

December 2019

## Obtaining of the “green fluorescent protein - gfp” in yeast of *Pichia pastoris* as reporter of heterological protein expression

ASHIROV Oybek

*Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan, oybek2425@mail.ru*

SASMAKOV Sobirdjan

*Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan, sasmakov@web.de*

ABDURAKHMANOV Jaloliddin

*Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan, jaloliddin0919@mail.ru*

HASANOV Shuhrat

*Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan, sh.sh.hasanov@mail.ru*

Follow this and additional works at: <https://uzjournals.edu.uz/cce>

 Part of the [Biochemical and Biomolecular Engineering Commons](#)

---

### Recommended Citation

Oybek, ASHIROV; Sobirdjan, SASMAKOV; Jaloliddin, ABDURAKHMANOV; and Shuhrat, HASANOV (2019) "Obtaining of the “green fluorescent protein - gfp” in yeast of *Pichia pastoris* as reporter of heterological protein expression," *Chemistry and Chemical Engineering*: Vol. 2019 : No. 4 , Article 27.  
Available at: <https://uzjournals.edu.uz/cce/vol2019/iss4/27>

This Article is brought to you for free and open access by 2030 Uzbekistan Research Online. It has been accepted for inclusion in Chemistry and Chemical Engineering by an authorized editor of 2030 Uzbekistan Research Online. For more information, please contact [brownman91@mail.ru](mailto:brownman91@mail.ru).

## OBTAINING OF THE “GREEN FLOURECENT PROTEIN - GFP” IN YEAST OF *PICHIA PASTORIS* AS REPORTER OF HETEROLOGICAL PROTEIN EXPRESSION

Oybek ASHIROV (oybek2425@mail.ru), Sobirdjan SASMAKOV (sasmakov@web.de), Jaloliddin ABDURAKHMANOV (jaloliddin0919@mail.ru), Shuhrat HASANOV (sh.sh.hasanov@mail.ru), Shakhnoz AZIMOVA Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan

Based on pPIC3.5 and pPIC9 yeast vectors the recombinant plasmid DNA pPIC3.5-GFP (8464 bp) and pPIC9-GFP (8718 bp) containing cDNA (719 bp) of Green fluorescent protein (GFP) were cloned. The obtained plasmids were transformed into yeast cells of the GS115 *Pichia pastoris* strain. Transformants are selected on histidine-deficient medium. Recombinant clones of pPIC3.5-GFP and pPIC9-GFP were identified by detecting cell fluorescence. GFP expression in yeast is confirmed by green fluorescence. Using electrophoresis in PAAG the molecular weight of the synthesized protein ( $\approx 27$  kDa) is determined. The resulting reporter constructs and recombinant strains can be used to study the expression level of various recombinant proteins in *Pichia pastoris* cells.

**Keywords:** GFP, transfer vectors, recombinant plasmids, cloning, expression, PCR, *Pichia pastoris*

## ПОЛУЧЕНИЕ «ЗЕЛЁНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА - GFP» В ДРОЖЖАХ *PICHIA PASTORIS* КАК РЕПОРТЕР ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ

Ойбек Норбой угли АШИРОВ (oybek2425@mail.ru), Собирджан Анарматович САСМАКОВ (sasmakov@web.de), Жалолiddин Мирджамильевич АБДУРАХМАНОВ (jaloliddin0919@mail.ru), Шухрат Шахкатович ХАСАНОВ (sh.sh.hasanov@mail.ru), Шахноз Садыковна АЗИМОВА Институт химии растительных веществ, Ташкент, Узбекистан

На основе дрожжевых векторов pPIC3.5 и pPIC9 клонированы рекомбинантные плазмидные ДНК pPIC3.5-GFP (8464 п.н.) и pPIC9-GFP (8718 п.н.), содержащие к ДНК зеленого флуоресцентного белка (GFP) размером 719 п.н. Полученные плазмиды трансформированы в клетки дрожжей штамма GS115 *Pichia pastoris*. Трансформанты отобраны на среде с дефицитом гистидина. Рекомбинантные клоны pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP изучены путём детектирования флуоресценции клеток. Экспрессия GFP в дрожжах подтверждена ярко-зелёной флуоресценцией. С помощью электрофореза в ПААГ определена молекулярная масса синтезированного белка ( $\approx 27$  кДа). Полученные репортерные конструкции и рекомбинантные штаммы могут быть использованы для исследования уровня экспрессии различных рекомбинантных белков в клетках *Pichia pastoris*.

**Ключевые слова:** GFP, трансферные векторы, рекомбинантные плазмиды, клонирование, экспрессия, ПЦР, *Pichia pastoris*

## *PICHIA PASTORIS* ACHITQISIDA “GFP -YASHIL FLUORESTSENT OQSILNI” GETEROLOGIK OQSILLAR EKSPRESSIYASINING REPORTERI SIFATIDA OLISH

Oybek Norboy o'g'li ASHIROV (oybek2425@mail.ru), Sobirdjan Anarmatovich SASMAKOV (sasmakov@web.de), Jaloliddin Mirjamilyevich ABDURAXMANOV (jaloliddin0919@mail.ru), Shuhrat Shavkatovich XASANOV (sh.sh.hasanov@mail.ru), Shaxnoz Sadikovna AZIMOVA O'simlik moddalari kimyosi instituti, Toshkent, O'zbekiston

pPIC3.5 va pPIC9 achiq vektorlari asosida yashil flourestsent oqsil (GFP) 719 bp ga teng kDNKni saqlovchi rekinbinat plazmid DNK pPIC3.5-GFP (8464 bp) va pPIC9-GFP (8718 bp) klonlashtirildi. Olingan plazmidalar GS115 *Pichia pastoris* achiq hujayralariga transformatsiya qilindi. Transformantlar gistidin taqchil ozuqa muhitida tanlab olindi. Rekinbinat pPIC3.5-GFP va pPIC9-GFP klonlari hujayra flourestsentsiyasini detektisyalash orqali o'rganildi. Achiqtildagi GFP ekspressiyasi yorqin yashil flourestsentsiya bilan tasdiqlandi. PAAG elektroforezi yordamida sintezlangan oqsilning molekulyar massasi ( $\approx 27$  kDa) aniqlandi. Ushbu olingan reporter konstruksiya va rekinbinat shtamlardan *Pichia pastoris* hujayralaridagi turli xil rekinbinat oqsillar ekspressiya darajasini tadqiq etishda foydalanish mumkin.

**Kalit so'zlar:** GFP, transfer vektorlar, rekinbinat plazmidalar, klonlash, ekspressiya, PCR, *Pichia pastoris*

### Введение

Разработка новых, эффективных способов получения биологически активных белков (интерфероны, инсулин, гормоны роста, эритропоэтин, поверхностные белки для создания вакцин и мн. др.) которые в настоящее время могут быть получены только в живых системах является актуальной задачей. Одной из прогрессивных систем экспрессии, позволяющих получить рекомбинантные белки, является дрожжевая система *Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* представляет собой метилотрофные дрожжи, способные метаболизировать метанол в качестве источника углерода [1-4]. Накопление значительной биомассы при культивировании на недорогих питательных средах, отсутствие эндотоксинов и пирогенов, высокий уровень синтеза рекомбинантных белков и способность синтезировать рекомбинантный белок в питательную среду и другие особенности делают её оптимальным в про-

мышленном использовании, по сравнению с другими эукариотическими системами экспрессии, например, таких как культура тканей млекопитающих [5-10]. Выход рекомбинантных белков в большой степени зависит от используемых для их экспрессии генетических конструкций [11-17]. В настоящее время доступны различные векторы для использования в этой системе экспрессии. GFP (Green Fluorescent Protein) - белок молекулярной массой около 27 кДа, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, который флуоресцирует зеленым цветом под воздействием УФ-света. GFP малотоксичен для клеток, устойчив к действию протеиназ и высоких температур, оказывает минимальное влияние на подвижность и локализацию гибридного белка-партнера. Ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок, в сочетании с различными регуляторными элементами широко используется в качестве репортерного гена при молеку-

## BIOCHEMICAL AND BIOMOLECULAR ENGINEERING

БИОХИМИЧЕСКАЯ И БИОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ  
BIOKIMYOVIY VA BIOMOLEKULARYAR TEXNOLOGIYA

лярном клонировании для исследования экспрессии различных белков [18, 19]. Мы получили новые рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP, кодирующие белок GFP в дрожжах *Pichia pastoris*, с последующим использованием их в качестве «моделей» для исследования уровня экспрессии различных белков.

**Методы исследования**

В экспериментах использовались ферменты и реагенты фирм New England Biolabs, Invitrogen (США), Sigma-Aldrich, Panreac (Германия), SBS Genetech (Китай), БИОССЕТ (Россия), Himedia (Индия). Конструирование праймеров проводили с помощью программ Primer Express 3.0, Oligo Analyzer и SnapGene. Синтез праймеров проводили методом фосфорамидитов [20] на синтезаторе ASM-2000.

**Подготовка векторов и вставки (гена) для лигирования.** Препаративное выделение трансферных векторов ДНК pPIC3,5 и pPIC9, введённые в клетки *E.coli* штамма Neb-5а проводили методом щелочного лизиса с последующей депротенинизацией смесью фенол-хлороформ [21]. 1 мкг векторных плазмид pPIC3.5 и pPIC9 обрабатывали последовательно рестриктазами *Bam*HI/*Eco*RI и *Xho*I/*Eco*RI фирмы "New England Biolabs" (США) в соответствующих условиях [21]. Линейные ДНК длиной 7745 п.н. и 7999 п.н. выделяли после электрофореза в 0,7% агарозном геле методом электроэлюции, кДНК гена GFP (вставка), размером 719 п.н. амплифицировали методом ПЦР, используя в качестве матрицы рекомбинантную плазмиду pVasPAK8-polh-EGFP, депонированного в лаборатории молекулярной генетики ИХРВ АН РУз.

**Лигирование векторов со вставкой, и трансформация клеток *E.coli* лигазной смесью.** Лигирование векторов pPIC3,5 и pPIC9 с целевой вставкой осуществляли в минимальном объёме (10 мкл) в молярном соотношении 1:10 соответственно с помощью ДНК-лигазы фага T4. Реакция проходила при 16°C в течение ночи. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* бесплазмидного штамма NEB-5а, полученные по методике [21].

**Идентификация ДНК рекомбинантных клонов.** Молекулярную массу плазмидной ДНК, выделенной из клонов, полученных после трансформации лигазной смесью, определяли методом электрофореза в агарозном геле. Клоны, содержащие ДНК с молекулярной массой: 8,464 и 8,718 т.п.н. исследовали с помощью ПЦР анализа. Результаты амплификации анализировали с применением метода электрофореза в 1% агарозном геле. ДНК рекомбинантных клонов, положительных по ПЦР подвергали рестриктному анализу. Для этого про-

водили сравнительное картирование рекомбинантных клонов и исходной векторной плазмиды pPIC3,5 и pPIC9 по сайту *Eco*RI. Молекулярную массу полученных фрагментов определяли методом электрофореза в 0,7%-ном агарозном геле. В качестве маркера молекулярной массы использовали 1 Kb Plus DNA Ladder фирмы Invitrogen.

**Визуализация GFP-специфичной флуоресценции в клетках.** Для идентификации рекомбинантных клонов pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп Leica DMIL Fluo, источник UV-света и GFPS флуоресцентный фильтр. Клетки *Pichia pastoris*, трансформированные рекомбинантными плазмидами, в ультрафиолетовом спектре излучали GFP-специфическую флуоресценцию, тогда как клетки, не содержащие кассету экспрессии целевого гена таким свойством, не обладают, и лунки планшета остаются темными.

**Электрофорез в ПААГ.** Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) использовали очищенную фракцию белков, полученных из лизатов клеток после 96 ч. культивирования. Количество наносимых образцов - 20 мкл в лунку геля. Напряжённость электрического поля составляла 100 V. После разделения смеси белков гель окрашивали 0.025% Coomassie brilliant blue R. По прошествии 15-20 минут гель промывали 7% раствором ледяной уксусной кислоты и анализировали полученную картинку.

**Результаты и обсуждение**

Рекомбинантные плазмидные ДНК созданы на основе трансферных векторов pPIC3.5 (7751 п.н.) и pPIC9 (8023 п.н.), содержащих нуклеотидные последовательности генома *Pichia pastoris*, в том числе промотора *AOX1*, *HIS4* и др. Кроме того, pPIC9 дополнительно содержит сигнальные последовательности альфа-фактора (249 п.н.) для секреции экспрессируемого белка в питательную среду.

Для клонирования, в соответствии с физической картой векторы последовательно подвергались гидролизу рестриктазами *Bam*HI, *Xho*I и *Eco*RI:

*Bam*HI: 5'-G↓GATCC-3' (pPIC3.5)  
3'-CCTAG↓G-5'

*Xho*I: 5'-C↓TCGAG (pPIC9)  
3'-GAGCT↓C-5'

*Eco*RI: 5'-G↓AATTC-3' (pPIC3.5 и pPIC9)  
3'-CTTAA↓G-5'

В результате были получены фрагменты векторов pPIC3.5 и pPIC9 с "липкими" концами, позволяющие провести «направленное» лигирование. Линейные ДНК длиной 7745 п.н. и 7999 п.н. выделяли после электрофореза в 0,7%-ном агарозном геле методом электроэлюции [21].

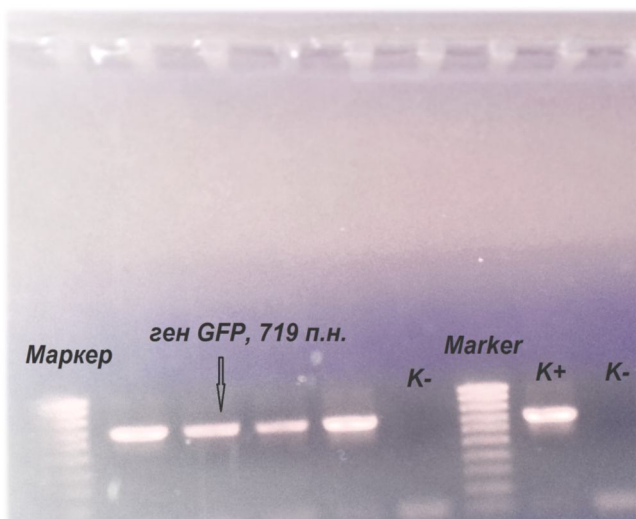


Рисунок 1. Гель электрофорез амплификатов ПЦР.

Во избежание замыкания векторов была проведена их обработка щелочной фосфатазой. кДНК гена GFP, размером 719 п.н. амплифицировали с помощью ПЦР (рис. 1).

Для этого методом твердофазного фосфорамидитного синтеза [13] нами были синтезированы следующие олигонуклеотиды: *VamHI*-5'-GAA GGA TCC ATG GTG AGC AAG GGC GA-3', *XhoI*-5'-TCT CTC GAG ATG GTG AGC AAG GGC GA-3', *EcoRI*-5'-AGG GAA TTC CTT GTA CAG CTC GTC CAT G-3'.

В качестве матрицы использовали рекомбинантную плазмиду *pVacPAK8-polh-EGFP*, содержащую данный ген. Затем кДНК была последовательно обработана рестриктазами *VamHI*, *XhoI* и *EcoRI* с целью образования сайт специфичных участков для клонирования в трансферные векторы. Соответствующий фрагмент кДНК, после обработок извлекали из 0,7% агарозного геля и лигировали с подготовленным вектором в молярном соотношении 1:10 (вектор: вставка)

с применением ДНК-лигазы фага T4. Далее лигазной смесью трансформировали компетентные клетки штамма *Escherichia coli* NEB-5a [21]. Скрининг рекомбинантных клонов *E. coli* проводили методом ПЦР и рестрикционным анализом.

Штамм GS115 *P. pastoris* трансформировали полученными рекомбинантными плазмидами pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP, линейаризованными в области HIS4 нуклеазой *SacI*. Трансформанты (His<sup>+</sup>) были отобраны на среде с дефицитом гистидина.

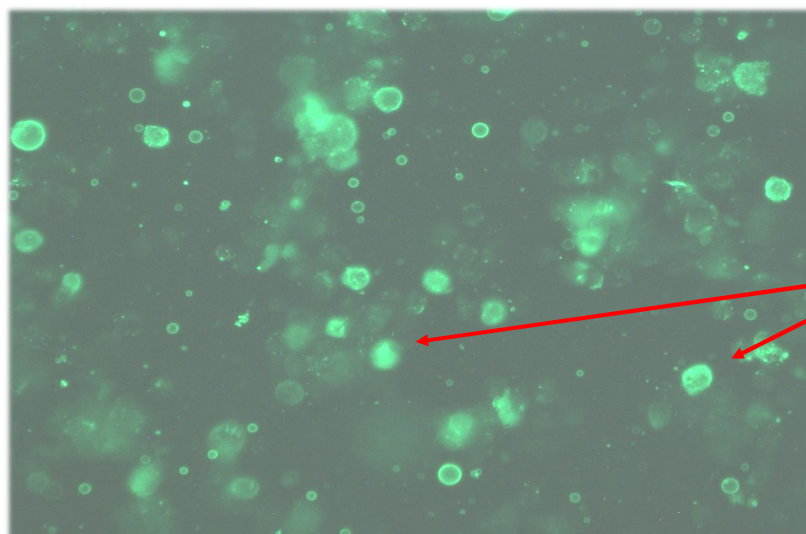
Идентификацию рекомбинантных клонов pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP производили по экспрессии репортерного гена GFP путем визуализации GFP-специфической флуоресценции (рис. 2).

Несколько отобранных колоний трансформантов культивировали до стадии экспоненциальной фазы (ОП=2 при 600 нм) в среде, содержащей глицерин.

Экспрессию индуцировали добавлением метанола до конечной концентрации 0,5% в течение 96 ч. культивирования. Экспрессия GFP в дрожжах была подтверждена ярко-зелёной флуоресценцией (рис. 2). Электрофорез в ПААГ и дальнейший иммуоблот показали, что белок имеет ожидаемую молекулярную массу (~27 кДа).

### Заключение

Клонированы рекомбинантные плазмидные ДНК pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP, кодирующие зелёный флуоресцентный белок (GFP). На их основе получены рекомбинантные штаммы GS115 *Pichia pastoris*, продуцирующие данный белок. Полученные плазмиды и рекомбинантные штаммы могут быть использованы для исследования уровня экспрессии различных рекомбинантных белков в клетках дрожжей *Pichia pastoris*.



Рекомбинантные клетки GFP (ярко-зелёный цвет)

Рисунок 2. Визуализация рекомбинантных клонов

## REFERENCES

- Gasser B., Prielhofer R., Marx H., Maurer M., Nocon J., Steiger M., Puxbaum V., Sauer M., Mattanovich D. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiol.*, 2013, vol. 8, pp. 191-208.
- Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.*, 2000, vol. 16, no. 1, pp. 23-52.
- Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2014, vol. 98, pp. 5301-5317.
- Vogl T., Hartner F.S., Glieder A. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, vol. 24, pp. 1094-1101.
- Spohner S.C., Quitmann H., Czermak P. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2015, vol. 202, pp. 118-134.
- Bollok M., Resina D., Valero F., Ferrer P. Recent patents on the *Pichia pastoris* expression system: expanding the toolbox for recombinant protein production. *Recent Pat Biotechnol.*, 2009, vol. 3, pp. 192-201.
- Damasceno L.M., Huang C.-J., Batt C.A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2012, vol. 93, pp. 31-39.
- Hirz M., Richter G., Leitner E., Wriessnegger T., Pichler H. A novel cholesterol-producing *Pichia pastoris* strain is an ideal host for functional expression of human Na, K-ATPase  $\alpha\beta 1$  isoform. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2013, vol. 97, pp. 9465-9478.
- Shi X.-L., Feng M.-Q., Shi J., Shi Z.-H., Zhong J., Zhou P. High-level expression and purification of recombinant human catalase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.*, 2007, vol. 54, pp. 24-29.
- Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., Harvey L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, vol. 22, pp. 249-270.
- Idiris A., Tohda H., Kumagai H., Takegawa K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2010, vol. 86, pp. 403-417.
- Stadlmayr G., Mecklenbräuer A., Rothmüller M., Maurer M., Sauer M., Mattanovich D., Gasser B. Identification and characterization of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *J. Biotechnol.*, 2010, vol. 150, pp. 519-529.
- Vogl T., Glieder A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *Nat Biotechnol.*, 2013, vol. 30, pp. 385-404.
- Uchima C.A., Arioka M. Expression and one-step purification of recombinant proteins using an alternative episomal vector for the expression of N-tagged heterologous proteins in *Pichia pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, vol. 76, pp. 368-371.
- Araya-Garay J.M., Feijoo-Siota L., Rosa-dos-Santos F., Veiga-Crespo P., Villa T.G. Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and  $\beta$ -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2012, vol. 93, pp. 2483-2492.
- Sha C., Yu X.-W., Li F., Xu Y. Impact of gene dosage on the production of lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013, vol. 169, pp. 1160-1172.
- Peña D.A., Gasser B., Zanghellini J., Steiger M.G., Mattanovich D. Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic engineering*, 2018, vol. 50, pp. 2-15. doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.017
- Tsien R.Y. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, vol. 67, pp. 509-544. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509
- Jones J.J., Bridges A.M., Fosberry A.P., Gardner S., Lowers R.R., Newby R.R., James P.J., Hall R.M., Jenkins O. Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. *J Biotechnol.*, 2004, vol. 109, pp. 201-211. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.10.039
- McBride L.J., Caruthers M.H. An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Letters*, 1983, vol. 24, pp. 245-248. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81376-3
- Green M.R., Sambrook J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Fourth Edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1885 p.