

Конструирование векторных систем обеспечивающих биолюминесценцию в дрожжах *Saccharomyces boulardii*

Научный руководитель – Балабова Дина Владимировна

Хиврич Р.Д.¹, Балаш Е.А.²

1 - Алтайский государственный университет, Биологический факультет, Кафедра экологии, биохимии и биотехнологии, Барнаул, Россия, *E-mail: khivrich.rus@mail.ru*; 2 - Алтайский государственный университет, Биологический факультет, Барнаул, Россия, *E-mail: alekseevna_ekaterinka@list.ru*

В настоящее время оптический имиджинг *in vivo* все чаще востребован в качестве метода визуализации в современных биомедицинских исследованиях. Получение трансгенных светящихся дрожжей является перспективной прикладной задачей. Использование автономных биолюминесцентных систем, где биосинтез люциферина может быть воспроизведен методами генной инженерии в клетках модельного организма, может послужить альтернативой существующим технологиям биоимиджинга *in vivo*. В основе люминесценции грибов лежат гены *hisps* (гиспидинсинтаза), *h3h* (гиспидин-3-гидроксилаза), *luz* (люцифераза) и *cph* (каффеоилпируватгидролаза). Они составляют кластер генов цикла кофейной кислоты – путь биосинтеза и утилизации люциферина грибов. Дрожжи *Saccharomyces boulardii* являются хорошо изученными микроорганизмами, которые могут быть успешно применены для конструирования векторов метаболических путей. Целью данной работы было конструирование векторных систем для гетерологичной экспрессии кластера генов люминесценции грибов в дрожжах *S. boulardii*.

Нами был проведен дизайн двух векторных систем, содержащие гены *hisps*, *cph*, *h3h*, и *luz* под контролем промоторов TEF1 (промотор фактора элонгации транскрипции), TDH3 (промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) и PGK1 (промотор гена фосфоглицераткиназы).

Была сконструирована одна векторная система, в состав которой включены: сильный конститутивный промотор TEF1, ген HispS, промотор гена ADH1 и ген устойчивости к зеоцину в качестве селективного маркера. Схема клонирования вектора включала в себя последовательное проведение ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров и ДНК-матриц. Полученные ПЦР продукты гена гиспидинсинтазы *hisps* и гена промотора TEF1 были объединены путем проведения реакции PCR-Overlap [1].

Далее ПЦР-продукт был обработан рестриктазами SfiI и Sfr303I, и лигирован по липким концам. Полученный вектор pGH-TEF-Bul-HispS секвенировали по методу Сенгера. Таким образом, был получен вектор, позволяющий интегрировать экспрессионную кассету, содержащую ген гиспидинсинтазы, в геном *S. boulardii* по принципу гомологичной рекомбинации. Для этого трансформировали электрокомпетентные клетки ранней логарифмической фазы при следующих параметрах: 2500 В, 25 мкФ и продолжительности импульсов 4,6 мс. Трансформанты отбирали на среде YPD, содержащей антибиотик зеоцин в концентрации 0,1 мг/мл.

В дальнейшем будут получены рекомбинантные биолюминесцентные дрожжи *S. boulardii*, экспрессирующие гены цикла кофейной кислоты.

Источники и литература

- 1) Hilgarth, R.S., Lanigan, T.M. Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction // MethodsX, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.12.001>