

<https://doi.org/10.17816/ecogen17719>

СЕЛЕКТИВНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ФРАГМЕНТОВ ВИРУСА M1 ДЛЯ ОТБОРА ТРАНСФОРМАНТОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© Д.М. Музаев¹, А.М. Румянцев¹, У.Р. Аль Шанаа^{1,2}, Е.В. Самбук¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия;

² Комиссия по атомной энергии Сирии, Дамаск, Сирия

Для цитирования: Музаев Д.М., Румянцев А.М., Аль Шанаа У.Р., Самбук Е.В. Селективная система на основе фрагментов вируса M1 для отбора трансформантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – № 2. – С. 251–263. <https://doi.org/10.17816/ecogen17719>.

Поступила: 12.11.2019

Одобрена: 25.02.2020

Принята: 23.06.2020

☼ **Цель.** Задачей настоящей работы было получение селективной системы на основе вируса M1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. **Методы.** Для создания штамма-реципиента фрагмент ДНК, кодирующий киллер-токсин вируса M1 под контролем регулируемого промотора гена *GAL1*, был встроен в геном штаммов Y-1236 и Y-2177 *S. cerevisiae*, чувствительных к токсинам. **Результаты.** Интеграция такой экспрессионной кассеты приводит к появлению условной летальности, а именно, данные штаммы гибнут на среде с галактозой, когда происходит синтез киллер-токсина. Для трансформации полученных штаммов используется линейный фрагмент ДНК, содержащий ген интереса, фланкированный последовательностями, гомологичными промотору гена *GAL1* и терминаторной области гена *CYC1*. При трансформации за счет гомологичной рекомбинации происходит выщепление последовательности, кодирующей киллер-токсин, и трансформанты растут на среде с галактозой. **Выводы.** Предложенная селективная система сочетает в себе основные преимущества других систем: возможность применения простых сред без необходимости добавления дорогостоящих антибиотиков и наличие упрощенных методик конструирования экспрессионных кассет и отбора трансформантов.

☼ **Ключевые слова:** дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*; киллер-токсины; вирусы M1 и M28; селективные маркеры.

SELECTIVE SYSTEM BASED ON FRAGMENTS OF THE M1 VIRUS FOR THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* TRANSFORMATION

© D.M. Muzaev¹, A.M. Rumyantsev¹, O.R. Al Shanaa^{1,2}, E.V. Sambuk¹

¹ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;

² Atomic Energy Commission of Syria, Damascus, Syria

Cite this article as: Muzaev DM, Rumyantsev AM, Al Shanaa OR, Sambuk EV. Selective system based on fragments of the M1 virus for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *Ecological genetics*. 2020;18(2):251-263. <https://doi.org/10.17816/ecogen17719>.

Received: 12.11.2019

Revised: 25.02.2020

Accepted: 23.06.2020

☼ **Background.** A selective system based on the M1 virus of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was proposed. **Methods.** To create a recipient strain, a DNA fragment encoding the killer toxin of the M1 virus under the control of the regulated promoter of the *GAL1* gene was inserted into the genome of *S. cerevisiae* strains Y-1236 and Y-2177. **Results.** Integration of such expression cassette leads to the conditional lethality – resulting strains die on a medium with galactose when killer toxin synthesis occurs. A linear DNA fragment containing the gene of interest flanked by sequences homologous to the promoter of the *GAL1* gene and the termination region of the *CYC1* gene is used to transform the obtained strains. During transformation due to homologous recombination, the sequence encoding the killer toxin is cleaved and the transformants grow on a medium with galactose. **Conclusion.** The proposed selective system combines the main advantages of other systems: the use of simple media, without the need to add expensive antibiotics, and a simplified technique for constructing expression cassettes and selecting transformants.

☼ **Keywords:** yeast *Saccharomyces cerevisiae*; killer-toxins; M1 and M28 viruses; selective markers.

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи — гетерогенная группа микроорганизмов, которые в настоящее время привлекают внимание биотехнологов [1, 2]. Они находят применение в биотехнологии, в пищевой [3] и фармацевтической промышленности [4], а также в производстве биотоплива [5].

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются идеальной генетической моделью. Для них разработаны методы генной инженерии, молекулярной биологии, биохимии, выделения и очистки белков [6]. Наличие селективных маркеров и соответствующих штаммов-реципиентов позволяет вводить в геном *S. cerevisiae* необходимые последовательности [7]. Использованию *S. cerevisiae* в биотехнологии способствует их статус GRAS (Generally Recognized As Safe) и устойчивость к низким рН [8]. Генетически модифицированные дрожжевые клетки служат биофабриками для производства целевых продуктов [9]. Одним из недостатков дрожжевых штаммов-продуцентов, используемых в промышленной биотехнологии, является наличие в составе плазмид генов устойчивости к антибиотикам, что может приводить к появлению устойчивых к антибиотикам природных микроорганизмов [10]. Поиск новых селективных маркеров дрожжей, не связанных с антибиотиками, является одной из актуальных задач. В этом отношении перспективным является использование в качестве селективного маркера киллер-токсина (микотоксина) дрожжей.

Впервые микоцины (киллер-факторы) были обнаружены у дрожжей *S. cerevisiae* [11]. Киллер-факторами называют белки, подавляющие рост чувствительных штаммов. Они имеют разнообразное строение и являются либо простыми белками, либо гликопротеинами. Киллер-факторы связываются с рецепторами, расположенными в клеточной стенке чувствительных дрожжей, и приводят к их гибели. Сами дрожжи-киллеры не чувствительны к собственному токсину. Киллерная активность может быть направлена не только против представителей своего вида, но и против широкого спектра эукариотических и прокариотических организмов [12].

Киллер-токсины обнаружены более чем в двадцати родах дрожжей, в частности у таких родов, как *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulasporea*, *Ustilago*, *Williopsis* и др. [13].

Лучше всего механизмы синтеза киллер-токсинов, способы их действия на чувствительные клетки и иммунность клеток-киллеров изучены у дрожжей *S. cerevisiae*. Было показано, что у дрожжей *S. cerevisiae* киллер-токсины синтезируются в клетках при наличии в цитоплазме днРНК-вирусов. Вирусы, обеспечивающие фенотип «киллер», принадлежат семейству *Totiviridae*, классу миковирусов. Один из них, вирус-помощник L-A, обеспечивает синтез оболочки вирусов. Другой, так называемый вирус-сателлит, один из днРНК-вирусов M (M1, M2, M28 или Mlus), кодирует токсин (K1, K2, K28 или K1us) [11]. Для синтеза эффективного киллер-токсина и формирования иммунитета клетки-хозяина необходимы оба вируса.

Синтез и созревание киллер-токсинов K1 и K28 изучены и подробно рассмотрены в статьях и обзорах [14–16]. Токсины синтезируются в виде препептидов в цитоплазме, после чего транспортируются в эндоплазматический ретикулум, где происходит отщепление сигнальной последовательности (пре-), образование дисульфидных связей и гликозилирование. Формирующиеся препептиды попадают в аппарат Гольджи, где происходит отщепление сигнальной последовательности (про-) и удаление γ -субъединицы.

Зрелые киллер-токсины секретируются в среду [17]. Способы их действия на чувствительные клетки различны. Токсин K1 в низких концентрациях запускает механизмы запрограммированной клеточной гибели. Он действует через белок-рецептор киллер-токсина Kge1p, белок кальциевых каналов Tok1p и митохондриальный белок Dnm1p. Это приводит к увеличению уровня активных форм кислорода (ROS) в клетке и инициирует апоптоз. При высоких концентрациях токсин K1 формирует в мембране каналы, что приводит к некрозу клеток [18]. Токсин K28 попадает в клетку за счет эндоцитоза и, двигаясь ретроградно по секреторному пути, направляется в цитоплазму. Здесь происходит его расщепление на α - и β -субъединицы. Субъединица α направляется в ядро, где ее активность блокирует синтез ДНК и деление клеток [19].

В данной работе разработана селективная система для трансформации дрожжей *S. cerevisiae*, где в качестве селективного маркера используется последовательность ДНК киллер-токсина. Применение киллер-токсина в качестве селективного

маркера может способствовать расширению спектра биотехнологически интересных видов дрожжей и позволит получать штаммы-продуценты без применения плазмид, содержащих гены устойчивости к антибиотикам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Праймеры

Все праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Плазмиды

Последовательности вирусов M1 и M28 (Приложение 1), фланкированные сайтами рестрикции BamHI/EcoRI и HindIII/EcoRI, были синтезированы (Eurofins Genomics, Германия) и клонированы в область полилинкера (MCS, multicloning site) вектора pEX-A128 (Eurofins Genomics, Германия). Таким образом, были получены плазмиды pEX-A128-M1, pEX-A128-M28. Последовательности вирусов M1, M28 проверены с помощью секвенирования по методу Сэнгера.

Конструирование плазмид pAL2T-delleu2 и pAL2T-delura3. Используя геномную ДНК штамма Y-1236 *S. cerevisiae* и пары праймеров

ScLEU2-5'-AvrII-F/ScLEU2-5'-AflIII-R и ScLEU2-3'-AflIII-F/ScLEU2-3'-AvrII-R, амплифицировали последовательности, фланкирующие ген *LEU2*. Полученные фрагменты использовали для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами ScLEU2-5'-AvrII-F и ScLEU2-3'-AvrII-R. Фрагмент 5'-3'-*leu2*, содержащий 5'- и 3'-области гена *LEU2*, встраивали в вектор pAL2-T (Евроген) с помощью TA-клонирования. Полученную плазмиду pAL2-T-5'-3'-*leu2* обрабатывали рестриктазой AflIII и дефосфорилировали.

Ранее нами была получена плаزمида pPICZ-FLP (Приложение 2), содержащая ген флиппазы под контролем промотора гена *AOX1*, ген устойчивости к антибиотику зеоцину, а также две последовательности сайтов FRT, разделенных сайтом рестрикции AflIII. Используя праймеры PGAL-SacI-F и PGAL-SalI-R и плазмиду pYES2 (Thermo Fisher Scientific), амплифицировали последовательность промотора гена *GAL1*. Фрагмент обрабатывали рестриктазами SacI и SalI и встраивали в плазмиду pPICZ-FLP вместо промотора гена *AOX1*. Полученную плазмиду pPICZ-P_{GAL1}-FLP обрабатывали рестриктазой AflIII и лигировали с линейаризованной плазмидой

Таблица 1

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название	Последовательность (от 5' к 3')
ScLEU2-5'-AvrII-F	CCTAGGAGTTCGAATCTCTTAGCAACC
ScLEU2-5'-AflIII-R	TCTTAAGACACCTGTAGCATCGATAGC
ScLEU2-3'-AvrII-R	CCTAGGCCAGATCATCGTTATCCAG
ScLEU2-3'-AflIII-F	GTGTCTTAAGAAGTTAAGAAAATCCTTGC
ScURA3-5'-AvrII-F	CCTAGGACATGAACAAACACCAGAGTC
ScURA3-5'-AflIII-R	CCTTAAGAATCAGTCAAGATATCCACATG
ScURA3-3'-AvrII-R	CCTAGGTGGATTGGTTAGATTAGATATGG
ScURA3-3'-AflIII-F	GATTCTTAAGGGATGCTAAGGTAGAGG
PGAL-SacI-F	AAATGAGCTCGATCCACTAGTACGGATTAGAAG
PGAL-SalI-R	AAATGTCGACTTAATATCCCTATAGTGAGTCCG
αTOX-F	AAATAAAGCTTATGGAAGCGCCGTGGTATGACAAGATCTG
αTOX-R	AAATTGAATTCTTAAGCAACGGTAGCGCCATTAGGATCTG
LEU2-dR	ACCTTTGGATCCTCCTTTTCTCCTTCTT
LEU2-dF	GAGGATCCAAAGGAATACAGGTAAGCAAAT
expαTOX-BHI-F	AATAGGATCCGGCGTAACCACCACACC
expαTOX-BHI-R	AATAGGATCCCGCAAATTAAGCCTTTCG
GFP-F	GGACTACTAGCAGCTGTAATACGACTCACTATAGGGAATATGGTGAGCAAGGGC
GFP-R	TCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTACTTGTACAGCTCGTCC

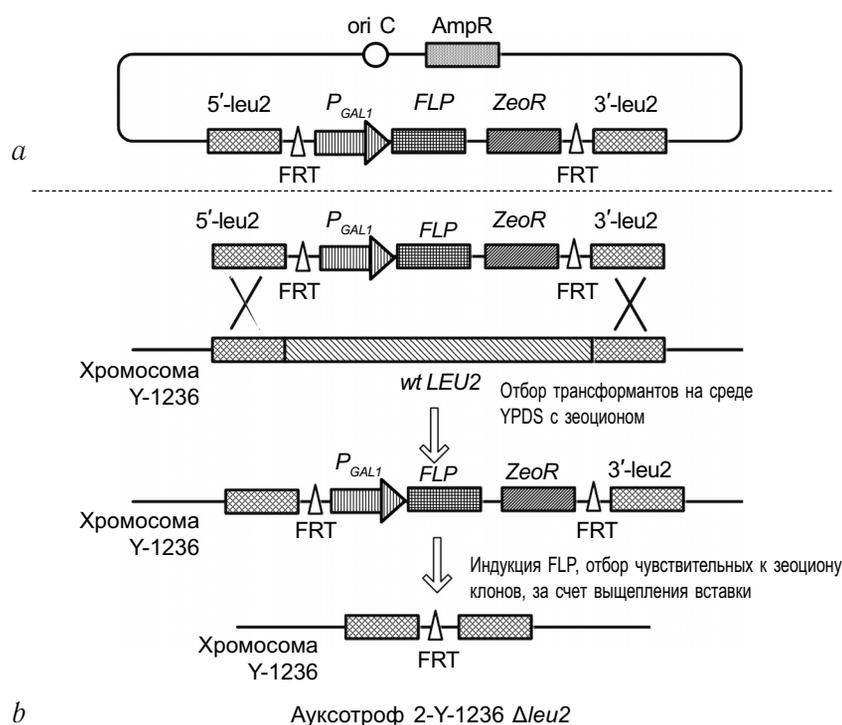


Рис. 1. Схема получения штаммов дрожжей *S. cerevisiae* с делециями в генах *LEU2* и *URA3*: *a* — структура плазмиды pAL2-T-delleu2; *b* — схема получения ауксотрофного штамма 1-Y-1236 ($\Delta leu2$) при помощи системы FLP-FRT рекомбинации (штаммы 2-Y-1236 ($\Delta ura3$), 1-Y-2177 ($\Delta leu2$) и 2-Y-2177 ($\Delta ura3$) получали аналогично). Штаммы с двумя ауксотрофностями по лейцину и урацилу 3-Y-1236 ($\Delta leu2 \Delta ura3$) и 3-Y-2177 ($\Delta leu2 \Delta ura3$) получали путем использования штаммов с одиночной ауксотрофностью в качестве исходных

pAL2-T-5'-3'-leu2. Структура итоговой плазмиды pAL2-T-delleu2 представлена на рис. 1, *a*. Аналогичным образом была получена плазмида pAL2-T-delura3. Для этого использовали пары праймеров ScURA3-5'-AvrII-F/ScURA3-5'-AflIII-R и ScURA3-3'-AflIII-F/ScURA3-3'-AvrII-R. Структуру плазмид проверяли с помощью ПЦП и рестрикционного анализа.

Конструирование плазмид pYES2-M1 и pYES2-M28. В составе плазмиды pEX-A128-M1 фрагмент ДНК-вируса M1 фланкирован сайтами рестрикции BamHI и EcoRI, фрагмент ДНК вируса M28 в плазмиде pEX-A128-M28 — сайтами HindIII и EcoRI. Эти фрагменты были вырезаны и встроены в экспрессирующий вектор pYES2 с использованием соответствующих сайтов рестрикции. В плазмидах pYES2-M1 и pYES2-M28 полноразмерные последовательности ДНК-вирусов оказались под контролем промотора гена *GAL1*, индуцируемого добавлением галактозы в среду.

Конструирование плазмиды pAL2-T-P_{GAL1}- α TOX. Амплифицировали последовательности ДНК гена *LEU2*, используя пары праймеров ScLEU2-5'-AvrII-F/LEU2-dR и LEU2-dF/ScLEU2-3'-AvrII-R

и хромосомную ДНК штамма Y-1236 *S. cerevisiae* в качестве матрицы. Полученные фрагменты очищали и их смесь использовали для проведения ПЦП с праймерами ScLEU2-5'-AvrII-F и ScLEU2-3'-AvrII-R. Итоговый фрагмент встраивали в вектор pAL2-T (Евроген) с помощью ТА-клонирования. В результате была получена плазмида pAL2-T-LEU2, содержащая полноразмерный ген *LEU2*, в 3'-область которого был внесен сайт рестрикции BamHI. Плазмиду pEX-A128-M1 использовали в качестве матрицы для амплификации последовательности ДНК гена токсина M1 с праймерами α TOX-F и α TOX-R. Фрагмент был обработан рестриктазами HindIII и EcoRI и встроен в вектор pYES2. Плазмида pYES2- α TOX была использована в качестве матрицы для проведения ПЦП с праймерами exr α TOX-BNI-F и exr α TOX-BNI-R. Полученный фрагмент обрабатывали рестриктазой BamHI и встраивали в плазмиду pAL2-T-LEU2. Итоговая плазмида pAL2-T-P_{GAL1}- α TOX содержала последовательность ДНК токсина вируса M1 под контролем промотора гена *GAL1*, встроенную в 3'-область гена *LEU2* (рис. 2, *b*).

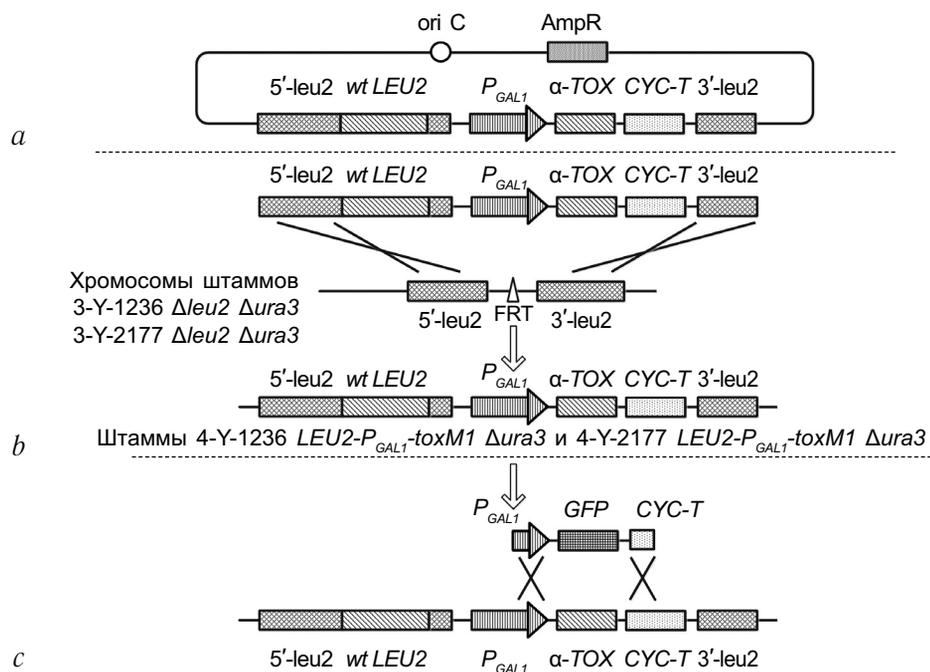


Рис. 2. Схема интеграции последовательности токсина вируса M1 в геном штаммов дрожжей *S. cerevisiae* и ее применения в качестве селективного маркера: *a* — структура плазмиды pAL2-T- P_{GAL1} - α -TOX; *b* — схема получения штаммов 4-Y-1236 ($LEU2-P_{GAL1}$ - $toxM1 \Delta ura3$) и 4-Y-2177 ($LEU2-P_{GAL1}$ - $toxM1 \Delta ura3$), в геном которых была интегрирована последовательность ДНК-токсина вируса M1 под контролем регулируемого промотора гена *GAL1*; *c* — схема интеграции гена *GFP*, фланкированного последовательностями, гомологичными промотору гена *GAL1* и терминаторной области гена *CYC1*

Штаммы

Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в данной работе, представлены в табл. 2. Также был использован штамм бактерий *Escherichia coli* DH5 α (*fhuA2 \Delta(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 \Phi80\Delta(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*).

Среды и условия культивирования. Для культивирования штаммов дрожжей использовали сле-

дующие среды. YEPD: 2 % глюкоза, 2 % пептон, 1 % дрожжевой экстракт, 2,4 % агар. YEPDS: 2 % глюкоза, 2 % пептон, 1 % дрожжевой экстракт, 2,4 % агар, 1M сорбитол, зеоцин 200 мкг/мл. MD и MGal (минимальные среды): 7,34 мМ KH_2PO_4 , 0,95 мМ $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 4 мМ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,9 мМ $CaCl_2$, 1,7 мМ NaCl, 37,85 мМ $(NH_4)_2SO_4$; витамины, микроэлементы; 2 % — глюкоза (MD) или галактоза (MGal), 2,4 % агар, аминокислоты

Таблица 2

Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в работе

Название	Генотип	Источник
Y-1236	<i>MATa wt</i>	ВКПМ
1-Y-1236	<i>MATa \Delta leu2</i>	Данная работа
2-Y-1236	<i>MATa \Delta ura3</i>	Данная работа
3-Y-1236	<i>MATa \Delta leu2 \Delta ura3</i>	Данная работа
Y-2177	<i>MATa wt</i>	ВКПМ
1-Y-2177	<i>MATa \Delta leu2</i>	Данная работа
2-Y-2177	<i>MATa \Delta ura3</i>	Данная работа
3-Y-2177	<i>MATa \Delta leu2 \Delta ura3</i>	Данная работа
4-Y-1236	<i>MATa LEU2-P_{GAL1}-toxM1 \Delta ura3</i>	Данная работа
4-Y-2177	<i>MATa LEU2-P_{GAL1}-toxM1 \Delta ura3</i>	Данная работа

и азотистые основания (если необходимо): лейцин, урацил — 40 мг/л. Для культивирования бактерий использовали среду LB: 1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 170 мМ NaCl, бензилпенициллин — $5 \cdot 10^5$ е.а./л. Штаммы *S. cerevisiae* выращивали при температуре 30 °С, *E. coli* — при 37 °С.

Методы молекулярной генетики

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции и фосфатазу FastAP (Thermo Fisher scientific Inc., США), T 4-лигазу (Евроген, Россия), согласно рекомендациям производителей. Очистку ДНК из агарозных гелей и реакционных смесей проводили с помощью наборов Cleanup Standard (Евроген, Россия). Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью наборов Plasmid Miniprep (Евроген, Россия). Для проведения ПЦР использовали наборы реактивов Encyclo Plus PCR (Евроген, Россия). Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 0,7 % агарозном геле в буфере TAE [20]. Трансформацию бактерий *E. coli* и дрожжей — согласно [21, 22]. Выделение хромосомной ДНК из дрожжей *S. cerevisiae* — по методике [23]. Секвенирование ДНК — с использованием BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение штаммов 3-Y-1236 и 3-Y-2177 с делециями кодирующих последовательностей генов *LEU2* и *URA3*

В качестве исходных были использованы прототрофные штаммы *S. cerevisiae* Y-2177 и Y-1236 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), сверхчувствительные к киллер-токсинам. На первом этапе у штаммов Y-2177 и Y-1236 получали одиночные делеции в генах *URA3* и *LEU2* соответственно. Для этого использовали плазмиды pAL2T-delura3 и pAL2T-delleu2.

Фрагмент 5'LEU2-FRT-P_{GAL1}-FLP-ZeoR-FRT-3'LEU2 амплифицировали с помощью праймеров ScLEU2-5'-AvrII-F и ScLEU2-3'-AvrII-R, используя плазмиду pAL2T-delleu2 в качестве матрицы. Фрагмент очищали и трансформировали штаммы Y-1236 и Y-2177. Селекцию трансформантов проводили на среде YEPDS с антибиотиком зеоцином. В ходе трансформации за счет гомологичной рекомби-

нации происходила замена кодирующей последовательности гена *LEU2* на кассету FRT-P_{GAL1}-FLP-ZeoR-FRT. На следующем этапе культуры полученных трансформантов инкубировали в течение 24 ч в жидкой среде с галактозой (MGal). В клетках происходил синтез флиппазы, которая вносит двунитевые разрывы в последовательности FRT. В результате происходило удаление кассеты FRT-P_{GAL1}-FLP-ZeoR-FRT из генома трансформантов. Клетки были высеяны на среду YEPD, после чего с помощью метода отпечатков среди полученных колоний были отобраны те, которые из-за удаления кассеты не росли на среде YEPDS с зеоцином. Полученные штаммы 1-Y-1236 ($\Delta leu2$) и 1-Y-2177 ($\Delta leu2$) не росли на среде MD без добавления лейцина, что свидетельствует об их ауксотрофности. Схема экспериментов приведена на рис. 1, b.

Аналогичным образом с использованием плазмиды pAL2T-delura3 были получены штаммы 2-Y-1236 ($\Delta ura3$) и 2-Y-2177 ($\Delta ura3$) ауксотрофные по урацилу. Далее были получены штаммы 3-Y-1236 ($\Delta leu2 \Delta ura3$) и 3-Y-2177 ($\Delta leu2 \Delta ura3$) с двумя ауксотрофностями. Наличие делеций подтверждали с помощью метода ПЦР, используя в качестве матрицы хромосомную ДНК штаммов 3-Y-1236, 3-Y-2177 и исходных штаммов Y-1236, Y-2177 в качестве контроля, и пары праймеров ScLEU2-5'-AvrII-F/ScLEU2-3'-AvrII-R и ScURA3-5'-AvrII-F/ScURA3-3'-AvrII-R.

Экспрессия полноразмерных вирусных геномов M1 и M28 в штаммах 3-Y-1236 и 3-Y-2177

Векторы pYES2-M1 и pYES2-M28 использовали для трансформации штаммов 3-Y-1236 ($\Delta leu2 \Delta ura3$) и 3-Y-2177 ($\Delta leu2 \Delta ura3$). Трансформанты отбирали по прототрофности по урацилу и анализировали появление киллерного эффекта. Для этого трансформанты этих штаммов 3-Y-1236 ($\Delta leu2$ pYES2-M1), 3-Y-1236 ($\Delta leu2$ pYES2-M28), 3-Y-2177 ($\Delta leu2$ pYES2-M1) и 3-Y-2177 ($\Delta leu2$ pYES2-M28) высевали на среды MGal, содержащие галактозу в качестве единственного источника углерода, на газоны контрольных штаммов, содержащих исходную плазмиду pYES2: 3-Y-1236 ($\Delta leu2$ pYES2) и 3-Y-2177 ($\Delta leu2$ pYES2).

На среде с галактозой происходит синтез киллерного белка, что приводит к подавлению роста

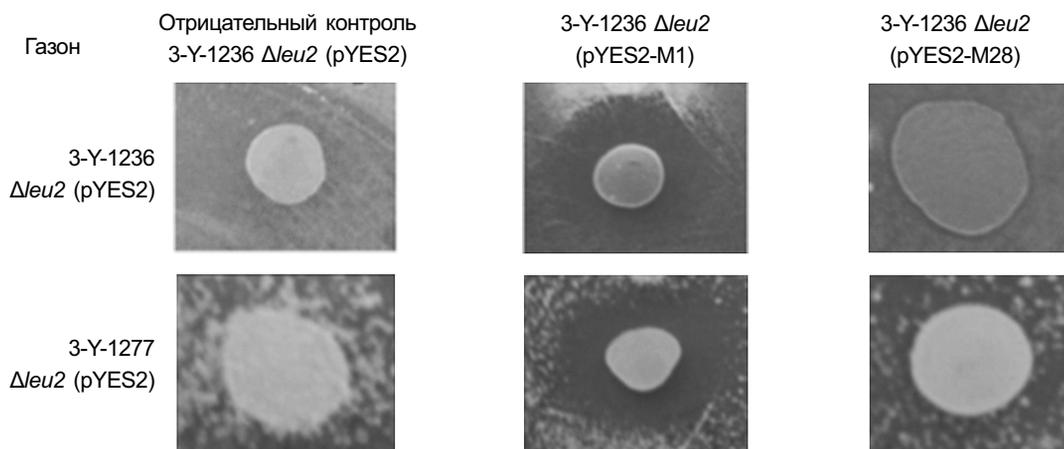


Рис. 3. Фенотипы штаммов 3-Y-1236 ($\Delta leu2$ pYES2-M1) и 3-Y-1236 ($\Delta leu2$ pYES2-M28) на среде с газонами контрольных штаммов 3-Y-1236 ($\Delta leu2$ pYES2) и 3-Y-2177 ($\Delta leu2$ pYES2). Зона подавления возникает в результате действия киллер-токсинов

чувствительных штаммов и формированию зоны лизиса. Результаты приведены на рис. 3. Экспрессия полноразмерных вирусных геномов не влияла на рост самих штаммов 3-Y-1236 ($\Delta leu2$ pYES2-M1), 3-Y-1236 ($\Delta leu2$ pYES2-M28), 3-Y-2177 ($\Delta leu2$ pYES2-M1) и 3-Y-2177 ($\Delta leu2$ pYES2-M28), так как они обеспечивают устойчивость к собственной токсину [11].

Наиболее выраженный киллерный эффект проявился у штамма 3-Y-1236 ($\Delta leu2$ pYES2-M1), синтезирующего вирус M1. Поэтому далее для создания селективной системы был выбран именно токсин M1.

Использование последовательности токсина вируса M1 в качестве селективного маркера

Использованный ранее фрагмент ДНК (αTOX 315 п. н.) киллер-вируса M1, который отвечает за синтез токсина [24], амплифицировали с помощью праймеров αTOX -F и αTOX -R. Получили плазмиду pAL2-T- P_{GAL1} - αTOX , содержащую один из фрагментов вируса M1 (αTOX) под контролем промотора гена *GAL1*. Используя эту плазмиду в качестве матрицы, с помощью праймеров ScLEU2-5'-AvrII-F и ScLEU2-3'-AvrII-R амплифицировали фрагмент 5'LEU2- P_{GAL1} - αTOX -3'LEU2. Данным фрагментом трансформировали штаммы 3-Y-1236 и 3-Y-2177. Трансформантов отбирали по восстановлению прототрофности по лейцину. Схема эксперимента представлена на рис. 2, b. Полученные таким образом штаммы 4-Y-1236 ($LEU2$ - P_{GAL1} - $toxM1 \Delta ura3$) и 4-Y-2177 ($LEU2$ - P_{GAL1} - $toxM1 \Delta ura3$) характеризуются условной

летальностью — они не растут на средах с галактозой, поскольку в этих условиях в их клетках происходит синтез токсина (рис. 4). Наличие интеграций проверяли с помощью метода ПЦР, используя пару праймеров αTOX -F/ αTOX -R и геномную ДНК трансформантов 4-Y-1236 и 4-Y-2177 в качестве матрицы. В случае штамма 4-Y-1236 на среде с глюкозой наблюдали незначительное подавление роста, что может быть связано с особенностями регуляции глюкозной репрессии у данного штамма. Для дальнейшей работы использовали штамм 4-Y-2177.

Так как на среде с галактозой в результате синтеза токсина происходит подавление роста штамма

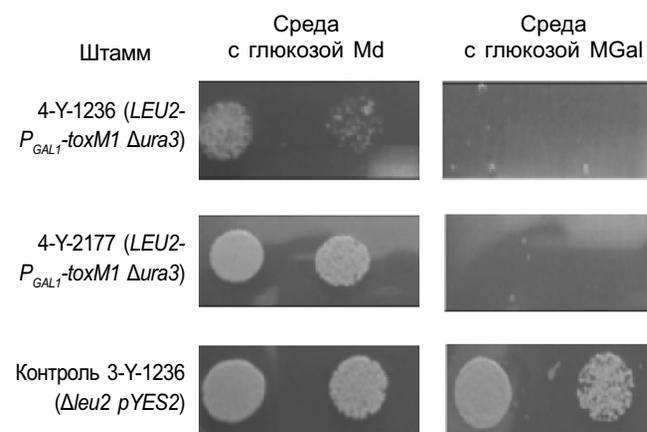


Рис. 4. Рост штаммов 4-Y-1236 ($LEU2$ - P_{GAL1} - $toxM1 \Delta ura3$) и 4-Y-2177 ($LEU2$ - P_{GAL1} - $toxM1 \Delta ura3$), в геномы которых была интегрирована последовательность ДНК токсина вируса M1 под контролем регулируемого промотора гена *GAL1*, на средах с глюкозой и галактозой. Штаммы характеризуются условной летальностью — они не растут на средах с галактозой, поскольку в этих условиях в их клетках происходит синтез токсина. Высевали по 10 мкл суспензии 10^4 и 10^3 кл/мл

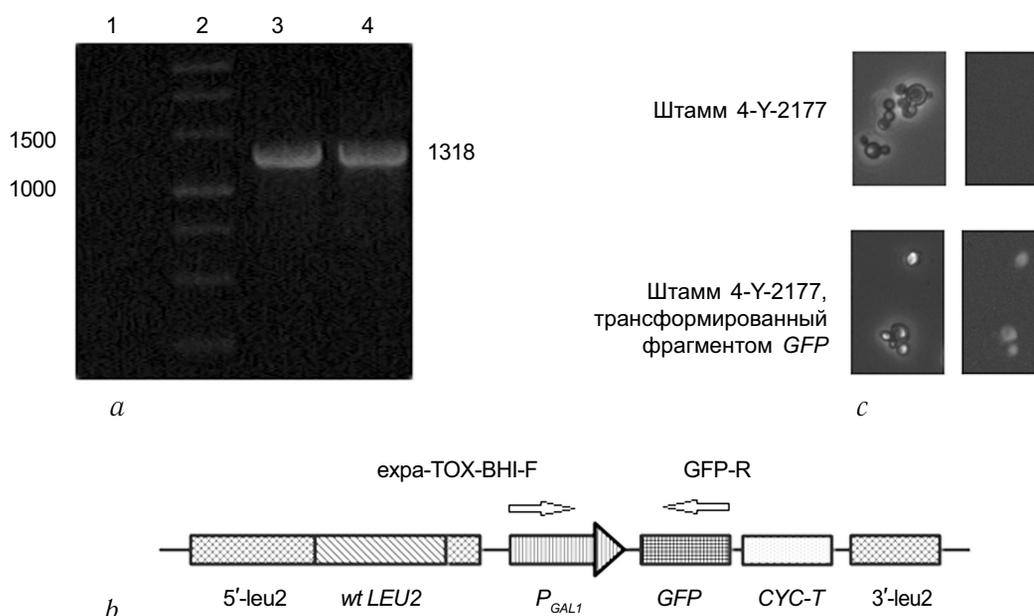


Рис. 5. Проверка наличия интеграции гена *GFP* в геном трансформантов: *a* — результаты ПЦР с праймерами *extraTOX-BHI-F* и *GFP-R* и геномной ДНК штаммов: 1) 4-У-2177; 3) 4-У-2177 с интеграцией гена *GFP*, клон 1; 4) 4-У-2177 с интеграцией гена *GFP*, клон 2. Размеры фрагментов соответствуют теоретически ожидаемому — 1343 п. о.; 2) маркер длин ДНК 1 kb (Евроген). *b* — схема расположения праймеров *extraTOX-BHI-F* и *GFP-R*; *c* — флуоресценция клеток исходного штамма 4-У-2177 и штамма, трансформированного фрагментом *GFP* (клон 2)

4-У-2177, следовательно ген токсина может быть использован в качестве селективного маркера. Для оценки возможности использования этого подхода при отборе трансформантов амплифицировали последовательность гена флуоресцентного белка *GFP*. Для этого использовали праймеры *GFP-F* и *GFP-R*, которые содержали на 5'-концах последовательности, гомологичные промотору гена *GAL1* и терминаторной области гена *CYC1*. Полученный фрагмент очищали и использовали для трансформации штамма 4-У-2177. Селекцию трансформантов проводили на среде *MGal* с галактозой. В ходе трансформации за счет гомологичной рекомбинации происходила замена последовательности, кодирующей киллер-токсин, на последовательность гена *GFP* (рис. 2, *c*). Полученные трансформанты способны расти на среде *MGal* с галактозой, что свидетельствует о замене последовательности токсина на последовательность гена *GFP*. Наличие интеграции гена *GFP* в геном трансформантов подтвердили с помощью ПЦР с праймерами *extraTOX-BHI-F* и *GFP-R*, а также с помощью метода флуоресцентной микроскопии (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Дрожжи *S. cerevisiae* широко используются в биотехнологических процессах. Созданию штам-

мов-производителей, используемых в промышленном производстве, способствуют разнообразие методик трансформации дрожжей и доступность удобных систем селекции.

При конструировании плазмид для работы с *S. cerevisiae* используются гены *URA3*, *LEU2*, *HIS3*, *TRP1* и другие гены, кодирующие различные ферменты метаболических путей дрожжей. Мутации в этих генах приводят к ауксотрофности по соответствующим аминокислотам или азотистым основаниям [25]. Плазмиды, используемые для получения штаммов-производителей, как правило, содержат бактериальные гены устойчивости к антибиотикам. Это позволяет успешно амплифицировать плазмиды в штаммах *E. coli* [26]. Также гены устойчивости к антибиотикам, например зеоцину, используются непосредственно для селекции дрожжевых трансформантов [27].

Однако в процессе создания штаммов-производителей наличие генов устойчивости к антибиотикам в плаزمиде является проблемой. Использование антибиотиков для поддержания плазмид не рекомендуется при синтезе рекомбинантных белков для фармацевтического производства. Это связано с риском загрязнения антибиотиками конечных продуктов и попаданием ДНК, кодирую-

шей устойчивостью к антибиотикам, в окружающую среду [28, 29].

В связи с этим у бактерий, например, предпринимаются попытки замены генов устойчивости к антибиотикам в плаزمиде на ген *lgt*, кодирующий (про)липопротеин глицерилтрансферазу. Этот фермент у бактерий участвует в биосинтезе бактериального липопротеина, и делеция этого гена летальна. Разработана система для получения продуцентов рекомбинантных белков, в которой ген *lgt* в хромосоме бактерий делетирован и интегрирован в плазмиду вместе с целевым геном. Потеря плазмиды приводит к гибели клеток [30].

В настоящей работе в качестве селективного маркера впервые использован киллер-токсин дрожжей M1. Это позволяет при создании штаммов-продуцентов обойтись без последовательностей, приводящих к устойчивости к антибиотикам.

Данная система селекции предполагает, что в качестве штамма-реципиента должен быть использован штамм, чувствительный к киллер-токсину.

На первом этапе в случае прототрофности штаммов в их геном вводятся делеции генов *URA3* и *LEU2*. Затем в геном штаммов интегрируется конструкция, содержащая последовательность ДНК токсина вируса M1 под контролем регулируемого промотора гена *GAL1*. Для получения штамма-продуцента необходимо трансформировать штамм-реципиент амплифицированной кодирующей последовательностью гена интереса, которая фланкирована промотором гена *GAL1* и терминатором гена *CYC1*. За счет гомологичной рекомбинации на среде с галактозой происходит замещение гена, кодирующего токсин, и производится отбор целевых трансформантов. При этом ген интереса окажется в составе генома трансформированного штамма под контролем промотора гена *GAL1*, что обеспечит его регулируемую экспрессию. Такой подход может быть использован для экспрессии рекомбинантных белков. Он способствует уменьшению распространения генов, кодирующих устойчивость к антибиотикам, уменьшая выброс антибиотиков в окружающую среду и освобождая конечные продукты (часто используемые в фармацевтике) от загрязнения потенциально вредными остатками антибиотиков. Кроме того, предложенная селективная система

может быть использована как один из подходов к решению проблемы нехватки удобных селективных маркеров, возникающей при работе с новыми штаммами дрожжей.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект № 18-04-01057).

ЛИТЕРАТУРА

1. Varela C. The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(23):9861-9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>.
2. Tofalo R, Fusco V, Böhnlein C, et al. The life and times of yeasts in traditional food fermentations. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;26:1-30. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1677553>.
3. Thim L, Hansen MT, Norris K, et al. Secretion and processing of insulin precursors in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(18):6766-6770. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.18.6766>.
4. Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered.* 2013;4(4):207-211. <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>.
5. Jin YS, Cate JH. Metabolic engineering of yeast for lignocellulosic biofuel production. *Curr Opin Chem Biol.* 2017;41:99-106. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.025>.
6. Duina AA, Miller ME, Keeney JB. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces Cerevisiae* model system. *Genetics.* 2014;197(1):33-48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>.
7. Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1989;122(1):19-27.
8. Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40(3-4):257-274. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0>.
9. Падкина М.В., Самбук Е.В. Генетически модифицированные микроорганизмы-продуценты биологически активных соединений // Экологическая генетика. — 2015. — Т. 13. —

- № 2. — С. 36–57. [Padkina MV, Sambuk EV. Genetically modified microorganisms as producers of biologically active compounds. *Ecological genetics*. 2015;13(2):36-57. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen13236-57>.
10. Землянюк О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам // Экологическая генетика. — 2018. — Т. 16. — № 3. — С. 4–17. [Zemlyanko OM, Rogoza TM, Zhouravleva GA. Mechanisms of bacterial multiresistance to antibiotics. *Ecological genetics*. 2018;16(3):4-17. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen1634-17>.
 11. Magliani W, Conti S, Gerloni M, et al. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(3):369-400. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.3.369>.
 12. Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol*. 2012;3:421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>.
 13. Belda I, Ruiz J, Alonso A, et al. The biology of pichia membranifaciens killer toxins. *Toxins (Basel)*. 2017;9(4). pii: E112. <https://doi.org/10.3390/toxins9040112>.
 14. Zhu H, Bussey H. Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. *Mol Cell Biol*. 1991;11(1):175-181. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.1.175>.
 15. Schmitt MJ, Tipper DJ. Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology*. 1995;213(2):341-351. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0007>.
 16. Самбук Е.В., Музаев Д.М., Румянцев А.М., Падкина М.В. Киллер-токсины дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: синтез, механизмы действия и практическое использование // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 3. — С. 59–73. [Sambuk EV, Muzaev DM, Rumjanzev AM, Padkina MV. *Saccharomyces cerevisiae* killer toxins: synthesis, mechanisms of action and practical use. *Ecological genetics*. 2019;17(3):59-73. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen17359-73>.
 17. Bussey H, Saville D, Greene D, et al. Secretion of *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin: processing of the glycosylated precursor. *Mol Cell Biol*. 1983;3(8):1362-1370. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.8.1362>.
 18. Bussey H, Sherman D. Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. *Biochim Biophys Acta*. 1973;298(4):868-875. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90391-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90391-X).
 19. Eisfeld K, Riffer F, Mentges J, Schmitt MJ. Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol*. 2000;37(4):926-940. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02063.x>.
 20. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). — М.: Наука, 1981. — 288 с. [Osterman LA. Methods of protein and nucleic acid research. Springer; 1984. 288 p. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-87485-7>.
 21. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557-580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8).
 22. Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*. 2004;36(1):152-154. <https://doi.org/10.2144/04361dd02>.
 23. Guthrie C, Fink GR. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol*. 1991;194:1-863. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)x0276-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)x0276-5).
 24. Gier S, Schmitt MJ, Breinig F. Expression of K1 toxin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* mimics treatment with exogenous toxin and provides a useful tool for elucidating K1 mechanisms of action and immunity. *Toxins (Basel)*. 2017;9(11). pii: E345. <https://doi.org/10.3390/toxins9110345>.
 25. Botstein D, Fink GR. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*. 1988;240(4858):1439-1443. <https://doi.org/10.1126/science.3287619>.
 26. Duina AA, Miller ME, Keeney JB. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*. 2014;197(1):33-48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>.
 27. Tian Z, Liu R, Zhang H, et al. Developmental dynamics of antibiotic resistome in aerobic biofilm microbiota treating wastewater under

- stepwise increasing tigeicycline concentrations. *Environ Int.* 2019;131:105008. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105008>.
28. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(3):260-265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>.
29. Tuller T, Girshovich Y, Sella Y, et al. Association between translation efficiency and horizontal gene transfer within microbial communities. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(11):4743-4755. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr054>.
30. Terrinoni M, Nordqvist SL, Källgård S, et al. A novel nonantibiotic, lgt-based selection system for stable maintenance of expression vectors in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(4). pii: e02143-2117. <https://doi.org/10.1128/AEM.02143-17>.

Приложение 1

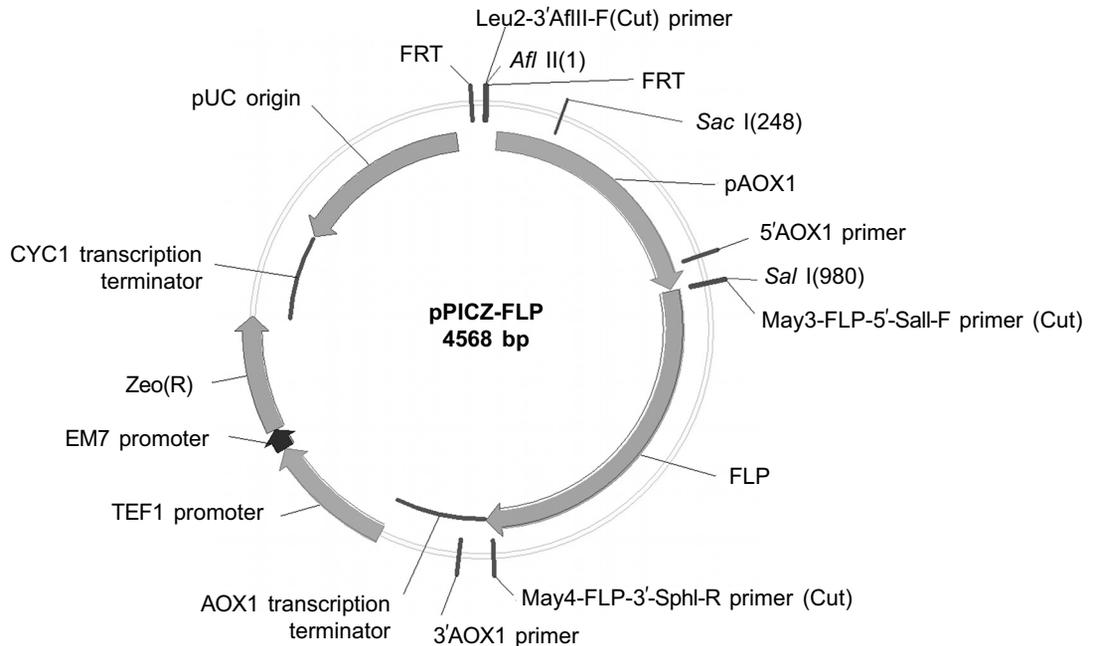
Нуклеотидная последовательность M1:

GAAAAATAAAGAAATGACGAAGCCAACCCAAAGTATTAGTTAGATCCGTCAGTATATTATTTTTTCATCACATTA
 ACCTAGTCGTAGCGCTGAACGATGTGGCCGGTCTGCAGAAACAGCACCAGTGTCACTACTACCTCGTGAAGCGCC
 GTGGTATGACAAGATCTGGGAAGTAAAGATTGGCTATTACAGCGTGCCACAGATGGCAATTGGGGCAAGTCGATC
 ACCTGGGGTTTCATTCGTAGCGAGCGATGCAGGTGTAGTAATCTTTGGTATCAATGTGTGTAAGAACTGCGTGGGTG
 AGCGTAAGGATGATATCAGTACGGACTGCGGCAAGCAAACACTTGCTTTACTAGTCAGCATTTTTGTAGCAGTTAC
 ATCCGGCCATCATCTTATATGGGGTGGTAATAGGCCGGTGTGCGAGTCAGATCCTAATGGCGCTACCGTTGCTCGTC
 GTGACATTTCTACTGTGCGACAGCGGGATATCCACTGGACTTTAGTGCCTTGAACGACATATTAATGAACATGGT
 ATTAGTATACTCCCAGCTAACGCATCACAATATGTCAAAGATCAGACACAGCCGAACACACGACAAGTTTTGTAGT
 GACCAACAACACTACTTCTTTGCATACCGACCTGATTCATCATGGTAATGGAACATATAACCAGTTTACCACACCTC
 ACATTCCAGCAGTGGCCAAGCGTTATGTTTATCCTATGTGCGAGCATGGTATCAAGGCCTCATACTGTATGGCCCTT
 AATGATGCCATGGTGTGCGCTAATGGTAACCTGTATGGACTAGCAGAAAAGCTGTTTAGTGAGGATGAGGGACAAT
 GGGAGACGAATTAATAAATTGTATTGGAGTACTGGCCAGTGGATAATGTGCGATGAAGTTTATTGAGGAAAGTATT
 GATAACGCCAATAATGACTTTGAAGGCTGTGACACAGGCCACTAGGGCATCGTGTCTGACCTCTGATGCGATAACT
 CGACCCTACAGAGCACCAGGGCTATATATAATATAGTAGGCACAAAATAAAAATAAAAAATTAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAGAGAGAAGAAGAAGAAGAAAAGAAAAACAAAAGAAACAGAAAA
 GAGAGAACAGGACAACAACGCAACAACAACAAGCACACTCACCTTGAGTCTAACTGGTGGCAGCAGCAG
 CATATCTCACCTGAGACTAACTGGCGGCAGGCGACCGTGAGCATAACAGCATGCCCACTCGATTGAGACGCGAT
 TCGCGCTCGTAGGTATCGAGCGGCTACGTTGAGCTATTATGGCAGTGACATGCGATTGCGCGACTGCCAAGATCAG
 CTCAGCAAAGTTAAGACCAGTATCGGATATGGTAGACTACTACAATTCGCACAGGTATGAGATTCTCAGTCTAGTGT
 ATGGATGAGTAGTTGAGCCAATGAATCTAGGGTTTAAATTAATGACTATGATGACATATAGCAGGTACAAGCGTAGATA
 ATACTTACTAGGCCCCAGCCGTTACACCCTGTATTGAATAAATACGACTATTTGGCCAGGTCTGGACGGGGCAGTC
 GAATTAAGTGTGAGCACACACAGTGAATCACACAACATAACAGTGTAGGAACATAATGTGCCATTCGTAGTCTG
 AGACGCCGCTAGCCTGTTTAAATGCAACAGCATAGAAGAAACACACATCA

Нуклеотидная последовательность M28:

GAAAAAATTTGAATGGAGAGCGTTTCCTCATTTTAAACATTTTTTCAACAATCATGGTTAACTATAAATCGTT
 AGTTCTAGCACTATTAAGTGTTCAAATCTCAAATATGCACGGGGTATGCCGACATCTGAGAGACAGCAGGGCT
 TAGAAGAACGTGACTTCAGTGTCTACTTTCGCTACTGATGGGCGCAGAAGTAGGCTCATGGGGAATGGTTATA
 GTGGTCAGAAGGTCGAGAGTTGGATCCTCTACGTTCTGACTGGCATTACTACGATGAGCGCAATCGTTGACGAA
 ATTGACTATTATGCGTCACATATGCCACTGAGTGTGTGGGTGAGAACTCAGGGCTACAAATCGTTTCGTGATACC
 ATAGTAACCTTGGTTATGGCTGGCCTGACAGCATCAGCTAACAAGGTAATCAGTAAGACTGAAAACGCAGAGAAT
 ATACAATCGCGTAGTCTTATAACGGGCTGCTTAGTATGGATTATAACAGTACTCATACTATGGCGATTAATTTGG
 AAGACGATTTCTCGGAGCTCGGCTGGGACATCGATACTAGTGATAGCTCTGGTTTATACAAACGTGACGATAATT
 CTGTCACTCTGCACCTAGGGGACGTACCTGCTCTAGGCACCAGTAACACTATCATACTAACGCTGTCATGCAAAAT
 ATATAATAACGCATCATTTGCTTTTCGGTTTTGACCTCATAGCAACGGTAATTCTACAGGCTTGACAGAAACGAGCT-
 AGTATTGATGATGCGGTGTGGTTACAATCTGCATACGGAATAGCTTATAGTGCCTGGATAGGCTCTGAGAATGTGG
 GTTCCTATGATCAGCATCTAGCTGAAGCTAACGGTATGGCTAACTACTGGACGTCCGAGTGTCTAAGTACAATGG
 TGTCATCTGGGGTGACGAATCAGACGCCTGCGGTAACGGTACTGGCTAGCATCACAGCGTTTAGACATAGTGAGTCACT
 CAACAGGCAATTACTACAGAGACGTTAACCTCTGTGGTACGACGAGGCAAGGTGCCACGATGAGCTACGCTAA
 TAGTCCAGACCGACGCTTCTTAGTTATGATCAGGCTGTGA

Карта плазмиды pPICZ-FLP:



Нуклеотидная последовательность плазмиды pPICZ-FLP:

TTAAGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTTCGGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTT
 TTTGCCATCCGACATCCACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAG
 ACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATT
 GGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCT
 GGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTTCCTGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAG
 ATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAATGGCCAAAACACTGACAGTTTAAACGCTGT
 CTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAG
 TTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATAACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAAT
 CTCATTAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAC
 ACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCT
 AACGTTTCATGATCAAAAATTAACCTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAATATATAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTA
 AACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTTATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTTGATTTAACGAC
 TTTTAAACGACAACCTGAGAAGATCAAAAACAATAATTATTCGAAACGTCGACATGCCACAATTTGATATATTATGTAA
 AACACCACCTAAGGTCCTGGTTCGTCAGTTTGTGGAAGGTTTGAAGACCTTCAGGGGAAAAAATAGCATCATGT
 GCTGCTGAACTAACCTATTTATGTTGGATGATTACTCATAACGGAACAGCAATCAAGAGAGCCACATTCATGAGCTATA
 ATACTATCATAAGCAATTCGCTGAGTTTCGATATTGTCAACAATCACTCCAGTTTAAATACAAGACGCAAAAAGCAAC
 AATTCTGGA AGCCTCATTAAGAAATTAATTCCTGCTTGGGAATTTACAATTATTCTTACAATGGACAAAAACATCAA
 TCTGATATCACTGATATTGTAAGTAGTTTGAATTACAGTTTGAATCATCGGAAGAAGCAGATAAGGGAAATAGCCACA
 GTAAAAAATGCTTAAAGCACTTCTAAGTGAGGGTGAAGCATCTGGGAGATCACTGAGAAAATACTAAATTCGTTTG
 AGTATACCTCGAGATTTACAAAAACAATACTTTATAACCAATTCCTCTTCTAGCTACTTTTCATCAATTGTGGAAGATTC
 AGCGATATTAAGAACGTTGATCCGAAATCATTTAAATTAGTCCAAAATAAGTATCTGGGAGTAATAATCCAGTGTTTAGT
 GACAGAGACAAAAGACAAGCGTTAGTAGGCACATATACTTCTTTAGCGCAAGGGGTAGGATCGATCCACTTGTATATTT
 GGATGAATTTTTGAGGAATTCTGAACCAGTCCTAAAACGAGTAAATAGGACCGGCAATTCCTCAAGCAACAAACAGG
 AATACCAATTATTAAGATAACTTAGTCAGATCGTACAACAAGGCTTTGAAGAAAAATGCGCCTTATCCAATCTTTGC
 TATAAAGAATGGCCAAAATCTCACATTGGAAGACATTTGATGACCTCATTTCTGTCAATGAAGGGCCTAACGGAGT
 TGAATAATGTTGTGGGAAATTGGAGCGATAAGCGTGCTTCTGCCGTGGCCAGGACAACGTATACTCATCAGATAAC
 AGCAATACCTGATCACTACTTCGCACTAGTTTCTCGGTAATGATGATCAATATCAAAGGAAATGATAGCATTG
 AAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCATATAGAACAGCTAAAGGGTAGTGCTGAAGGAAGCATAACGATA
 CCCCAGCATGGAATGGGATAATATCACAGGAGGTACTAGACTACCTTTCATCCTACATAAATAGACGCATTCTAGAATA
 TAGTGAGCATGCGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTG
 CTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTTGT
 AACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTGTCAATTTTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGC

TGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCATTCGAGTTTGTGTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCA
 GAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACACACCATAGCTTCAAAAATGTTTCTACTCCTTT
 TTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCACTTCAAAAACACCCAAGCACAGCATACTAAATTT
 CCTCTTTCTTCTCTAGGGTGTGCTTAATTACCCGTAATAAAGTTTGGAAAAGAAAAAAGAGACCGCCTCGTTTC
 TTTTTCTTCGTCGAAAAAGCAATAAAAAATTTTATCA CGTTTCTTTTTCTTGAAATTTTTTTTTTTAGTTTTTTCTCT
 TTCAGTGACCTCCATTGATATTTAAGTTAATAAACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTTCTATTA
 CAACTTTTTTTACTTCTTGTTTCATTAGAAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGGTGTTGACAATTAATCATCG
 GCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGT
 GCTCACCGCGCGGACGTGCGCGGAGCGGTGCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGT
 GGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTG
 CCGGACAACACCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTG
 TCCACGAACTTCCGGGACGCTCCGGGCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTC
 GCCCTGCGGACCCGCGGCCAACTGCGTGCCTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCGACGGCGG
 CCCACGGGTCCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCCTTTCTTTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTAC
 ATTCACGCCCTCCCCCACATCCG CTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTAT
 TTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCAT
 GTAACATTAATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGAGACCAAC
 ATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG
 CCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAG
 GCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTT
 TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTC
 CAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC
 CAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
 GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT
 GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT
 TTTTGTTCGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTG
 ACGTCTAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATCAGATCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAG
 TATAGGAACTTCC

✿ Информация об авторах

Дмитрий Михайлович Музаев — инженер. ФГБОУ ВО СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: dmmuzaev@yandex.ru.

Андрей Михайлович Румянцев — канд. биол. наук, младший научный сотрудник. ФГБОУ ВО СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия. SPIN: 9335-1184. E-mail: a.m.rumyantsev@spbu.ru.

Усама Раек Аль Шанаа — аспирант, ФГБОУ ВО СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия; аспирант, Комиссия по атомной энергии Сирий, Дамаск, Сирия. E-mail: st072427@student.spbu.ru.

Елена Викторовна Самбук — д-р биол. наук, доцент. ФГБОУ ВО СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия. SPIN: 8281-8020. E-mail: e.sambuk@spbu.ru.

✿ Authors and affiliations

Dmitri M. Muzaev – Engineer. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. E-mail: dmmuzaev@yandex.ru.

Andrey M. Rumyantsev – PhD, Researcher. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. SPIN: 9335-1184. E-mail: a.m.rumyantsev@spbu.ru.

Ousama R. Al Shanaa – PhD Student, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; PhD Student, Atomic Energy Commission of Syria, Damascus, Syria. E-mail: st072427@student.spbu.ru.

Elena V. Sambuk – Doctor of Science, Docent. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. SPIN: 8281-8020. E-mail: e.sambuk@spbu.ru.