус-эпитобы және гистидинді құйрығы бар және *L. edodes* саңырауқұлағының *cel7A* целлобиогидролаза гені қосылған рНО-GAPDH- α -*cel7A*-мус-6His-KanMX4-НО интегралдық конструкция құрастырылды. Хромосомасында *L. edodes* саңырауқұлағының *cel7A* целлобиогидролаза гені бар ашытқылардың жаңа тұрақты штамдары алынды. *L. edodes* саңырауқұлағының *cel7A* целлобиогидролаза генінің ашытқылар геномының *HO* локусындағы хромосомалық интеграциясы ПЦР әдісімен дәлелденді. Бұл штамм *cel7A* целлобиогидролаза генінің үздіксіз экспрессиясын және ген өнімінің қоршаған ортаға секрециялануын қамтамасыз етеді. Ген құрамындағы мус-эпитоп мус-эпитобына тән антиденелерімен иммуноблоттинг жасау арқылы ген экспрессиясын бақылауға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, геннің С-соңында 6xHis-құйрығының болуы белокты өнімді никельге негізделген аффиндік хроматография әдісімен тазартып алуға жағдай тудырады.

Поступила 04.05.2016 г.