

# СТВОРЕННЯ КОНСТРУКЦІЙ ДЛЯ БАГАТОКОПІЙНОЇ ІНТЕГРАЦІЇ ГЕНІВ ІНТЕРЕСУ В ДЕЛЬТА ПОСЛІДОВНОСТІ ГЕНОМУ ДРІЖДЖІВ

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

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

pidkurhanna@gmail.com

## Abstract

*Yeasts are attractive cell factories for recombinant protein production. Stable integration and high-copy number of gene interest are essential for strain productivity. Constructions designed in this work are intended for CRISPR-mediated multi-copy integrations into delta-sites of *Saccharomyces cerevisiae* genome.*

**Keywords:** *S. cerevisiae*, CRISPR/Cas9, delta integration, genome engineering.

**Вступ.** Розвиток технологій редагування геному дозволяє змінювати характеристики мікроорганізмів та забезпечує можливість використовувати їх як клітинні фабрики для виробництва різноманітних продуктів – біопалив, фармацевтичних препаратів, харчових добавок, тощо [1]. Дріжджі – еукаріотичні мікроорганізми, найбільш широко використовуються для виробництва рекомбінантних білків, оскільки здатні забезпечити синтез, фолдинг та посттрансляційну модифікацію [2]. Дріжджі *S. cerevisiae* привабливі для біотехнології, оскільки мають тривалу історію промислового використання, добре вивчені геном та метаболічні шляхи, здатні рости за «high density culture cultivation» на недорогих поживних середовищах.

Інтеграція цільових генів в геном через гомологічну рекомбінацію забезпечує більшу стабільність, ніж використання епісомальних плазмід, тому їй надається перевага для створення промислових штамів [3]. Для забезпечення відповідної продуктивності необхідна, зокрема, висока копійність цільового гену. В дріжджах це досягається інтеграцією в кластери рибосомальної ДНК (rDNA) або в дельта-послідовності Ту-елементів. Використання CRISPR/Cas9 підвищило ефективність цих підходів [4,5].

Метою роботи було створити конструкції для ефективної бакатокопійної інтеграції цільових генів в дельта послідовності геному дріжджів.

**Матеріали та методи.** Функціональні фрагменти для створення конструкцій використовували з плазмід набору Mo-Clo YTK [6]. Штами культивували на середовищі LB (соєвий пептон – 10 г/л, дріжджовий екстракт – 5 г/л, NaCl – 5 г/л, агар – 20 г/л) з додаванням відповідних антибіотиків для селекції. Плазмідну ДНК виділяли методом лужного лізису [7]. Робоча плазміда рFC була зібрана в чотири етапи; кожний етап передбачав єдину реакцію рестрикції-лігування з рестриктазами *Eco31I*(*BsaI*) (Thermo Scientific, США) або *Esp3I*(*BsmBI*) (Thermo Scientific, США) та лігазою T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, США) [8]. ПЛР проводили на 7500 Applied System Real Time PCR System (США) за таких умов: початкова денатурація 95°C – 2 хв., (денатурація 95°C – 30 сек., віджиг праймерів 55°C – 45 сек., елонгація 72°C – 1 хв. 45 сек.)x30циклів, фінальна елонгація 72°C – 7 хв. Продукти ампліфікації візуалізовані на 1% агарозному гелі та очищені за допомогою GeneJET Gel

Extraction Kit (Thermo Scientific, США). Хімічно-компетентні клітини були підготовані та трансформовані відповідно за протоколом [9].

**Результати та обговорення.** Для успішної багатокопійної інтеграції в дельта послідовності геному *S. cerevisiae* необхідні: робоча плазміда, що експресуватиме ендонуклеазу Cas9 і дельта-специфічну гайдерну sgRNA та донорна лінійна ДНК з геном інтересу та дельта-специфічними гомологічними послідовностями на кінцях.

Робочу плазмиду рFC було зібрано нами раніше [10]. Для спрямування роботи CRISPR/Cas9 в дельта-сайти необхідна вставка 20-нуклеотидної послідовності для sgRNA [4]. Обрана послідовність була закладена в F праймер: 5'-gagcgtctcagactttatactagaagttctcctcggtttagagctagaata-3'. Другий R праймер: 5'-ccaagaccgttcagctgga-3'. За допомогою пари праймерів ампліфіковано фрагмент плазмиди рFC (рис.1). Фінальну версію робочої плазмиди, рFC-delta, що експресуватиме дельта-специфічну гайдерну sgRNA, отримано лігуванням ПЛР продукту та фрагменту плазмиди рFC, попередньо оброблених рестриктазами *Esp3I*(*BsmBI*) та *HindIII*, та очищених з гелю.

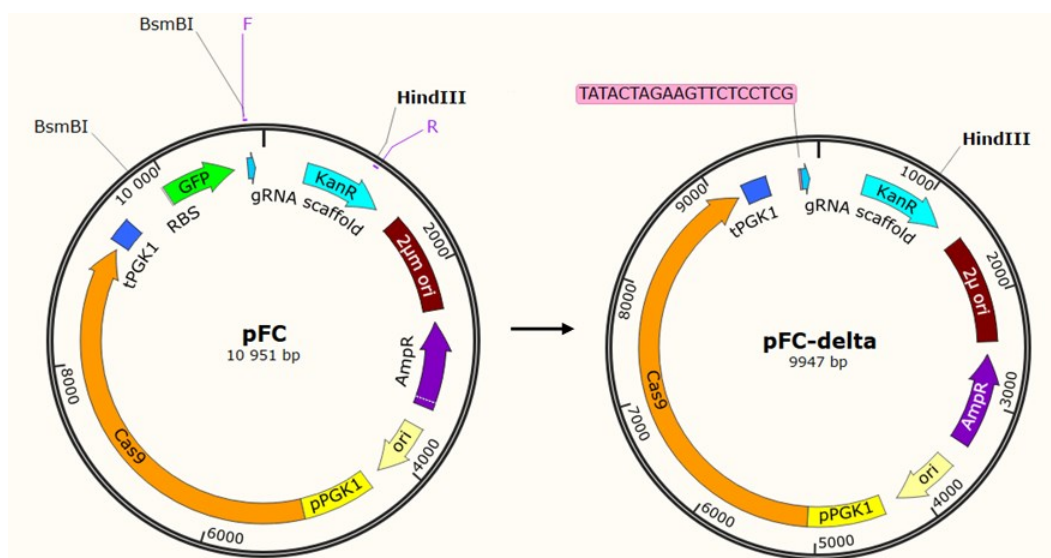


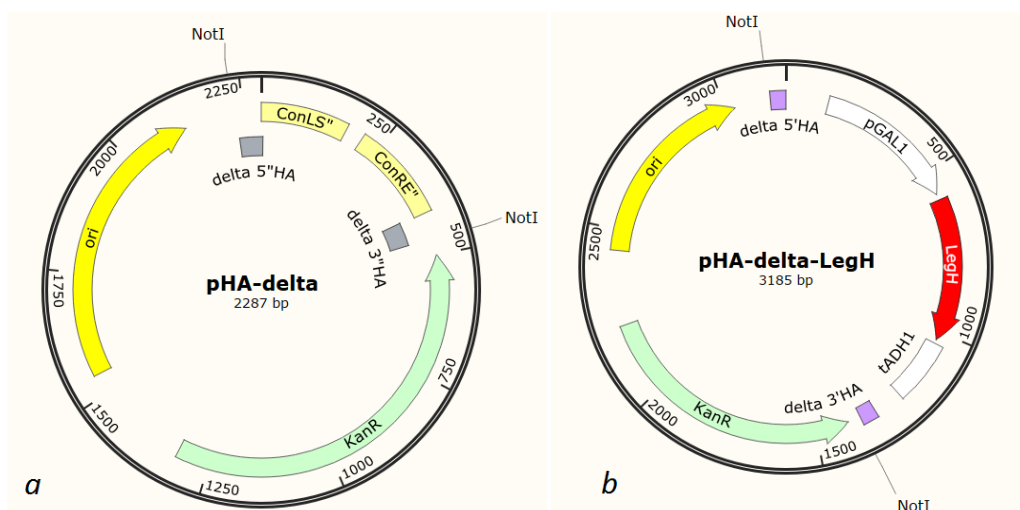
Рис. 1. Створення робочої конструкції рFC-delta.

Донорна ДНК підготовлена у вигляді кільцевої плазмиди рНА-delta. Права та ліва гомологічні плечі було отримано шляхом віджигу наступних олігонуклеотидів:

- Ліве, Forward: P-5'-caattagataattggtgggattccattggtgataaaggctataatattagg-3'
- Ліве, Reverse: P-5'-agggcctaataattatagcctttatcaacaatggaatcccaacaattatcta-3'
- Праве, Forward: P-5'-tacatataggattcctcaaatggaatctatatttctacataactaatattacg-3'
- Праве, Reverse: P-5'-tcggcgtaataattagtagtagaataatagattccattttgaggaatcctata-3'

Отримані після віджигу дволанцюгові фрагменти мають липкі кінці, тому їх одразу було додано в рестрикційно-лігазну суміш з плазмідами Mo-Clo Yeast ToolKit для збірки конструкції рНА-delta (рис.2.а.). Для подальшої роботи було використано кодон оптимізований ген соєвого легемоглобіну і зібрано наступну

плазмиду рНA-delta-LegH (рис.2.b). Після обробки плазмиди рестриктазою *NotI* отримано лінійну донорну ДНК.



**Рис. 2. Схеми конструкцій для підготовки донорної ДНК з гомологічними плечами до дельта-сайтів: а – рНA-delta, початкова конструкція з конекторами, б – рНA-delta-LegH, конструкція з геном легемоглобіну.**

**Висновки.** Створено конструкції для багатокопійної інтеграції цільових генів в дельта послідовності геному *S. cerevisiae*. Правильність збірки перевірено рестрикційним аналізом. Отримані плазмиди будуть використані для створення продуцента легемоглобіну на основі клітин дріжджів.

### Список використаної літератури:

1. Chaudhary R, Nawaz A, Fouillaud M, Dufosse L, Haq I, Mukhtar H. Microbial cell factories: biodiversity, pathway construction, robustness, and industrial applicability. *Microbiol. Res.* 2024 Feb 12;15(1):247-272.
2. Madhavan A, Arun KB, Sindhu R, Krishnamoorthy J, Reshmy R, Sirohi R, Pugazhendhi A, Awasthi MK, Szakacs G, Binod P. Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microb Cell Fact.* 2021 Jun 30;20(1):124.
3. Karim AS, Curran KA, Alper HS. Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Res.* 2013 Feb;13(1):107-16.
4. Shi S, Liang Y, Ang EL, Zhao H. Delta integration CRISPR-Cas (Di-CRISPR) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 2019;1927:73-91.
5. Malci K, Walls L, Rios-Solis L. Multiplex genome engineering methods for yeast cell factory development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020 Oct 29;8:589468.
6. Lee ME, DeLoache WC, Cervantes B, et al. A highly characterized yeast toolkit for modular, multipart assembly. *ACS Synthetic Biology* 2015;4:975–986.
7. Green MR, Sambrook J. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with sodium dodecyl sulfate: Minipreps. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Oct 3;2016(10).
8. Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *Plos One.* 2011;6(2):e16765.
9. Chang AY, Chau VWY, Landas JA, Pang Y. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI meth.* 2017 Jun;1:22-5.
10. Pidkurhanna OH, Zelena LB, Shulga SM. The plasmid construction for *Saccharomyces cerevisiae* genome editing with CRISPR/Cas9. In: *Modern aspects of microbiology, virology, and biotechnology in wartime and post-war period*; November 15-16,2023; Kyiv. Kyiv: D.K. Zabolotny institute of microbiology and virology of the NAS of Ukraine; 2023. p.183-184.