

## Конструирование плазмиды для экспрессии гена пероксидазы хрена изофермента С2 в клетках дрожжей

Е. А. Мартынова, Т. В. Семашко\*, Л. Н. Валентович,  
Л. А. Жуковская

Институт микробиологии НАН Беларуси  
Беларусь, 220141 г. Минск, улица. Купревича, 2.

\*Email: tsemashko@mbio.bas-net.by

Проведена оптимизация кодона гена пероксидазы хрена *Armoracia rusticana* изоформы С2 (*hrpC2*) для экспрессии в клетках дрожжей. На основе рPICZαА сконструирован вектор, несущий синтезированный *hrpC2*, получены трансформанты *Pichia pastoris*.

**Ключевые слова:** ген пероксидазы хрена изоформы С2, вектор для экспрессии гена, трансформация, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*.

Пероксидаза из корней хрена (*Armoracia rusticana*) (HRP, пероксид оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.7) является самым востребованным ферментом в аналитической химии и медицинской диагностике. Она катализирует окисление широкого спектра фенольных, ароматических соединений и некоторых неорганических ионов с участием  $H_2O_2$ . Фермент характеризуется биохимической гетерогенностью, полиморфизмом и полифункциональностью. HRP применяется в фотометрических, электрохимических, хемилюминесцентных, иммуноферментных и ДНК-гибридизационных методах анализа [1]. Фермент представлен более чем 30 изоформами, обычно классифицируемыми по изоэлектрическим точкам. Лидером по изученности и практическому применению является изофермент С1 HRP. Не меньший интерес представляет исследование свойств изоформы С2 HRP, которая близка к изоформе С1 по точке изоэлектрофокусирования, однако идентичность нуклеотидных последовательностей составляет 77%.

В последние годы прогресс, достигнутый в генной инженерии при клонировании эукариотических генов в гетерологических системах, открывает новые возможности. При получении рекомбинантной пероксидазы хрена используют векторные системы для экспрессии генов *hrp* в клетках *Escherichia coli*, дрожжей и растений [1–3].

Система экспрессии в *E. coli* наиболее популярна при проведении фундаментальных исследований каталитических и физико-химических свойств изоформ данного фермента. А отсутствие гликозилирования, хотя и снижает его стабильность в 2–3 раза, позволяет исследовать его кристаллическую структуру. Согласно литературным данным, в кристаллической форме все пероксидазы растений, за исключением пероксидазы арахиса, были получены путем клонирования кодирующих их генов в *E. coli* [1, 3].

Ряд экспериментов по продукции рекомбинантной HRP C1 были выполнены в *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* [2]. Так, для изучения мутаций, направленных на получение более высокой ферментативной активности и термической стабильности, в ДНК *hrpC1A* вносились изменения, после чего мутантный ген переносился в метилотрофные дрожжи *P. pastoris*. Установлено, что мутация Asn175Ser приводила к увеличению термической стабильности, благодаря дополнительным водородным связям, вызывающим стабилизацию гемовой части фермента [1]. Ген *hrpC1A* был клонирован в экспрессирующем векторе для *P. pastoris* – pPIZαB, содержащим последовательность, кодирующую α-фактор *S. cerevisiae* – сигнал секреции метанол-индуцируемого промотора PAOX1; ген устойчивости к антибиотику зеоцину для селекции как в *E. coli*, так и в *Pichia*; последовательность, кодирующую С-концевую полигистидиновую метку для упрощения процесса очистки рекомбинантного белка. В *P. pastoris* также была продемонстрирована возможность продукции HRP с Fab-фрагментами (fatty acid binding protein), обеспечивающих устойчивость к атразину, что придавало HRP антигенсвязывающие свойства. Кроме того, ген *hrpC1A* был клонирован в дрожжевой секретирующий вектор pYEX-S. Экспрессия гена находилась под контролем конструктивного промотора фосфолицераткиназы. Согласно литературным данным [1, 2] максимальный выход продукта (5.2 мг/л) получен при использовании для клонирования вектора pPIZα.

Цель работы – создание генетической конструкции, несущей последовательность гена изоформы C2 пероксидазы хрена (*hrpC2*), на основе pPICZαA и провести трансформацию экспрессионного сконструированного вектора в клетки *P. pastoris*.

В настоящей работе была использована плаزمида pEX-A128-*hrpC2*, несущая в себе искусственно синтезированный *hrpC2*. Последовательность гена была оптимизирована для дальнейшей экспрессии в дрожжевых клетках *P. pastoris* с использованием программы Sequence Optimizer. Проведены замены редких для *P. pastoris* кодонов GCG (Ala 23, 32, 65), CTC (Leu 99, 131, 155, 161, 200, 235), CGG и CGC (Arg 181 и 29).

В качестве экспрессионного вектора применяли pPICZαA. Клетки бактериального штамма *E. coli* XL-1 Blue выращивали, используя жидкую или агаризованную LB-среды [4, 5]. Трансформацию клеток штамма *E. coli* XL-1 Blue и *P. pastoris* проводили методом электропорации с помощью прибора MicroPulser BIO-RAD (США) [6]. Трансформанты отбирали по устойчивости к антибиотикам: ампициллину (концентрация 100 мкг/мл) и/или зеоцину (концентрация 20 мкг/мл).

Для выделения плазмидной ДНК из *E. coli* XL-1 Blue использовали либо метод щелочного лизиса [4], либо методику производителя набора для выделения пДНК NucleoSpin® Plasmid (MACHEREY-NAGEL).

Рестрикционный анализ и реакцию лигирования осуществляли при помощи ферментов и буферных растворов фирмы «ThermoScientific», Литва.

Для конструирования экспрессионного вектора исходный рPICZ $\alpha$ A обрабатывали рестриктазой EcoRI, а затем дефосфорилировали щелочной фосфатазой. После линейаризации рPICZ $\alpha$ A по уникальному сайту рестрикции EcoRI получена последовательность, размер которой составлял 3593 п.о (рис. 1, дорожка 1).

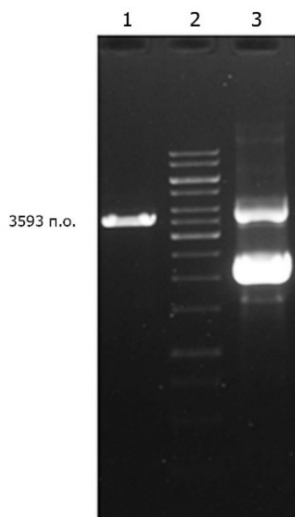


Рис. 1. Электрофореграмма плазмидной ДНК рPICZ $\alpha$ A (1 – плазида рPICZ $\alpha$ A, разрезанная по сайту рестрикции EcoRI; 2 – маркер молекулярного веса (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, «ThermoScientific», Литва); 3 – исходная плазида рPICZ $\alpha$ A).

Для выделения гена *hrpC2* плазмиду рEX-A128-*hrpC2* обрабатывали рестриктазой EcoRI. В данной плазмиде имелись два соответствующих сайта рестрикции. В итоге был выделен необходимый фрагмент размером 1004 п.о. (рис. 2, дорожка 2, дорожка 3).

На следующем этапе работы проводилось клонирование *hrpC2* в линейаризованную плазмиду рPICZ $\alpha$ A. Для этого смесь рPICZ $\alpha$ A и *hrpC2*, предварительно элюированных из агарозных гелей, обрабатывали лигазой бактериофага T4. Продукты лигазной смеси использовались для трансформации клеток штамма *E. coli* XL-1 Blue, трансформанты отбирались по устойчивости к зеоцину.

Затем из клеток-трансформантов, выросших на селективной среде с антибиотиком, выделяли плазмидную ДНК и проводили рестрикционный анализ полученных плазмид для отбора клеток, несущих в себе гибридную ДНК рPICZ $\alpha$ A с последовательностью *hrpC2*. В результате проведенного анализа с использованием ферментов рестрикции EcoRI (размер фрагментов ДНК после рестрикции составил 3593 п. о. и

1004 п. о.), HindIII (размер плазмиды 4597 п. о.) и BamHI (размеры 3702 п. о., 475 п. о., 420 п. о.) была отобрана необходимая генетическая конструкция.

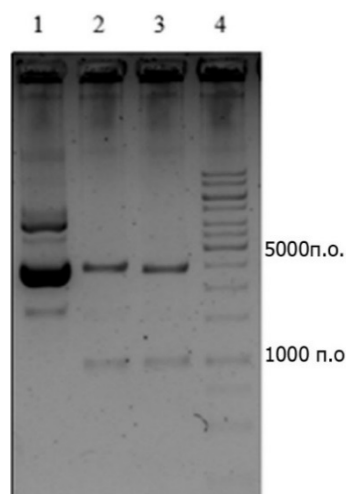


Рис. 2. Электрофореграмма плазмидной ДНК рEX-A128-hrpC2 (1 – плаزمида рEX-A128-hrpC2; 2.3 – плазмида рEX-A128-hrpC2, разрезанная по сайту рестрикции EcoRI I; 4 – маркер молекулярного веса (GeneRuler™ 1<sup>kb</sup> DNA Ladder, «ThermoScientific», Литва)).

Таким образом на данном этапе работы была сконструирована рекомбинантная плазмидная ДНК рPICZ $\alpha$ A-hrpC2, использованная для создания дрожжевого штамма-продуцента пероксидазы хрена изофермента C2. В дальнейшем была проведена электропорация рPICZ $\alpha$ A-hrpC2 в клетки *P. pastoris*, по устойчивости к зеоцину отобрано 30 трансформантов, несущих ген *hrpC2*. Полученные трансформанты будут использованы для выделения изофермента C2 HRP и исследования его свойств.

## Литература

1. Krainer F. W., Glieder A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 99, №4. P. 1611–1625.
2. Morawski B., Lin Z., Cirino P., Joo H., Bandara G., Arnold F. H. Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* // Protein Eng. 2000. Vol. 13, №5. P. 377–384.
3. Gundinger T., Spadiut O. A comparative approach to recombinantly produce the plant enzyme horseradish peroxidase in *Escherichia coli* // Journal of Biotechnology. 2017. Vol. 248. P. 15–24.
4. Лагодич А. В., Лагодич О. В. Методы анализа нуклеиновых кислот: учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. Минск: Изд-во БГУ, 2013. 47 с.

5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Пер. с англ. [под ред. ак. А. А. Баева и д-р биол. наук К. Г. Скрыбина]. М.: Мир, 1984–480 с.
6. Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection // *BioTechniques*. 1987. Vol. 5. P. 376–378.

Статья рекомендована к печати Институтом микробиологии НАН Беларуси

## **Construction of plasmid for expression of horseradish peroxidase gene isoenzyme C2 in yeast cells**

E. A. Martynava, T. V Semashko\*, L. N. Valentovich,  
L. A. Zhukovskaya

*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus  
2 Kuprevicha Street, 220141 Minsk, Belarus.*

\*Email: [tsemashko@mbio.bas-net.by](mailto:tsemashko@mbio.bas-net.by)

Codon optimization of horseradish peroxidase *Armoracia rusticana* gene isoform C2 (hrpC2) for expression in yeast cells was carried out. On the basis of plasmid pPICZ $\alpha$ A vector containing synthesized hrpC2 was constructed and transformants of *Pichia pastoris* were obtained.

**Keywords:** horseradish peroxidase gene isoform C2, vector for gene expression, transformation, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*.