

Использование пурамицина для отбора дрожжей *Pichia pastoris*

Научный руководитель – Мышкина Надежда Михайловна

Малышевская Алёна Константиновна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия

E-mail: alenamal00@gmail.com

Дрожжи *Pichia pastoris* — эукариотический модельный объект, широко используемый для решения генно-инженерных и биотехнологических задач. *P. pastoris* обладает рядом ценных качеств, например, способностью достигать высокой плотности в жидких культурах, синтезировать белки в больших количествах, производить пост-трансляционные модификации рекомбинантных белков, необходимые для их функционирования [1].

Часто в исследовательских задачах возникает необходимость внедрения в клетку нескольких генетических конструкций одновременно с использованием разных селективных маркеров, наиболее удобными из которых являются устойчивости к антибиотикам. На сегодняшний день для селекции *P. pastoris* используется ряд антибиотиков, таких как G418, гигромицин, зеоцин, нурсеотрицин, бластицидин [3], однако всё ещё есть задача расширения этого списка для увеличения возможного числа одновременно трансформируемых конструкций. Для *Saccharomyces cerevisiae* была показана возможность отбора на пурамицине с использованием конструкции с геном устойчивости к этому антибиотику [2], однако нет информации о возможности использования этого антибиотика для *P. pastoris*.

В данном исследовании мы показали, что рост дикого типа дрожжей *P. pastoris* штамма GS115 подавляется при концентрации пурамицина в среде от 7 мМ, что делает возможным отбор в таких условиях. Также мы подтвердили, что в качестве селективного маркера может быть успешно использован ген устойчивости к пурамицину (ген N-ацетилтрансферазы из *Streptomyces alboniger*). Для этого мы создали конструкцию, содержащую ген устойчивости к пурамицину и ген-репортер (люцифераза грибов), и трансформировали дрожжи этой конструкцией. Отбор прошел эффективно, поскольку только трансформанты, экспрессирующие ген-репортер, демонстрировали рост на селективной среде, содержащей 7 мМ пурамицина. Экспрессия репортера была подтверждена свечением дрожжей в ответ на внесение субстрата люциферазы — люциферина. Полученные результаты позволяют расширить спектр антибиотиков, используемых для отбора дрожжей *P. pastoris* штамма GS115.

Работа была выполнена в лаборатории химии метаболических путей ИБХ РАН и поддержана грантом Президента для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2605.2020.4.

Источники и литература

- 1) Darby R.A.J., Cartwright S.P., Dilworth M.V., Bill R.M. Which Yeast Species Shall I Choose? *Saccharomyces cerevisiae* Versus *Pichia pastoris* (Review) // *Methods in Molecular Biology*. 2012. 866. 11–23.
- 2) MacDonald C., Piper R.C. Puromycin- and methotrexate-resistance cassettes and optimized Cre-recombinase expression plasmids for use in yeast // *Yeast*. 2015. 32(5). 423-438.
- 3) Yang J., Nie L., Chen B., Liu Y., Kong Y., Wang H., Diao, L. Hygromycin-resistance vectors for gene expression in *Pichia pastoris* // *Yeast*. 2014. 31(4). 115–125.