

ISSN 2224-5308

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

# Х А Б А Р Л А Р Ы

---

---

## ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES  
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА  
СЕРИЯСЫ**



**СЕРИЯ  
БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ**



**SERIES  
OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

**3 (315)**

**МАМЫР – МАУСЫМ 2016 ж.  
МАЙ – ИЮНЬ 2016 г.  
MAY – JUNE 2016**

**1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН  
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА  
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963**

**ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ  
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД  
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR**

АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА  
АЛМАТЫ, НАН РК  
ALMATY, NAS RK

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі

**Ж. А. Арзықұлов**

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Айтхожина Н.А.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Байгулин И.О.** (бас редактордың орынбасары); биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Берсімбаев Р.И.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Бишімбаева Н.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Күзденбаева Р.С.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Рахышев А.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ақшолақов С.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Алшынбаев М.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Березин В.Э.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ботабекова Т.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Жамбакин К.Ж.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Қайдарова Д.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Локшин В.Н.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Огарь Н.П.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Рахыпбеков Т.К.**

Р е д а к ц и я к ең е с і:

**Абжанов Архат** (Бостон, АҚШ); **Абелев С.К.** (Мәскеу, Ресей); **Лось Д.А.** (Мәскеу, Ресей); **Бруно Луненфелд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); философия докторы, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Ұлыбритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Ұлыбритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, АҚШ); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, ҚХР)

Главный редактор

академик НАН РК

**Ж. А. Арзыкулов**

Редакционная коллегия:

доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.А. Айтхожина**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **И.О. Байтулин** (заместитель главного редактора); доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Р.И. Берсимбаев**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.К. Бишимбаева**; доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **Р.С. Кузденбаева**, доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **А.Р. Рахисhev**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **С.К. Акшулаков**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.К. Алчинбаев**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Э. Березин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Ботабекова**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **К.Ж. Жамбакин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Д.Р. Кайдарова**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Н. Локшин**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Н.П. Огарь**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Рахыпбеков**

Редакционный совет:

**Абжанов Архат** (Бостон, США); **С.К. Абелев** (Москва, Россия); **Д.А. Лось** (Москва, Россия); **Бруно Луненфельд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); доктор философии, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Великобритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Великобритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, США); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, КНР)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская». ISSN 2224-5308

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,  
[www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz](http://www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz)

---

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2016

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

**Zh.A. Arzykulov**,  
academician of NAS RK

Editorial board:

**N.A. Aitkhozhina**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **I.O. Baitulin**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK (deputy editor); **R.I. Bersimbayev**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **N.K. Bishimbayeva**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **R.S. Kuzdenbayeva**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **A.R. Rakhishev**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **S.K. Akshulakov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **M.K. Alchinbayev**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.E. Berezin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Botabekova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **K.Zh. Zhambakin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **D.R. Kaidarova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.N. Lokshin**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **N.P. Ogar**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Rakhypbekov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK

Editorial staff:

**Abzhanov Arkhat** (Boston, USA); **S.K. Abelev** (Moscow, Russia); **D.A. Los** (Moscow, Russia); **Bruno Lunenfeld** (Israel); **Harun Parlar**, dr., prof. (Munich, Germany); **Stefano Perni**, dr. phylos., prof. (Cardiff, UK); **Saparbayev Murat** (Paris, France); **Saul Purton** (London, UK); **Sarbassov Dos** (Houston, USA); **Gao Endzhun**, dr., prof. (Shenyang, China)

**News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.**  
**ISSN 2224-5308**

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,  
<http://nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz>

---

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2016

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

## NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 315 (2016), 5 – 15

**CONSTRUCTION OF YEAST CHROMOSOME *HO* LOCUS  
ORIENTED INTEGRATIVE EXPRESSION VECTOR****S. M. Taipakova, I. T. Smekenov, A. K. Kuanbay, A. C. Buribaeva, A. K. Bissenbaev\***

Institute of Biology and Biotechnology Problems,  
al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan.  
E-mail: Sabira.Taipakova@kaznu.kz; Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

**Kew words:** *HO* locus, genomic integration, cellobiohydrolase, secretion, *Lentinula edodes*; *Saccharomyces cerevisiae*.

**Abstract.** By means of gene engineering methods the *pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-myc-6His-KanMX4-HO* integral cassette, including cellobiohydrolase *cel7A* gene of *L.edodes* with yeast  $\alpha$ -factor signal peptide, *Myc*- and *His*-tags was assembled. New stable yeast strains carrying *cel7A* gene in genome were developed. Chromosomal integration of *cel7A* gene into *HO* locus of yeast genome was confirmed by PCR. The strain shows continuous expression of *cel7A* and secretion of the protein product into surrounding medium. Presence of *Myc*-tag in the protein allows to monitor the gene expression by western blot with *Myc*-specific antibodies. Moreover, the *His* sequence on C-end of protein can be used for purification by affinity chromatography.

УДК 577.216.3, 577.218

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО  
ЭКСПРЕССИОННОГО ВЕКТОРА,  
НАПРАВЛЕННОГО НА *HO* ЛОКУС ХРОМОСОМЫ ДРОЖЖЕЙ****С. М. Тайпакова, И. Т. Смекенов, А. К. Куанбай, А. С. Бурибаева, А. К. Бисенбаев\***

ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии»  
КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

**Ключевые слова:** *HO* locus; геномная интеграция; секреция, целлюбиогидролаза; *Lentinula edodes*; *Saccharomyces cerevisiae*.

**Аннотация.** С помощью генно-инженерных методов сконструирован *pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-myc-6His-KanMX4-HO* интегральная конструкция, включающий ген целлюбиогидролазы *cel7A* гриба *L. edodes* с сигнальным пептидом  $\alpha$ -фактора дрожжей, *Myc*-эпитопом и гистидиновым хвостом. Созданы новые стабильные штаммы дрожжей с геном целлюбиогидролазы *cel7A* гриба *L. edodes* в хромосоме. Хромосомная интеграция гена целлюбиогидролазы *cel7A* гриба *L. edodes* в *HO* locus генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР. Данный штамм обеспечивает непрерывную экспрессию гена целлюбиогидролазы *cel7A* и секрецию продукта этого гена в окружающую среду. Наличие в составе гена *Myc*-эпитопа позволяет следить за экспрессией гена с помощью иммуноблоттинга с специфическими антителами к *Myc*-эпитопу. Кроме этого, присутствие на С-конце продукта гена последовательности *6xHis*-хвоста позволяет аффинной очистке белкового продукта на основе никель-основанной хроматографии.

В последние годы усилия в области генной инженерии, связанные с созданием дрожжей, в частности, *S.cerevisiae* способных сбраживать целлюлозу, сосредоточились на клонировании генов, кодирующих целлюлаз. Некоторые авторы с использованием эписомальной плазмиды YEp сконструировали рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae* для ферментации целлюлозы [1–5].

Известно, что трансформированные YEr многокопийными автономными векторными ДНК клетки дрожжей содержат до 40 копий плазмид на клетку. Непрерывная экспрессия большого количества чужеродных генов в *S.cerevisiae*, может приводить к истощению энергетических ресурсов и нарушению метаболизма клетки. Кроме этого, данный тип плазмид обычно трудно стабильно поддерживать в клетках и, как правило, с относительно высокой частотой утрачиваются клетками, особенно при отсутствии селективного давления по маркерам плазмид. С практической точки зрения для стабильности белка, а также для предотвращения потери рекомбинантного гена в отсутствие селективного фактора более подходящим является использование интегральных векторов – обеспечивающих внедрение генов в хромосому дрожжей [6]. В связи с этим  $\delta$ -интеграционные векторы были использованы для стабильного повышения числа копий гена-мишени в *S.cerevisiae*. Длинные концевые повторы Ту-элемента, известные как  $\delta$ -последовательность, являются хорошими мишенями для интеграции генов путем гомологичной рекомбинации, так как по всему геному дрожжей содержится приблизительно 425 копий данной последовательности [7]. Векторы для  $\delta$ -интеграции были использованы для экспрессии человеческого фактора роста [8], антикоагулянта-гирудин [9], глюкоамилазы [10]. Относительно недавно были сконструированы рекомбинантные штаммы *S.cerevisiae*, содержащие множество копий генов эндоглюконазы, целлюбиогидролазы и  $\beta$ -глюкозидазы, интегрированные в хромосому посредством интегрального вектора на основе  $\delta$ -последовательности [7,11]. Данный подход значительно увеличил целлюлолитическую активность рекомбинантного штамма. Однако все вышеперечисленные интеграционные векторы содержат ауксотрофные маркерные гены, такие как *LEU2-D*, *HIS3*, *TRP1* и *URA3*. Описанные подходы вынуждают работать с узким кругом хорошо охарактеризованных мутантных штаммов дрожжей. Такие штаммы дрожжей не пригодны для промышленного использования, поскольку в случае промышленных дрожжей не существует внутренних генетических маркеров, таких как потребность в аминокислотах или нуклеиновых кислотах и т.д.

Voth с соавторами [12] сообщили о создании нескольких интегральных дрожжевых векторов, способных включаться в хромосому дрожжей путем генного замещения с использованием участка гомологичной последовательности *HO* гена. Однако интегральные векторы, описанные в данной работе, не содержат промоторы и могут быть использованы только для интеграции генов с собственными промоторами.

*HO* ген кодирует эндонуклеазу, ответственного за превращение дрожжевой клетки в клетку противоположного типа спаривания и инициирует диплоидизацию гаплоидных клеток [13]. Показано что, делеция *HO* локуса не влияет на рост дрожжей и практически все лабораторные и промышленные штаммы *S. cerevisiae* имеют мутации в данном локусе [14, 15].

В настоящей работе конструирован интегральный плазмидный вектор с промотором глицероальдегид-дифосфат дегидрогеназы, сигнальным пептидом  $\alpha$ -фактора дрожжей и гистидиновым тэгом. Показано, что конструированный плазмидный вектор обеспечивает непрерывную экспрессию гена целлюбиогидролазы *cel7A* и секрецию продукта этого гена в окружающую среду. Наличие в составе гена *Мус*-эпитопа позволяет следить за экспрессией гена с помощью иммуноблотинга с специфическими антителами к *Мус*-эпитопу.

### Материалы и методы исследования

**Штаммы и плазмиды.** В ходе работы использовали клеточные линии: DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>),  $\lambda$ -) для наработки плазмидной ДНК и дрожжевой экспрессионный штамм FF18733 (*MATa his7-2 leu2-3,112 lys1-1 trp1-289 ura3-52*) фирмы «Stratagene». Культивирование бактерий *E. coli* проводили при 37°C в полноценной среде LB при необходимости дополненной ампициллином в конечной концентрации 100 мкг/мл. Дрожжи выращивали при 30°C в среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза). Скрининг трансформированных дрожжевых клеток проводили в среде YPD с генетицином (G418) в конечной концентрации 100 мкг/мл.

В данной работе были использованы вектора и плазмиды представленные в таблице 1. Интегральный вектор *pHO-poly-KanMX4-HO* любезно предоставлен профессором Дэвидом Стилманом, университет Юты, США, конститутивный вектор YEPGAr – профессором Х. Кумагай, Киотский университет, Япония.

Таблица 1 – Плазмиды использованные в данной работе

Плазмиды	Особенности	Источник
pMETalphaB	Сигнальный пептид ( $\alpha$ -фактор)	Invitrogen
pBAD/gIII A	Мус-эпитоп, 6xHis*tag	Invitrogen
YEGAp	pGAPDH, tGAPDH	[16]
M4297	Интегральный вектор, KanMX4	[12]
pBAD/gIII A/ $\alpha$ -cel7A	$\alpha$ -cel7A- мус-6xHis*tag	В этой работе
YEPGAp/ $\alpha$ -cel7A	pGAPDH- $\alpha$ -cel7A-мус-6xHis*tag-tGAPDH	В этой работе
pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-мус-6His-KanMX4-HO	Экспрессионный вектор для интеграции в HO локус генома дрожжей	В этой работе

Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma», «Amresco», «Applichem» и «Реахим». А так же в ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (Германия), «New England Biolabs» (Франция), «Fermentas» (Польша), «Promega» (США), «Roche» (США).

**Выделение геномной ДНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.** Инокулят дрожжевых клеток в 5 мл богатой среды YEPD с антибиотиком G418 инкубировали в течение ночи при 30°C. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин и осадок клеток отмывали предворительно охлажденной стерильной dH<sub>2</sub>O. Далее клетки ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (2% Triton X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA) добавили равный объем хлороформ-изоамилового спирта (24:1) и 300 мг стеклянных бусинок, промытых в кислоте и гомогенизировали вортексированием при максимальной скорости в течение 3-4 мин с перерывами каждые 1 мин. Далее к лизату добавляли 200 мкл TE, перемешали и центрифугировали со скоростью 12 000 об/мин при 4°C, 10 минут. Отбирали водную фазу и проводили экстракцию 2,5 объемом охлажденного изопропанола (-20 °C). Плавно перемешивали и инкубировали в морозильной камере в течение 30 минут. Препарат центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 минут. Затем супернатант сливали и осадок, содержащий НК, подсушивали под вакуумом и растворяли в 400 мкл TE с RNase для деградации РНК. Далее содержимое пробирки инкубировали 30 мин при 37 °C. После завершения времени инкубации добавили 10 мкл 4М ацетата аммония, 2,5 объема этанола и помещали на 30 мин в морозильник на -20°C. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 50 мкл dH<sub>2</sub>O.

**Полимеразная цепная реакция.** Для аналитических и препаративных процедур использовали набор PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific # K0172). ПЦР-амплификацию проводили в следующем температурном режиме: денатурация - 94 °C – 1 мин, 30 циклов амплификации при 94 °C – 1 мин, 61°C – 30 сек, 72°C – 30 сек и заключительная элонгация при 72°C – 2 мин, 4°C 10 мин. Для определения эффективности интеграции методом ПЦР использовали специфические праймера (таблица 2).

Таблица 2 – Последовательность праймеров использованных для анализа эффективности интеграции рекомбинантной конструкции

Праймер	Последовательность
Pr-1	5'-GCGTTGTTACCACAACCTCTATGAG-3'
Pr-2	5'-TCTGAAAACACGACTATTCTGATGG-3'
Pr-3	5'-GGAGGCCCCAGAATACCCTCCTTGA-3'
Pr-6	5'-GCGGCCGCCCCGGGATGAGATTTCCTTC-3'
Pr-7	5'-GCGGCCGCTTAATTAAGGATCCTCAATGATGATGATG-3'
Pr-8	5'-CACGCTGCAGCCCAGCAAGCCGGAACA-3'
Pr-9	5'-CACGTCTAGACGCAAAACATTGACTGTAGT-3'

**Экстракция белков и ДСН-ПААГ электрофорез.** Трансформированные клетки культивировали в течение ночи в 20 мл среды YPD, содержащей G418. Затем ночную культуру инокулировали в 1000 мл свежей среды с генетицином (100 мкг/мл) и культивировали при 30°C в течение 3 суток. Клетки собирали центрифугированием в течение 7 мин при 3000 x g. Культуральную жидкость, содержащую секретируемые белки, центрифугировали повторно. Клетки ресуспендировали в 50мМ натрий-фосфатном буфере и лизировали соникированием в течение 20 секунд при мощности 14мА, до получения прозрачного лизата. Клеточный лизат центрифугировали при 14 000 x g в течение 30 мин для удаления клеточных остатков. Супернатант и культуральную жидкость использовали в качестве источника рекомбинантного белка. Содержание белка в образцах определяли по методу Бредфорда [17], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

Разделение белков по молекулярной массе проводили в 12% в денатурирующих условиях с 0,1 % ДСН (додecilсульфат натрия) по методу Laemmli [18]. Гель окрашивали в растворе Кумасси синего R-250.

### Результаты и их обсуждение

Для создания интегрального вектора с промотором глицероальдегид-дифосфат дегидрогеназы, сигнальным пептидом  $\alpha$ -фактора дрожжей и гистидиновым тэгом нами были использованы несколько плазмидных векторов в качестве источников промотора, сигнального пептида, *Muc*-эпитопа и *6xHis*-тэга (таблица 1).

Известно, что для создания векторов секреции активно используют лидерную последовательность  $\alpha$ -фактора. Этот феромон состоит из 13 аминокислот и первоначально синтезируется со структурного гена *MFal* как часть белка-предшественника размером 165 аминокислот. Данный белок на N-конце содержит сигнальный пептид из 19 аминокислот, который расщепляется при секреции препробелка в эндоплазматическом ретикулуме. За сигнальным пептидом следует пропоследовательность длиной 64 аминокислот, имеющая три участка гликозилирования. Точная функция пропоследовательности не выяснена. Предполагают, что она может усиливать секрецию белка в окружающую среду [19, 20]. Поэтому для эффективной секреции клонируемого гена (*cel7A*) мы использовали последовательность нуклеотидов, кодирующий сигнальный пептид из 19 аминокислот и пропоследовательность длиной 64 аминокислот. В общей сложности нами использованный последовательность кодирующий сигнальный пептид  $\alpha$ -фактора дрожжей состояла из 267 п.н. Последовательность, состоящая из шести кодонов аминокислоты гистидина, нами использована для последующей очистки продукта клонируемого гена на основе никель – основанной аффинной хроматографией.

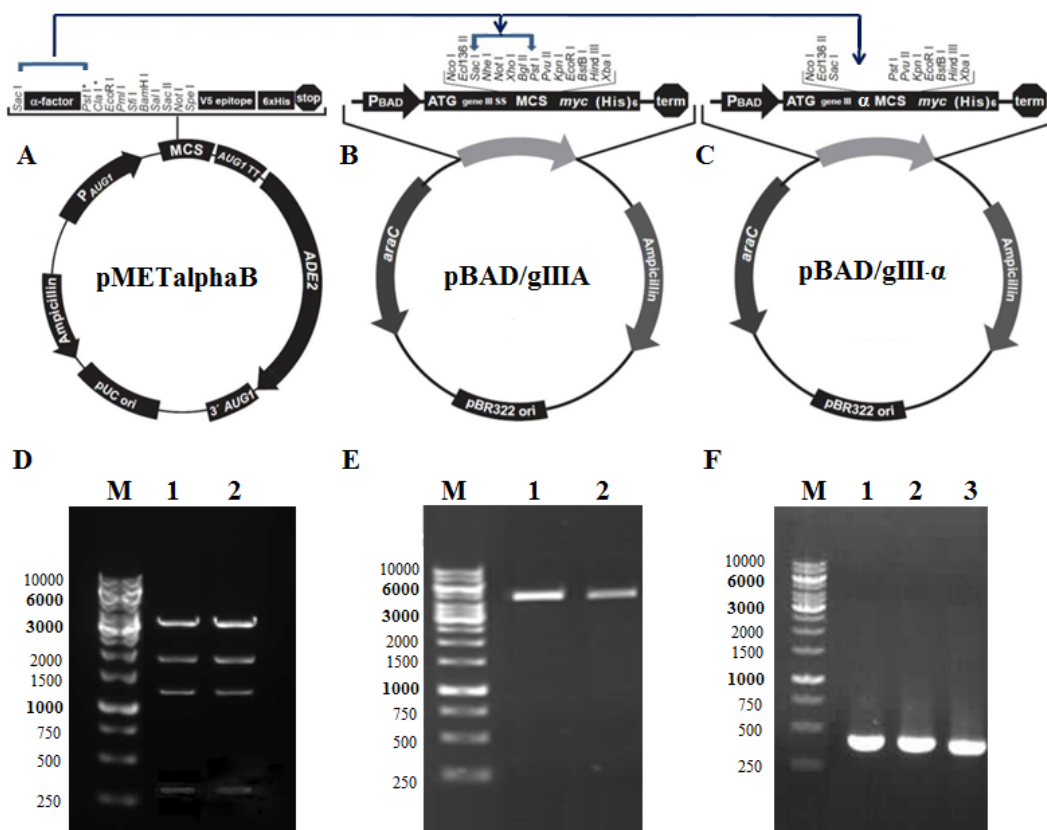
Известно, молекулы ДНК, кодирующие эпитопы, которые распознаются известными антителами, могут быть «привязаны» к известным генам. В результате белковый продукт такого гена будет содержать соответствующий эпитоп, что позволяет следить за этим белком в условиях эксперимента с помощью коммерчески доступных антител к данному эпитопу. Так как продукту нами клонируемого гена нет доступных антител, мы решили использовать *Muc*-эпитоп. *Muc*-эпитоп состоит из 11 аминокислот и имеются коммерчески доступные специфические антитела.

Создание интегрального экспрессионного вектора с сигнальным пептидом  $\alpha$ -фактора дрожжей, *Muc*-эпитопом и гистидиновым хвостом (*6xHis*) проводили в несколько этапов:

Конструировали вектор pBAD, содержащий сигнальный пептид для секреции  $\alpha$ -фактора дрожжей (рисунок 1С). В качестве источника сигнального пептида  $\alpha$ -фактора дрожжей использовали дрожжевой вектор pMETalphaВ (таблица 1, рисунок 1А). Для этого наработанную плазмидный вектор pMETalphaВ обрабатывали ферментами *SacI* и *PstI* (рисунок 1 А и D), полученный фрагмент длиной 267 нуклеотидов лигировали в вектор pBAD/gIIIА, обработанной по тем же сайтам рестрикции (рисунок 1В и E). Продукты лигирования трансформировали в клетки *E.coli* штамма DH5 для наработки плазмиды. Скрининг трансформантов проводили в агаризованной среде LB с ампициллином.

Для анализа плазмид, выделенных с трансформированных клеток, на наличие вставок провели рестрикционный и ПЦР анализ. В результате были отобраны 5 клонов, содержащие рекомбинантную



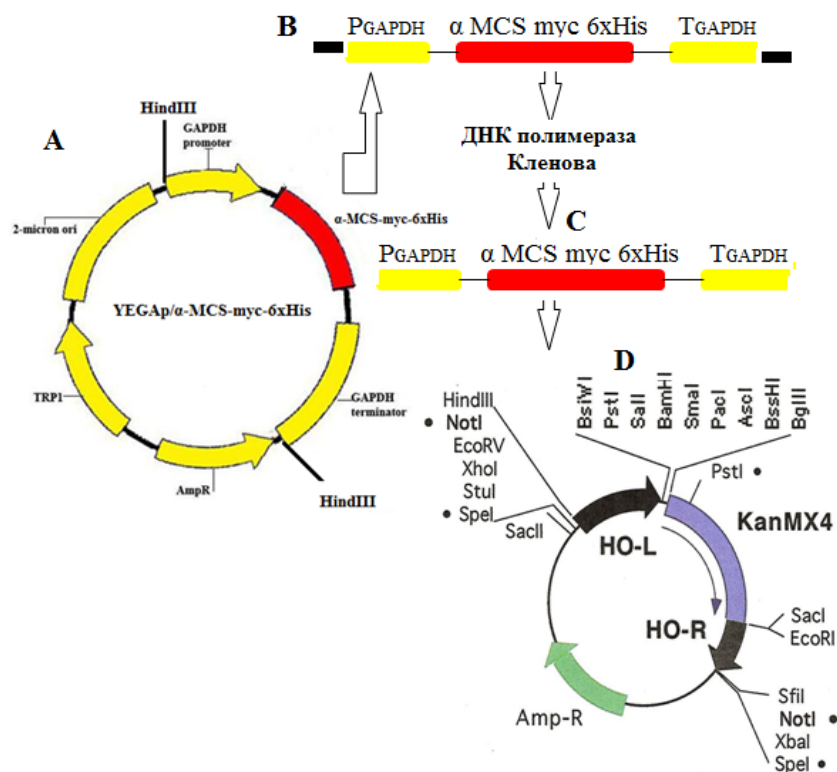


А – карта вектора pMETalphaB. В – карта вектора pBAD/gIII A. С – карта вектора pBAD/gIII-α-MCS-myc-6xHis. D – рестрикция pMETalpha B по *SacI/PstI*. М – ДНК маркер; 1, 2 – продукты рестрикции плазмиды. Е – рестрикция pBADgIII A по *SacI/PstI*. М – ДНК маркер; 1, 2 – продукты рестрикции плазмиды. F – продукт амплификации α-MCS-myc-6xHis кассеты на матрице pBADgIII A/α-MCS-myc-6xHis; М – ДНК маркер; 1–3 – продукты PCR.

Рисунок 1 – Конструирование рекомбинантной плазмиды pBAD/gIII-α-myc-6xHis

плазмиду pBAD/gIII-α-MCS-myc-6xHis (рисунок 1C). Далее полученную рекомбинантную плазмиду pBAD/gIII-α-MCS-myc-6xHis амплифицировали с помощью следующих праймеров: смысловой праймер 5'-Dir- GCGGCCGCCCCGGGATGAGATTTCCCTTC и антисмысловый праймер 5'-Rev- GCGGCCGCTTAAGTAAGGATCCTCAATGATGATGATG. В результате получили фрагмент длиной 404 нуклеотидов (рисунок 1F), состоящий из нуклеотидных последовательностей сигнального пептида, *Мyc*-эпитопа и *6xHis* (α-MCS-myc-6xHis). Продукты ПЦР обработали с помощью *SmaI* и *NotI* для клонирования в вектор YEGAp/*engI*. В результате фрагмент содержал в одном - тупой (*SmaI*), а в другом липкий конец характерный для *NotI*. Перед клонированием α-MCS-myc-6xHis, YEGAp/*engI* обработали ферментом *EcoRI*. Затем 3' – концы наращивали с помощью фрагмента Кленова. После инактивации фрагмента Кленова проводили обработку ферментом *NotI*, что обеспечило соответствие концов плазмидного вектора к концам α-MCS-myc-6xHis фрагмента. Затем клонируемый фрагмент лигировали с YEGAp и получили YEGAp/α-MCS-myc-6xHis констракцию.

В следующем этапе мы приступили к созданию интегрального экспрессионного вектора на основе M4297 платформы. Схема создания интегрального вектора представлена на рисунке 2. Для этого по отдельности платформу M4297 (рисунок 2D, с геном устойчивости к канамицину) и YEGAp/α-MCS-myc-6xHis (рисунок 2A) резали по сайтам рестрикции фермента *HindIII* (рисунок 2B). Затем обработали фрагментом Кленова для получения тупых концов (рисунок 2C). В результате полученный фрагмент длиной около 2700 п.н. лигировали с M4297. В результате была получена плазмиды pHO-GAPDH-α-myc-6xHis-KanMX4-HO экспрессионный вектор с промотором глицеральдегид-дифосфат дегидрогеназы, сигнальным пептидом α-фактора дрожжей и гисти-ДИНОВЫМ ТЭГОМ.



А – YEGAp/ $\alpha$ -MCS-*myc-6xHis* вектор, В – участок YEGAp/ $\alpha$ -MCS-*myc-6xHis* вектора содержащий  $\alpha$ -MCS-*myc-6xHis* с липкими концами, С –  $\alpha$ -MCS-*myc-6xHis* с тупыми концами, D – M4297 платформа.

Рисунок 2 – *pHO-GAPDH- $\alpha$ -myc-6xHis-KanMX4-HO*

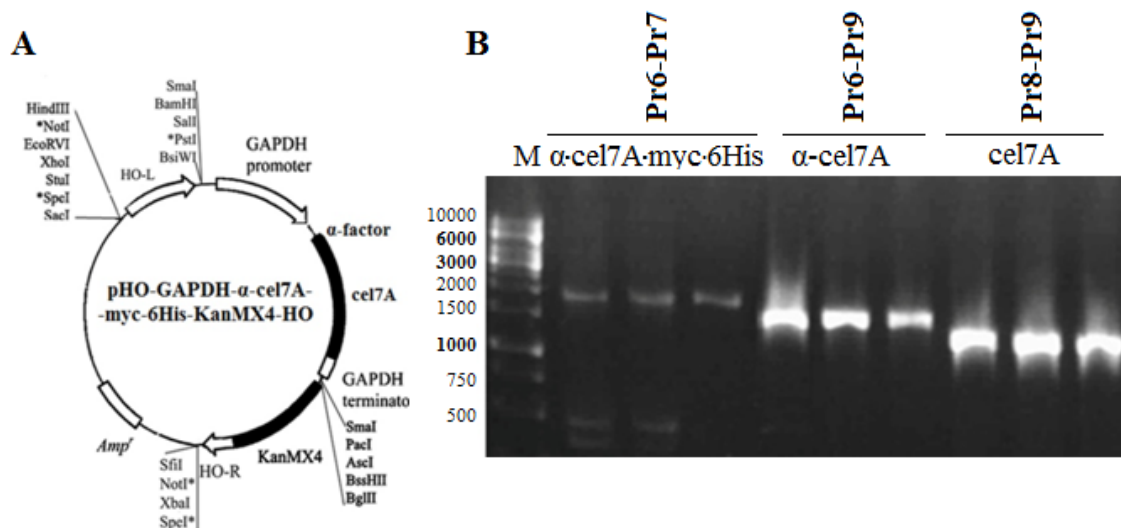
Ранее нами был выделен кДНК ген целлюбиогидролазы *cel7A* гриба *L. edodes* [21]. *CEL7A* – белок длиной 516 аминокислот с молекулярной массой 53,5кДа. По данным компьютерного анализа этот фермент должен секретироваться из клеток гриба, поскольку имеет на N-конце сигнальный пептид, который должен отщепляться между аминокислотами Gly18 и Gln19. Однако наши предыдущие эксперименты показали, что сигнальный пептид *CEL7A* не распознается секреторной системой *S. cerevisiae* [22]. В связи с этим мы решили для эффективной секреции использовать сигнальный пептид дрожжевого полового феромона –  $\alpha$ -фактора дрожжей, которая способствует эффективной секреции рекомбинантного белка в окружающую среду [20].

В связи с этим для клонирования гена *cel7A* в созданную нами *pHO-GAPDH- $\alpha$ -myc-6xHis-KanMX4-HO* конструкцию необходимо с гена этого фермента удалить нативный сигнальный пептид для секреции (20 аминокислот) и стартовый кодон. Поэтому мы учли эти особенности при разработке праймеров для ПЦР амплификации гена *cel7A* *L. edodes*. Амплификацию целлюбиогидролазы *cel7A* на матрице полученной нами ранее плазмиды pET11d/*cel7A* проводили с использованием смыслового праймера 5'-*cel7A-PstI-cacgCTGCAGCCCCAGCAAGCCGGAACA* с сайтом рестрикции *PstI* и антисмыслового праймера 5'-*cel7A-XbaI-cacgTCTAGACGCAAACATTGACTGTAGT* с сайтом рестрикции *XbaI*.

Далее ПЦР продукт размером около 1500 п.н. был обработан ферментами рестрикции *PstI* и *XbaI*. Фрагменты ДНК полученные в результате рестрикции, были разделены электрофорезом в 1% агарозном геле. Фрагмент размером в 1494 п.н. соответствующий длине кДНК гена целлюбиогидролазы *cel7A* без нативного сигнального пептида, был выделен из геля и использована для клонирования в плазмиду *pHO-GAPDH- $\alpha$ -myc-6xHis-KanMX4-HO*, обработанную по тем же сайтам рестрикции. Продукты лигирования трансформировали в клетки *E. coli* штамма DH5 для наработки плазмиды.

Скрининг трансформантов проводили в агаризованной среде LB с ампициллином. В результате были отобраны 7 клонов, содержащие рекомбинантную плазмиду *pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-myc-6xHis-*

KanMX4-*HO*. Схема конструированной нами экспрессионного интегрального вектора с геном *cel7A*, включающий сигнальный пептид феромона –  $\alpha$ -фактора дрожжей, *Мус*-эпитоп и *6xHis* хвост представлена на рисунке 3А. Далее для анализа плазмид выделенных с трансформированных клеток на наличие вставок провели ПЦР анализ (рисунок 3В). При этом для определения правильной ориентации гена *cel7A* по отношению к промотору, сигнальному пептиду и к *мус-6xHis* последовательностям нами разработан набор праймеров (таблица 2, Pr6 - Pr9) для ПЦР анализа.



А – карта *pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-myc-6xHis-KanMX4-HO*. В – ПЦР продукты, полученные на матрице рекомбинантной плазмиды с применением праймеров Pr1-Pr4.

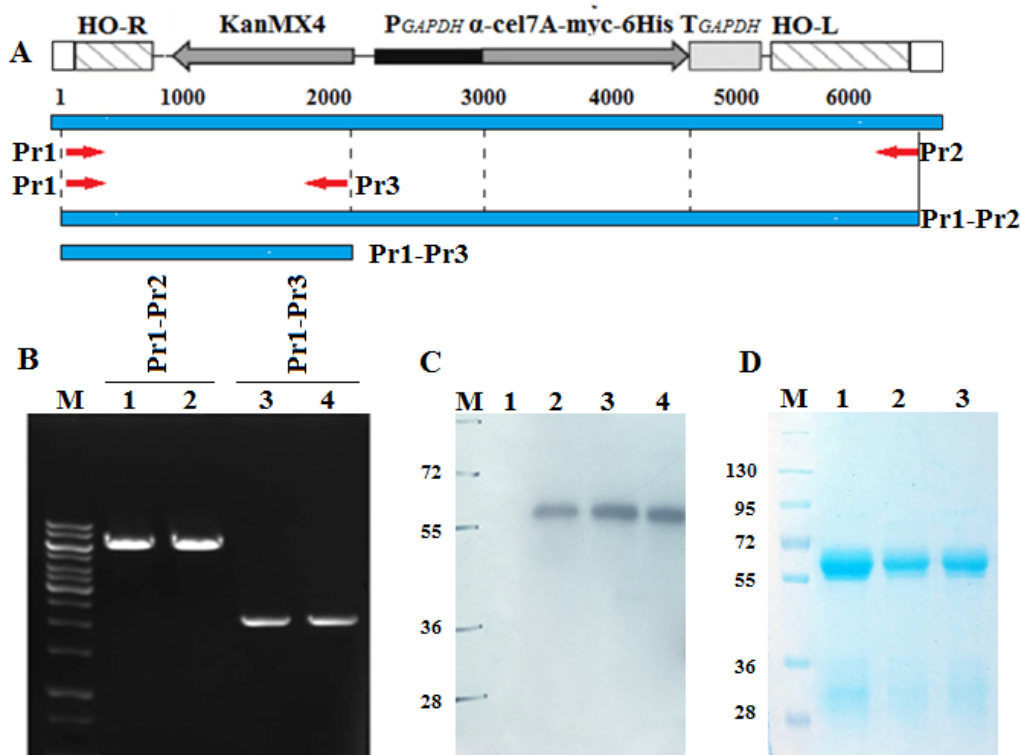
Рисунок 3 – Анализ рекомбинантной *pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-myc-6xHis-KanMX4-HO* на наличие вставки

В результате ПЦР с праймерами Pr6 (комплементарна к 3'-концу последовательности сигнального пептида) и Pr7 (комплементарна к 3'-концу кассеты с *6xHis* хвостом), как ожидалось, амплифицирован фрагмент ДНК размером около 1900 п.н (рисунок 3В). При использовании праймеров Pr6 и Pr9 (Pr 9 – ген специфический антисмысловый праймер *cel7A*) обнаружился только один фрагмент длиной 1800 п.н (рисунок 3В). Наличие гена целлюбиогидролазы *cel7A* гриба *L. edodes* в интегрированной кассете проверяли применением ген-специфических праймеров Pr8 – Pr9 (рисунок 3В). Результаты этих экспериментов подтверждают правильную ориентацию гена *cel7A* по отношению к промотору, сигнальному пептиду и к *мус-6xHis* последовательностям.

В последующих экспериментах полученную рекомбинантную интегральную плазмиду *pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-myc-6xHis-KanMX4-HO* линейаризировали рестрикцией ферментами *EcoRV* и *XbaI* и использовали для трансформации клеток *S. cerevisiae* штамма FF18733. Скрининг трансформантов проводили в агаризованной YPD в присутствии G418. Хромосомная интеграция кассеты с геном  $\alpha$ -*cel7A* в *HO* локус генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР с применением праймеров представленных в таблице 1 и с использованием геномной ДНК рекомбинантных штаммов в качестве матрицы (рисунок 4).

В результате ПЦР с праймерами Pr1 и Pr2, гомологичных к участкам хромосомы фланкирующие *HO* локус, как ожидалось, амплифицирован фрагмент ДНК размером около 6400 п.н. (рисунок 4В, 1-2). При использовании праймеров Pr1 и Pr3 (Pr3 гомологична к участку KanMX4 гена) обнаружился только один фрагмент длиной 2000 п.н (рисунок 4В, 3-4). Результаты этих экспериментов подтверждают эффективную интеграцию кассеты *pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-myc-6xHis-KanMX4-HO* в *HO* локус генома *S.cerevisiae*.

Таким образом, в результате работы был создан вектор интеграции *pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-myc-6xHis-KanMX4-HO*, способный встраиваться в хромосому штамма *Saccharomyces cerevisiae* за счет гомологичной рекомбинации. На основе штамма FF18733 *Saccharomyces cerevisiae* с помощью вектора *pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-myc-6xHis-KanMX4-HO* получен рекомбинантный штамм *S. cerevisiae/pGAPDH- $\alpha$ -cel7A*.



А – линейная форма *pHO-PGAPDH-α-cel7A-KanMX4-HO* кассеты с картой праймеров. В – продукты ПЦР, полученные на матрице геномной ДНК с применением Pr1-Pr3 праймеров.

Рисунок 4 – Эффективность интеграции *pHO-PGAPDH-α-cel7A-myc-6xHis-KanMX4-HO* кассеты в хромосомную ДНК *Saccharomyces cerevisiae*

Как отмечалось выше, данная конструкция должна обеспечивать не только экспрессию рекомбинантного белка, но и секрецию в среду культивирования, а также следить за экспрессией гена с помощью иммуноблоттинга со специфическими антителами к *Мyc*-эпитопу. В связи с этим в последующих экспериментах для доказательства экспрессии рекомбинантного *CEL7A L. edodes* использовали иммуноблоттинг с коммерческими *c-Myc* антителами. Для этого образцы белков клеточного экстракта рекомбинантных клеток *S. cerevisiae/pGAPDH-α-cel7A* фракционировали с помощью ДСН-ПААГЭ и перенесли на PVDF мембрану и инкубировали с *c-Myc* антителами. Иммуноблоттинг выявил мажорную белковую полосу с молекулярной массой незначительно большей, чем рассчитанная молекулярная масса *CEL7A* (рисунок 4С, 2-4). Тогда как белки, полученные из не трансформированных клеток, не содержали белковой полосы с искомой массой (рисунок 4С, 1).

Для анализа секреции и очистки секретируемого рекомбинантного белка культуральную жидкость, отобранную через 72 часа культивирования рекомбинантных клеток *S. Cerevisiae/pGAPDH-α-cel7A*, дополнительно центрифугировали в течение 7 мин при 3000xg для осаждения остаточных клеток, фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм. Далее состав культуральной жидкости уравнивали составом буфера А (20 мМ Tris-HCl, pH 7.6, 500 мМ NaCl, 0.1% NP40 20мМ Имидазол) и загрузили на хелатирующую колонку HiTrap Chelating HP column (Amersham Biosciences, GE Health) заряженную ионами Ni<sup>2+</sup>. Связавшийся белок элюировали буфером, содержащим 500мМ имидазола (pH 8,0). Следует отметить, что все процедуры хроматографической очистки проводили при температуре 0-4°C. На каждом этапе выделения и очистки отбирали алиquotы для электрофоретического анализа белков. Степень очистки полученного белка определяли с помощью гель-электрофореза по Лэммли с последующим окрашиванием раствором Coomassie G-250 (рисунок 4D). Как видно из представленных данных, рекомбинантный белок был очищен до гомогенного состояния с помощью никель-хелатной хроматографии. Однако молекулярная масса очищенной секретируемой целлюлозогидролазы в ДСН-ПААГ превышала расчетную молекулярную массу (53 кДа) фермента. Эти данные указывают на то, что секреторная форма

*CEL7A* в трансформированных дрожжевых клетках представлено формой с более высокой молекулярной массой. Увеличение молекулярной массы свойственно гликозилированным белкам, так как они часто представлены в виде набора различных по молекулярной массе гликоформ, отличающихся длиной и составом олигосахаридных цепей [23].

Таким образом, было показано что рекомбинантный штам *S. cerevisiae*/pGAPDH- $\alpha$ -*cel7A*, полученный с помощью конструированного нами интегрального вектора *pHO-GAPDH- $\alpha$ -cel7A-мус-6xHis-KanMX4-HO* обеспечивает непрерывную экспрессию гена целлюбиогидролазы *cel7A* и секрецию продукта этого гена в окружающую среду. Наличие в составе гена *Мус*-эпитопа позволяет следить за экспрессией гена с помощью иммуноблотинга с специфическими антителами к *Мус*-эпитопу. Кроме этого, присутствие на С-конце продукта гена последовательности *6xHis*-хвоста позволяет аффинной очистке белкового продукта на основе никель-основанной хроматографии.

**Благодарности.** Работа поддержана грантом ГФ4/1324 МОН РК.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda, H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70. – P. 1207-1212.
- [2] Wen F., Sun J., Zhao H. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 76. – P. 1251-1260.
- [3] Den Haan R., Rose S.H., Lynd L.R., Van Zyl W.H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // *Metab. Eng.* – 2007. – Vol. 9. – P. 87-94.
- [4] Tsai S.L., Goyal G., Chen W. Surface display of a functional minicellulosome by intracellular complementation using a synthetic yeast consortium and its application to cellulose hydrolysis and ethanol production // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 76. – P. 7514-7520.
- [5] Fan L.H., Zhang Z.J., Yu X.Y., Xue Y.X., Tan T.W. Self-surface assembly of cellulosomes with two mini scaffolds on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2012. – Vol. 109. – P. 13260-13265.
- [6] Yamada R., Hasunuma T., Kondo A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing // *Biotechnol. Adv.* – 2013. – Vol. 31. – P. 754-763.
- [7] Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Kondo A. Gene copy number and ploidy on products formation in yeast // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 88. – P. 849-857.
- [8] Sakai A., Shimizu Y., Hishinuma F. Integration of heterologous genes into chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1990. – Vol. 3. – P. 302-306.
- [9] Kim M.D., Rhee S.K., Seo J.H. Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal delta-integration // *J. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 85(1). – P. 41-48.
- [10] Kim J.H., Kim H.R., Lim M.H., Ko H.M., Chin J.E., Lee H.B., Kim I.C., Bai S. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase,  $\alpha$ -amylase and debranching enzyme // *Biotechnol. Lett.* – 2010. – Vol. 32. – P. 713-719.
- [11] Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H. Cocktail delta-integration a novel method to construct cellulolytic enzyme expression ratio-optimized yeast strains // *Microb. Cell Fact.* – 2010. – Vol. 9. – P. 32.
- [12] Voth W.P., Richards J.D., Shaw J.M., Stillman D.J. Yeast vectors for integration at the HO locus // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – P. E59-59.
- [13] Bakhrat A., Jurica M.S., Stoddard B.L. and Raveh D. Homology modeling and mutational analysis of Ho endonuclease of yeast // *Genetics.* – 2004. – Vol. 166. – P. 721-728.
- [14] Baganz F., Hayes A., Marren D., Gardner D.C., et al. Suitability of replacement markers for functional analysis studies in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast.* – 1997. – Vol. 13. – P. 1563-1573.
- [15] Walker M.E., Gardner J.M., Vystavelova A., McBryde C., et al. Application of the reusable, KanMX selectable marker to industrial yeast: construction and evaluation of heterothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*, possessing minimal foreign DNA sequences // *FEMS Yeast Res.* – 2003. – Vol. 4. – P. 339-347.
- [16] Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., et al. Cloning of a gene encoding a highly stable endo-1,4- $\beta$ -glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast // *J. Biosci. Bioeng.* – 2001. – Vol. 92. – P. 434-441.
- [17] Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
- [18] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
- [19] Michaelis S., and Herskowitz I., et al. The a-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating // *Mol. Cell Biol.* – 1988. – Vol. 8, N 3. – P. 1309-1318.
- [20] Strazdis J.R., MacKay V.L. Induction of yeast mating pheromone a-factor by alpha cells // *Nature.* – 1983. – Vol. 305, N 5934. – P. 543-545.

[21] Taipakova S.M., Smailov B.B., Stanbekova G.E., Bissenbaev A.K. Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase gene in *E. coli* and characterization of recombinant enzyme // *Journal of Cell and Molecular biology*. – Turkey, 2011. – Vol. 9, N 1. – P. 53-63.

[22] Бисенбаев А.К. Тайпакова С.М. Клонирование и экспрессия кДНК целлюбиогидролазы CEL7A гриба *Lentinula edodes* в про- и эукариотических системах и изучение физико-химических свойств рекомбинантного фермента // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2012. – № 3(291). – С. 39-46.

[23] Kasturi L., Chen H., Shakin-Eshleman S.H. Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 323. – P. 415-419.

## REFERENCES

[1] Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, 70, 1207-1212 (in Eng.).

[2] Wen F., Sun J., Zhao H. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2010**, 76, 1251-1260 (in Eng.).

[3] Den Haan R., Rose S.H., Lynd L.R., Van Zyl W.H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.*, **2007**, 9, 87-94 (in Eng.).

[4] Tsai S.L., Goyal G., Chen W. Surface display of a functional minicellulosome by intracellular complementation using a synthetic yeast consortium and its application to cellulose hydrolysis and ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2010**, 76, 7514-7520 (in Eng.).

[5] Fan L.H., Zhang Z.J., Yu X.Y., Xue Y.X., Tan T.W. Self-surface assembly of cellulosomes with two mini scaffolds on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2012**, 109, 13260-13265 (in Eng.).

[6] Yamada R., Hasunuma T., Kondo A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing. *Biotechnol. Adv.*, **2013**, 31, 754-763 (in Eng.).

[7] Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Kondo A. Gene copy number and polyploidy on products formation in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, 88, 849-857 (in Eng.).

[8] Sakai A., Shimizu Y., Hishinuma F. Integration of heterologous genes into chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1990**, 3, 302-306 (in Eng.).

[9] Kim M.D., Rhee S.K., Seo J.H. Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal delta-integration. *J. Biotechnol.*, **2001**, 85(1), 41-48 (in Eng.).

[10] Kim J.H., Kim H.R., Lim M.H., Ko H.M., Chin J.E., Lee H.B., Kim I.C., Bai S. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase,  $\alpha$ -amylase and debranching enzyme. *Biotechnol. Lett.*, **2010**, 32, 713-719 (in Eng.).

[11] Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H. Cocktail delta-integration: a novel method to construct cellulolytic enzyme expression ratio-optimized yeast strains. *Microb. Cell Fact.*, **2010**, 9, 32 (in Eng.).

[12] Voth W.P., Richards J.D., Shaw J.M., Stillman D.J. Yeast vectors for integration at the *HO* locus. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, 29, E59-59 (in Eng.).

[13] Bakhrat A., Jurica M.S., Stoddard B.L. and Raveh D. Homology modeling and mutational analysis of Ho endonuclease of yeast. *Genetics*, **2004**, 166, 721-728 (in Eng.).

[14] Baganz F., Hayes A., Marren D., Gardner D.C., et al. Suitability of replacement markers for functional analysis studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **1997**, 13, 1563-1573 (in Eng.).

[15] Walker M.E., Gardner J.M., Vystavelova A., McBryde C., et al. Application of the re-useable, KanMX selectable marker to industrial yeast: construction and evaluation of heterothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*, possessing minimal foreign DNA sequences. *FEMS Yeast Res.*, **2003**, 4, 339-347 (in Eng.).

[16] Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., et al. Cloning of a gene encoding a highly stable endo-1,4- $\beta$ -glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, **2001**, 92, 434-441 (in Eng.).

[17] Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248-254 (in Eng.).

[18] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227, 680-685 (in Eng.).

[19] Michaelis S., and Herskowitz I., et al. The a-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating. *Mol. Cell Biol.*, **1988**, 8(3), 1309-1318 (in Eng.).

[20] Strazdis J.R., MacKay V.L. Induction of yeast mating pheromone a-factor by alpha cells. *Nature*, 1983, 305(5934), 543-545 (in Eng.).

[21] Taipakova S.M., Smailov B.B., Stanbekova G.E., Bissenbaev A.K. Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase gene in *E. coli* and characterization of recombinant enzyme. *Journal of Cell and Molecular biology*, Turkey, **2011**, 9(1), 53-63 (in Eng.).

[22] Taipakova S.M., Bissenbaev A.K. Cloning and expression of DNA ce cel7A of mushroom *Lentinula edodes* in the pro-and eukaryotic systems and studying of the physicochemical properties of the recombinant enzyme. *News of the National academy of sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biological and medical*, **2012**, 3(291), 39-46 (In Russ.).

[23] Kasturi L., Chen H., Shakin-Eshleman S.H. Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem. J.*, **1997**, 32, 415-419 (in Eng.).

**АШЫТҚЫЛАР ХРОМОСОМАСЫНЫҢ *HO* ЛОКУСЫНА БАҒЫТТАЛҒАН  
ИНТЕГРАЦИЯЛЫҚ ЭКСПРЕССИЯЛАУШЫ ВЕКТОРДЫ ҚҰРАСТЫРУ****С. М. Тайпақова, И. Т. Сметенов, А. Қ. Қуанбай, А. С. Бурибаева, А. К. Бисенбаев\***ЕМК «Биология және биотехнология мәселелері ғылыми-зерттеу институты»  
аль-Фараби ат. ҚазҰУ, Алматы, Қазақстан**Түйін сөздер:** *HO* локус, геномды интеграция, секреция, целлобиогидролаза, *Lentinula edodes*; *Saccharomyces cerevisiae*.**Аннотация.** Гендік инженерия әдістерінің көмегімен құрамында ашытқылар  $\alpha$ -факторының сигналдық пептиді, Мус-эпитобы және гистидинді құйрығы бар және *L. edodes* саңырауқұлағының *cel7A* целлобиогидролаза гені қосылған рНО-GAPDH- $\alpha$ -*cel7A*-мус-6His-KanMX4-*HO* интегралдық конструкция құрастырылды. Хромосомасында *L. edodes* саңырауқұлағының *cel7A* целлобиогидролаза гені бар ашытқылардың жаңа тұрақты штамдары алынды. *L. edodes* саңырауқұлағының *cel7A* целлобиогидролаза генінің ашытқылар геномының *HO* локусындағы хромосомалық интеграциясы ПЦР әдісімен дәлелденді. Бұл штамм *cel7A* целлобиогидролаза генінің үздіксіз экспрессиясын және ген өнімінің қоршаған ортаға секрециялануын қамтамасыз етеді. Ген құрамындағы мус-эпитоп мус-эпитобына тән антиденелерімен иммуноблотинг жасау арқылы ген экспрессиясын бақылауға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, геннің C-соңында 6xHis-құйрығының болуы белокты өнімді никельге негізделген аффиндік хроматография әдісімен тазартып алуға жағдай туғызады.

Поступила 04.05.2016 г.

## **Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct ([http://publicationethics.org/files/u2/New\\_Code.pdf](http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf)). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

[www.nauka-nanrk.kz](http://www.nauka-nanrk.kz)

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова*  
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 24.05.2016.  
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.  
9,5 п.л. Тираж 300. Заказ 3.