

## СОЗДАНИЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА ЭРИТРОПОЭТИНА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

**Колковская Е.В., Голенченко С.Г., Прокулевич В.А.**

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь  
*katerinakolkovskaya@gmail.com*

Одним из наиболее распространенных заболеваний молодняка свиней является алиментарная анемия, которая заключается в снижении числа эритроцитов, а также снижении активности железосодержащих ферментов. Разработка препарата на основе рекомбинантного свиного эритропоэтина с использованием генно-инженерных подходов может явиться решением в борьбе с данным заболеванием.

Целью работы явилось создание конструкции, содержащей последовательность гена эритропоэтина для экспрессии данного белка в клетках дрожжей.

Для достижения поставленной цели из 7 пар праймеров, используя метод ПЦР, мы синтезировали последовательность гена эритропоэтина. Праймеры были разработаны таким образом, что продукт каждой реакции нёс области комплементарности для праймеров следующего этапа. Таким образом, синтез осуществлялся двунаправленно от центра к концам последовательности.

Последовательность, полученная в результате последней ПЦР, была встроена по сайтам рестрикции *NdeI* и *EcoRI* в вектор pET-24b, после чего полученную конструкцию перенесли в клетки *Escherichia coli* XL-1 Blue, а также в клетки *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Затем в клонах *E. coli* BL21-Еро индуцировали экспрессию с использованием IPTG в конечной концентрации 1мМ. Было установлено, что экспрессия целевого белка в исследованных клонах отсутствует. Секвенирование плазмидной ДНК из имеющихся клонов выявило, что в синтезированном нами гене имеется 3 замены азотистых оснований (А6→G6, А9→G9, А498→Т498). Две из них не привели к замене аминокислот в последовательности эритропоэтина, в третьем же случае произошла замена глутамата (Е) на аспартат в положении Е167. Замена находится в эволюционно вариабельной части белка на С-конце полипептидной цепочки и не должна повлиять на активность рекомбинантного белка. Далее с помощью метода ПЦР на 3'- конце последовательности гена эритропоэтина был введен сайт рестрикции для фермента *BamHI*, полученная конструкция была переклонирована по сайтам *NdeI* и *BamHI* в челночный вектор pAS2.

Таким образом, нами получена генетическая конструкция pAS2-еро, способная стабильно наследоваться в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, несущая кодирующую последовательность гена эритропоэтина под контролем промотора NMT.

## БИОСИНТЕЗ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ОЧИЩЕННОЙ ГЛЮКОЗЫ И ГЛЮКОЗО-СОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ ДРЕВЕСИНЫ У ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*

**Лунина Ю.Н., Камзолова С.В., Моргунов И.Г.**

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пушкино, Россия  
*luninaj@rambler.ru*

Лимонная кислота (ЛК) является соединением, которое находит широкое применение в пищевой, фармацевтической, косметической и других отраслях промышленности. В Евросоюзе биосинтетические органические кислоты, в том числе ЛК, рассматриваются в качестве перспективных средств защиты растений, которые эффективны в отношении бактериальных и грибных фитопатогенов. ЛК, произведенная микробным синтезом, имеет статус GRAS и относится к безопасным продуктам.

Целью данной работы явилось изучение биосинтеза ЛК из очищенной глюкозы и глюкозо-содержащих гидролизатов древесины с помощью дрожжей *Y. lipolytica* в условиях периодического и непрерывного культивирования.

В результате проведенных работ установлено, что в условиях периодического режима в среде с очищенной глюкозой специально-селекционированный мутант *Y. lipolytica* № 15 на 192 ч синтезировал 100 г/л ЛК с выходом продукта ( $Y_{LK}$ ), равным 63%. Показано, что в периодическом режиме активное кислотообразование продолжается всего 5-6 суток. Причиной снижения кислотообразующей активности продуцента являлось ингибирование высокими концентрациями ЛК в среде культивирования процесса кислотообразования. При применении отъемно-доливного метода активный биосинтез ЛК (68,1 - 69,3 г/л) продолжался в течение длительного времени (более 1250 ч). Показана принципиальная возможность получения ЛК из глюкозо-содержащих отходов гидролизатов опилок осины. Биомасса *Y. lipolytica* № 15 характеризуется высоким содержанием белка (26% от а.с.б.) и незаменимых аминокислот: валина, лейцина, лизина, метионина и др., что указывает на высокую кормовую ценность клеток.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-08-00702*