Получение штамма мицелиального гриба PENICILLIUM CANESCENS со снятой катаболитной репрессией и арабинозной индукцией

Чулкин А. М., Вавилова Е. А., Федорова Т. В., Королева О. В., Беневоленский С. В.
Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Штамм мицелиального гриба Penicillium canescens F178 – природный продуцент β-галактозидазы и эндо-1,4-β-ксиланазы, промышленно значимых ферментов. Экспрессия генов xylA и bgaS, кодирующих эти белки, подвержена репрессии D-глюкозой и индуцируется L-арабинозой. Ранее нами был получен мутантный по углеродной катаболитной репрессии (УКР) штамм мицелиального гриба P. canescens [1]. Показано, что данная мутация обусловлена изменениями в гене creA, кодирующем глобальный регулятор УКР в мицелиальных грибах. Однако даже в мутанте по УКР для экспрессии генов xylA и bgaS необходимо было присутствие индуктора - арабинозы. При этом сама L-арабиноза является дорогостоящим субстратом, использование которого при крупномасштабном производстве нерентабельно. Таким образом, актуальной является задача получения мутантных культур гриба, у которых активационный уровень транскрипции целевых генов достигается в отсутствии L-арабинозы.

Для решения поставленной задачи был использован мутантный штамм P. canescens PCA-10-4/I-7 (pgpdA::xlnR, creA-), у которого была снята УКР транскрипции гена xlnR – транскрипциональный активатор ксиланолитических генов P. canescens. Для чего в геном штамма PCA-10/I-7 была введена методом котрансформации сконструированная плазмидная конструкция, несущая ген xlnR P.canescens под контролем конститутивного промотора гена gpdA глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы A.nidulans с селективной плазмидой pSTA-10. Поскольку используемый мутантный штамм содержал в геноме гибридный ген hph гигромицин-Б-фосфотрансферазы E. coli под контролем промотора гена xylA, то, искомые мутанты со снятой арабинозной индукцией могли быть отобраны по фенотипу HMR на среде, не содержащей арабинозы. При получении мутантов была подобрана концентрация гигромицина Б (1000 мкг/мл) на среде ММ с содержанием глюкозы 0,4% на которой отсутствовал рост конидий штамма. Споровая суспензия штамма PCA-10-4/I-7 (титр 3,2 × 107) была приготовлена из 14-ти суточной культуры гриба, выращенной на среде ММ. Суспензию облучали УФ в течение 20 сек, достигая эффективности выживания спор - 6%. Конидии высевались на агаризованную среду ММ, содержащую глюкозу (0,4%), гигромицин Б (1000 мкг/мл) и X-gal (500 мг/л). Чашки инкубировали 7 суток при 30 ºC, в результате чего было получено 2,5×104 клонов с фенотипом HMR, среди которых было отобрано 36 синих клонов, продуцирующих β-галактозидазу в данных условиях (фенотип bgaS+). Отобранные мутанты фенотипа HMR bgaS+ были переколоты на среду для повторного тестирования фенотипа. По результатам такого тестирования были выявлены синие клоны с воспроизводимым фенотипом и был отобран мутантый клон PCA-10-4/I-7/12, у которого при выращивании в жидкой среде продукция как эндоглюканазы, так и β-галактозидазы, происходила даже в отсутствии индуктора - L-арабинозы. При этом в исходном штамме секреция данных ферментов полностью зависела от добавления индуктора, из чего можно заключить, что мутация в штамме PCA-10-4/I-7/12 снимает индукцию арабинозой в обоих генах xylA и bgaS.

Для получения штаммов-продуцентов на основе мутантного штамма PCA-10-4/I-7/12 необходимо также решить задачу введения селектируемой мутации. В качестве такой мутации была использована мутация по гену нитратредуктазы (niaD¯). Получение таких мутантов проводили методом индуцированного мутагенеза. Для этого споровую суспензию штамма PCA-10-4/I-7/12 обрабатывали N-нитро-N- нитрозогуанидином (200 мкг/мл) 30 мин при 30 °C, отмывали буфером и высевали на чашки со средой ММ. Выросшие клоны пересевали на матричные чашки с различными источниками азота. Отсутствие роста клонов на среде с добавлением 10 мМ NaNO3 и его наличие на других источниках азота говорит о наличие фенотипа niaD¯. По результатам проведенного теста отобран мутант с максимальной продукцией β-галактозидазы, обозначенный PCA-10-4/I-7/12 niaD¯. В настоящее время проводится работа по получению штамма-продуцента мицелиального гриба Penicillium canescens со снятой катаболитной репрессией и арабинозной индукцией на основе полученного мутанта PCA-10-4/I-7/12 niaD¯.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 16.512.11.2150).

Список литературы

1. Чулкин, А.М., Вавилова, Е.А., Беневоленский С.В. (2011), Молекулярная биология, Т. 45, № 5, с. 1–8.