

ПІДБІР ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ГЕНІВ ФЕРМЕНТІВ СИНТЕЗУ ГЕМА В ДРІЖДЖАХ *S. CEREVISIAE* ATCC-18824

Підкурманна О.Г., Зелена Л.Б., Шульга С.М.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України

Вступ. Гем — залізовмісний порфірин, кофактор гемоглобіну, цитохромів, та інших білків. В харчовій промисловості його застосовують як барвник та ароматизатор. Гемоглобін є важливим для медицини і використовується як переносник кисню в штучних замінниках крові.

Біологічні функції гема пов'язані переважно із киснем в процесах зв'язування, транспорту та протидії активним формам кисню. Синтез гема в клітинах усіх живих організмів починається з амінолевуленової кислоти і склалає серію з восьми ензиматичних реакцій. У еукаріотичних організмів цей метаболічний шлях є консервативним, в той час як серед бактерій існує кілька альтернатив.[1]

Виділення гему та гемовмісних білків з природних джерел є малоефективним і складним, тому є інтерес до створення технології виробництва на основі різних мікроорганізмів.[2,3,4,5,6]

Дріжджі *S.cerevisiae* мають довгу історію використання в харчовому виробництві і загально визнані безпечними. Добре досліджений геном та низка молекулярно-генетичних інструментів розроблених для його модифікації роблять їх зручним об'єктом для створення продуцентів рекомбінантних білків.

Надекспресія всіх або частини генів ферментів задіяних в синтезі гему необхідна для створення штамів-продуцентів гему та гемоглобінів. Ефективною стратегією є вставка додаткових копій відповідних генів у геном.

Метою роботи було розробити праймери та отримати у вигляді ПЛР продукту копії восьми генів з геному дріжджів.

Матеріали та методи. В експерименті використовувався типовий штам дріжджів *S.cerevisiae* ATCC-18824 (Y-2519) отриманий з Української колекції мікроорганізмів. Геномну ДНК із дріжджів виділяли за допомогою LiOAc-SDS. [7] Дизайн праймерів проводився за допомогою програми SnapGene та бази даних GeneBank. Попередній аналіз послідовностей праймерів виконано за допомогою програми BLAST. Ампліфікацію проводили за допомогою Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf, Germany).

Результати та обговорення. Синтез гема в клітинах дріжджів відбувається в серії із восьми ферментативних реакцій. Гени цих восьми ферментів відомі - HEM1 (синтаза амінолевуленової кислоти), HEM2 (дегідратаза амінолевуленової кислоти), HEM3 (деаміназа порфобіліногену), HEM4 (синтаза уропорфіриногену III), HEM12 (декарбоксилаза уропорфіриногену), HEM13 (оксидаза копропорфіриногену), HEM14 (оксидаза протопорфіриногену), HEM15 (ферохелатаза).

Для створення прямого праймера обрано послідовність в 19 нуклеотидів матричного ланцюга на початку гена, включно із старт-кодоном. До 5'-кінця додано фрагмент із 11 нуклеотидів, що містить сайт розпізнавання рестриктазою *BsmBI* (*Esp3I*). Для створення зворотнього праймера обрано послідовність 19-20 нуклеотидів кодуючого ланцюга на кінці гена, включно зі стоп-кодоном. До 5'-

кінця додано фрагмент з 13 нуклеотидів, що також містить сайт розпізнавання рестриктазою *Bsm*BI (*Esp*3I)(Табл. 1). Додаткові фрагменти потрібні для того, щоб після обробки ПЛР-продукту рестриктазою *Bsm*BI (*Esp*3I) утворились липкі кінці 5'-tatg-3'(на початку) та 5'-ggat-3'(в кінці), сумісні з промотором та термінатором з Mo-Clo YTK.[8]

Перевірка послідовності праймерів (без доданих фрагментів) здійснена програмою BLAST підтвердила їх специфічність і показала формування продукту ДНК відповідного розміру (див. таблицю 1). Олігонуклеотидні послідовності праймерів синтезовано на замовлення у компанії Invitrogen (Thermo Fisher, США).

Таблиця 1. Послідовності підібраних праймерів для генів ферментів синтезу гема в дріжджах *S.cerevisiae* ATCC-18824.

Ген	Послідовність праймерів (F-forward, R-reverse)	Розмір, п.н.
HEM1	F – gagcgtctcgtatgcaacgctcattttg R – gagcgtctcgggattactgcttgataccaacta	1647
HEM2	F – gagcgtctcgtatgcatacagctgaatttt R – gagcgtctcgggattagttttcttcatctaacc	1029
HEM3	F – gagcgtctcgtatgggccctgaaactctac R – gagcgtctcgggatcatttgattctgtctaaa	984
HEM4	F – gagcgtctcgtatgtctagtcgtaaaaaag R – gagcgtctcgggattattatggcgctggat	828
HEM12	F – gagcgtctcgtatgggtaactttccagctc R – gagcgtctcgggattacttcaaccaattctg	1089
HEM13	F – gagcgtctcgtatgctgcccctcaagatc R – gagcgtctcgggattattaaccactctctt	987
HEM14	F – gagcgtctcgtatgttattaccattaacaa R – gagcgtctcgggattattgcttagctgtaagg	1620
HEM15	F – gagcgtctcgtatgctttccagaacaatcc R – gagcgtctcgggatcaagtagattcgtgattg	1182

Враховуючи температуру плавлення створених праймерів та розмір очікуваного продукту було підібрано режим ПЛР (Табл. 2).

Таблиця 2. Умови проведення ПЛР

Етап	Температура, °C	Час	Кількість циклів
Початкова денатурація ДНК	95	2хв.	1
Денатурація ДНК	95	30сек.	30
Відпалювання праймерів	55	45сек.	
Елонгація ДНК	72	1хв.45сек.	
Фінальна елонгація	72	7хв.	1

В результаті проведеної ПЛР було отримано по одному продукту очікуваного розміру для кожної пари праймерів. Візуалізацію проведено на 1% агарозному гелі (Рис.1).

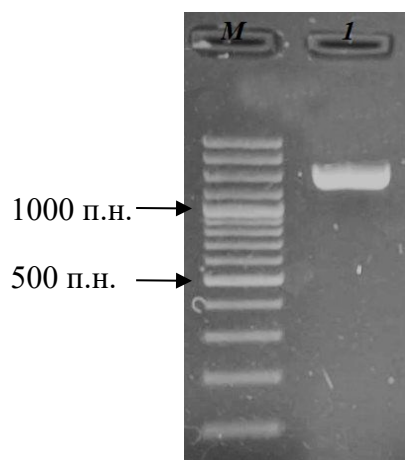


Рис.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймером до гену НЕМ1, де М – це маркер молекулярної ваги, 1 – зразок.

Висновки. В результаті проведених досліджень підібрано праймери та отримано кодуючі послідовності генів НЕМ1, НЕМ2, НЕМ3, НЕМ4, НЕМ12, НЕМ13, НЕМ14, НЕМ15 дріжджів *S.cerevisiae* ATCC-18824. Перевірка послідовності праймерів здійснена програмою BLAST підтвердила їх специфічність і показала формування продукту ДНК відповідного розміру. Комбінації цих генів слугуватимуть підґрунтям для створення касет під контролем індукцибельних промоторів, та інтеграції їх в геном за допомогою CRISPR-Cas9.

Список використаної літератури:

1. Dailey H, Dailey T, Gerdes S, et al. Prokaryotic Heme Biosynthesis: Multiple Pathways to a Common Essential Product. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2017; 81(1):e00048–16.
2. Zhao XR, Choi KR, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for secretory production of free haem. *Nature Catalysis* 2018; 1:720–728.
3. Ko YJ, Kim M, You SK, et al. Animal-free heme production for artificial meat in *Corynebacterium glutamicum* via systems metabolic and membrane engineering. *Metabolic Engineering* 2021; 66:217–228.
4. Liu L, Martinez JL, Liu Z, et al. Balanced globin protein expression and heme biosynthesis improve production of human hemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* 2014; 21:9–16.
5. Shankar S, Hoyt MA, inventors; Impossible Foods Inc., assignee. Expression Constructs and Methods of Genetically Engineering Methylophilic Yeast. United States Patent 009938327B2. 2018 Apr 10.
6. Shao Y, Xue C, Liu W, et al. High-level secretory production of leghemoglobin in *Pichia pastoris* through enhanced globin expression and heme biosynthesis. *Bioresource Technology* 2022; 363:127884.
7. Looke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* 2011; 50(5):325–328.
8. Lee ME, DeLoache WC, Cervantes B, et al. A highly characterized yeast toolkit for modular, multipart assembly. *ACS Synthetic Biology* 2015; 4:975–986.