

Санкт-Петербургский городской Дворец творчества юных

Эколого-биологический центр «Крестовский остров»

Научно-исследовательская работа

**Модификация последовательности вектора рP1CZ-
BLG для повышения эффективности синтеза бета-
лактоглобулина**

Выполнил:
Пестов Михаил,
ученик 11 «Б» класса 214 лицея

Научный руководитель:
Румянцев Андрей Михайлович,
кандидат биологических наук,
педагог дополнительного образования
ЭЦБ «Крестовский остров»

Санкт-Петербург

2025

| Содержание | | Стр. |
|------------|--|------|
| I | Введение | 2 |
| 1 | Центральная догма молекулярной биологии | 2 |
| 1.1 | ДНК-ДНК | 2 |
| 1.2 | ДНК-РНК | 2 |
| 1.3. | РНК-Белок | 2 |
| 2 | Метилотрофные дрожжи <i>Komagataella phaffii</i> | 3 |
| 2.1 | Характеристика <i>K. phaffii</i> | 4 |
| 2.2 | Применение <i>K. phaffii</i> | 4 |
| 2.3 | Пример использования <i>K. phaffii</i> для синтеза белка бета-лактоглобулина | 4 |
| 3 | Актуальность работы | 6 |
| II | Цель и задачи | 8 |
| III | Методы и инструменты | 9 |
| 1 | Метод ПЦР | 9 |
| 1.1 | Компоненты для проведения ПЦР | 9 |
| 1.2 | Использованная смесь для ПЦР | 9 |
| 1.3 | Программа ПЦР, которую использовал | 10 |
| 2 | Электрофорез молекул ДНК в агарозном геле | 10 |
| 3 | Выделение ДНК из агарозного геля | 11 |
| 4 | Трансформация бактерий | 12 |
| 5 | Выделение ДНК из бактерий | 12 |
| IV | Ход работы | 14 |
| V | Результат работы | 18 |
| VI | Список литературы | 19 |

I. Введение

1. Центральная догма молекулярной биологии:

Центральная догма молекулярной биологии обобщает наблюдаемые в природе правила реализации генетической информации. Информация может передаваться от нуклеиновых кислот к белку, но в обратном направлении это невозможно. Правила впервые были сформулированы Фрэнсисом Криком в 1958 году и приведены в соответствии с накопившимися данными в 1970 году. Реализация генетической информации последовательно от ДНК к РНК и затем от РНК к белку является универсальным правилом для всех без исключения живых организмов.

1.1. ДНК - ДНК

Процесс копирования ДНК называется репликацией. Именно благодаря этому процессу сохраняют и передают наследственную информацию живые организмы. Процесс репликации состоит из 3 этапов, как и любой матричный процесс: инициация, элонгация и терминация. Синтез молекул ДНК полуконсервативный. Это значит, что исходная двуцепочечная ДНК расплетается до одиночных цепей. И каждая из них служит основой для синтеза второй новой цепи. Синтез идёт на основе правил комплементарности. Каждому нуклеотиду в исходной матричной цепи будет соответствовать парный комплементарный в новой. Тиминовому нуклеотиду соответствует адениновый, цитозиновому нуклеотиду – гуаниновый. В результате на основе одной исходной молекулы ДНК синтезируется две её копии, которые могут быть переданы дочерним клеткам. Процесс происходит за счет фермента ДНК – полимеразы.

1.2. ДНК – РНК

Этот процесс назвали транскрипцией, то есть на основе ДНК синтезируется молекула иРНК. Вначале РНК полимеразы узнает определённый участок и связывается с ним, этот участок называют промотор. Затем начинает расплетаться сама ДНК, а РНК-полимераза идет по одной из цепей ДНК (матричной цепи) от 3 штрих конца к 5 штрих концу. При этом она синтезирует РНК, достраивая нуклеотиды на 3 штрих конец синтезируемой молекулы. Синтез РНК также идёт по правилам комплементарности и синтезируемая последовательность соответствует закодированной в исходной ДНК.

1.3. РНК - Белок

Новосинтезированная иРНК вступает в процесс трансляции (синтеза белков). Он происходит в рибосоме на основе матрицы иРНК, то есть кодоны

нуклеотидов иРНК переводятся (транслируются) в последовательность аминокислот. В этом процессе участвуют также молекулы тРНК, к которым присоединяются соответствующие аминокислоты.

Всего существует 20 основных незаменимых аминокислот. Их кодирование в последовательности нуклеотидов ДНК и РНК осуществляется в виде триплетов. Правила кодирования общие и практически без исключений выполняются для всех живых организмов на планете Земля. Ниже представлена таблица всевозможных вариантов кодонов и аминокислот, которые они кодируют.

Генетический код (иРНК)

| Первое основание | Второе основание | | | | Третье основание |
|------------------|------------------|-----|-----|-----|------------------|
| | У | Ц | А | Г | |
| У | Фен | Сер | Тир | Цис | У |
| | Фен | Сер | Тир | Цис | Ц |
| | Лей | Сер | — | — | А |
| | Лей | Сер | — | Три | Г |
| Ц | Лей | Про | Гис | Арг | У |
| | Лей | Про | Гис | Арг | Ц |
| | Лей | Про | Глн | Арг | А |
| | Лей | Про | Глн | Арг | Г |
| А | Иле | Тре | Асн | Сер | У |
| | Иле | Тре | Асн | Сер | Ц |
| | Иле | Тре | Лиз | Арг | А |
| | Мет | Тре | Лиз | Арг | Г |
| Г | Вал | Ала | Асп | Гли | У |
| | Вал | Ала | Асп | Гли | Ц |
| | Вал | Ала | Глу | Гли | А |
| | Вал | Ала | Глу | Гли | Г |

Рисунок 1. Таблица генетического кода.

Важно понимать, что правила кодирования белков и принципы процессов репликации совпадают у разных живых организмов. Это позволяет использовать организмы продуценты, например дрожжи, для синтеза нужных белков из других организмов. На подобной возможности основаны важные направления современной биотехнологии.

2. Метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii*

Одним из перспективных организмов для синтеза нужных белков являются дрожжи *Komagataella phaffii*. Это метилотрофные дрожжи, которые могут использовать метанол в качестве единственного источника углерода. Они ценятся в биотехнологии за их способность расти до очень высокой плотности, синтезировать и секретировать большое количество белков и выполнять посттрансляционные модификации.

2.1 Характеристика дрожжей *K. phaffii*

- Могут использовать метанол в качестве источника углерода и энергии. Эта особенность используется для синтеза белков в больших количествах с помощью таких промоторов, как сильный промотор гена *AOX1*.
- Могут достигать исключительно высокой плотности клеток, что приводит к высокому выходу желаемого продукта.
- Это мощная и универсальная система для производства белков в фармацевтических, пищевых и промышленных целях.
- Они могут выполнять сложные посттрансляционные модификации, такие как правильное сворачивание белка, гликозилирование и образование дисульфидных связей, которые критически важны для функционирования многих белков.
- Они эффективно секретируют белки, что упрощает процесс очистки целевого белка.

2.2 Применение дрожжей *K. Phaffii*

- Производство терапевтических белков, антител и других биофармацевтических препаратов.
- Получение промышленных ферментов таких как: ксиланаза, маннаназа и фитаза, для использования в различных отраслях.
- Производство биотоплива и химикатов.
- Производство ферментов для пищевой и кормовой промышленности.

2.3 Пример использования *K. phaffii* для синтеза белка бета-лактоглобулина

Ранее коллективом лаборатории биохимической генетики СПбГУ и моим научным руководителем был получен вектор pPICZ-BLG. Он представляет собой кольцевую замкнутую молекулу ДНК с определенными последовательностями нуклеотидов.

В составе этой молекулы закодирован искусственный ген, содержащий промотор от гена *AOX1*. Это собственный ген дрожжей *K. phaffii* и его промотор будет работать в клетках этих дрожжей, обеспечивая процесс транскрипции. После промотора *AOX1* встроена кодирующая последовательность белка бета-лактоглобулина (рис. 2). Синтезированная в ходе транскрипции иРНК будет содержать эту последовательность. В процессе трансляции данный фрагмент будет отвечать за синтез белка в клетках *K. phaffii* (рис. 3).

Такая молекула ДНК (вектор) доставляется в клетки дрожжей и там встраивается в их геном. Для этого используются специальные методы трансформации. Встроенный в геном вектор содержит искусственный ген,

обеспечивающий синтез в клетках дрожжей белка бета-лактоглобулина (рис.4). При этом белок не только синтезируется, но и выделяется клетками в среду (секретируется). Это сделано для того, чтобы максимально облегчить дальнейшую очистку белка.

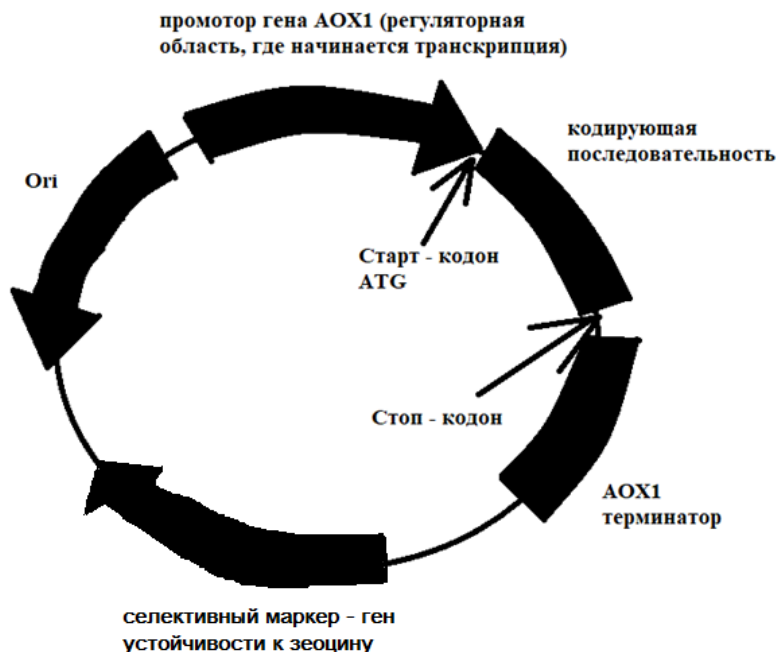


Рисунок 2. Схема вектора pPICZ-BLG с искусственным геном, содержащим промотор от собственного гена дрожжей *K. fragilis* (AOX1) и кодирующую последовательность белка бета-лактоглобулина.

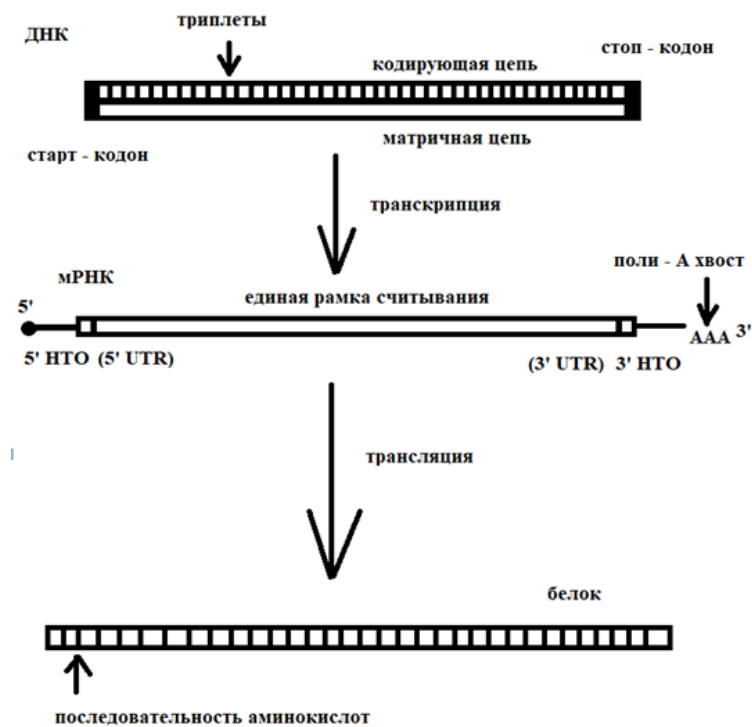


Рисунок 3. Схема реализации генетической информации на основе искусственного гена в составе вектора pPICZ-BLG

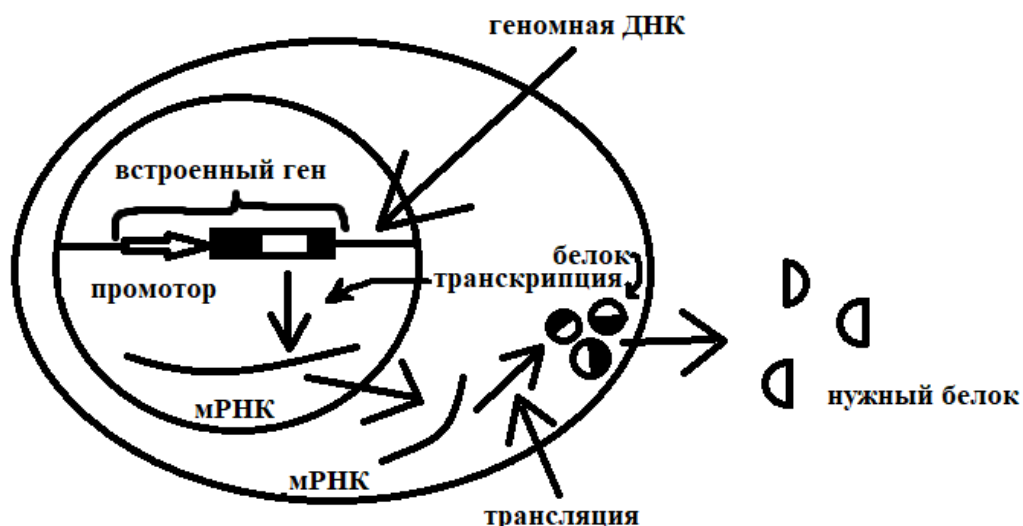


Рисунок 4. Схема отражающая процессы синтеза и секреции бета-лактоглобулина штаммом дрожжей, получаемым с использованием вектора *pPICZ-BLG*.

3. Актуальность работы

Для чего нужно синтезировать бета-лактоглобулин в организмах – продуцентах? Дело в том, что в ряде перспективных исследований этот белок использовали для получения гелей и аэрогелей. Их возможно использовать как основу медицинских материалов, например повязок при заживлении ран [2].

Предпосылкой для получения вектора *pPICZ-BLG* и проведения работы по синтезу белка в дрожжах стала идея о получении аэрогелей на основе смеси вариантов бета-лактоглобулина. При этом основу аэрогеля может составлять дешевый природный белок, выделенный из сыворотки молока. При получении геля к нему может быть добавлен синтезированный в продуцентах рекомбинантный бета-лактоглобулин, содержащий дополнительные белковые домены. За счёт такого подхода возможно получение аэрогелей с дополнительными свойствами и активностями.

Для того, чтобы клетки дрожжей выделяли синтезируемый белок в среду в состав его кодирующей последовательности добавлена последовательность, кодирующая сигнал секреции. В ходе синтеза белка она обеспечит его направление по пути секреции, а затем будет отрезана ферментами клетки (рис. 5).

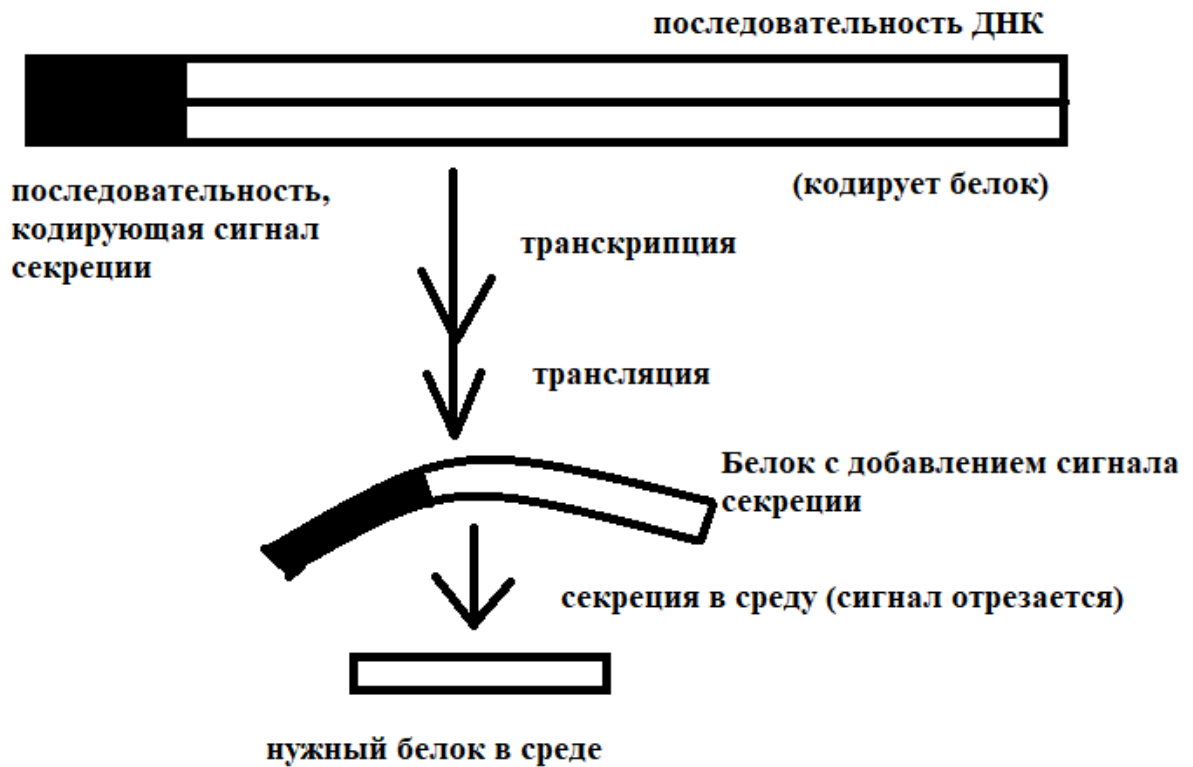


Рисунок 5. Схема отражающая расположение и значение сигнала секреции, обеспечивающего выделение бета-лактоглобулина клетками дрожжей в среду.

Было показано [3], что если удалить из использованного сигнала секреции несколько аминокислот ($\Delta 57 - 70$), то он начинает эффективнее работать. Синтезируемый белок при этом эффективнее выделяется в среду.

II. Цель и задачи:

Цель работы:

На основе исходного вектора рPICZ-BLG получить модифицированный вариант (рPICZ-Δ-BLG), содержащий делецию нуклеотидов, кодирующих аминокислоты 57 – 70 в составе сигнала секреции.

Задачи:

- 1) ПЦР амплификация (размножение) фрагмента ДНК с делецией,
- 2) Трансформация бактерий полученным фрагментом,
- 3) Выделение плазмидной ДНК,
- 4) Проверка наличия нужной делеции в полученной плазмиде рPICZ-Δ-BLG

III. Методы и инструменты

1. Метод ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод в молекулярной биологии, который позволяет получать клоны гена интереса. Также активно применяется в медицине, благодаря ему можно проводить диагностику заболеваний.

1.1. Компоненты для проведения ПЦР:

- ДНК – матрица
- Два праймера. Один – прямой праймер (Forward), второй – обратный (Reverse).
- Термостабильная ДНК – полимеразы. Их существует очень много, они классифицируются по количеству ошибок на число нуклеотидов и по температуре, которую они могут выдержать.
- Нуклеотиды (строительный материал)
- Ионы Mg^{2+} для работы ДНК – полимеразы
- Буферный раствор

1.2. Используемая смесь для ПЦР:

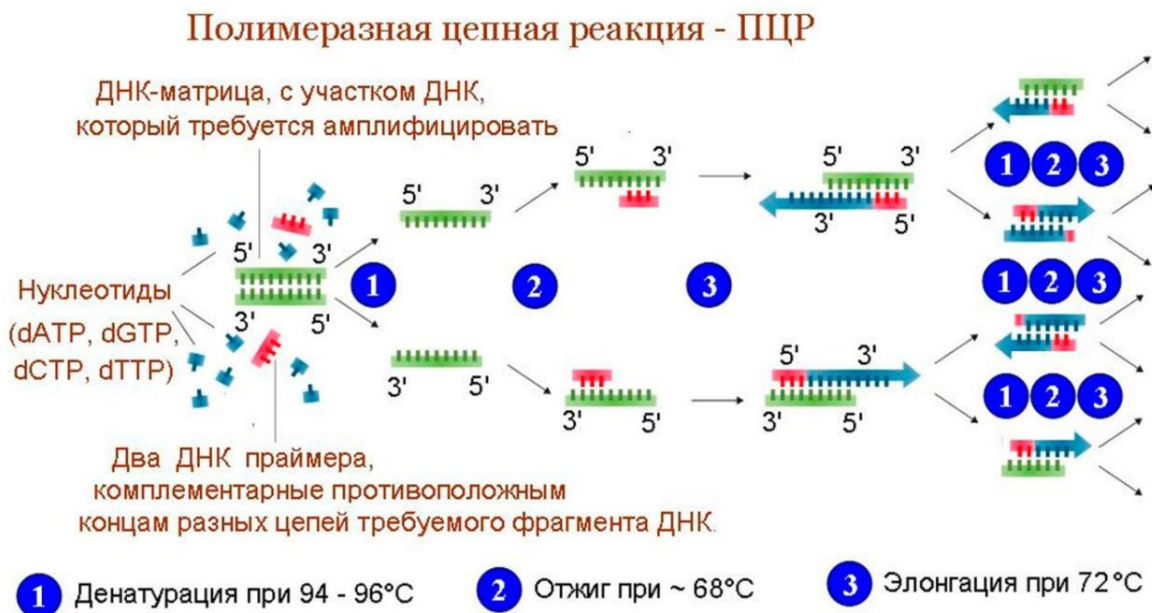
| Собираем смесь для ПЦР: | Опыт на 1 пробу: | Контроль на 1 пробу: |
|--|------------------|----------------------|
| Раствор плазмидной ДНК | 0,2 мкл | - |
| Раствор праймера 1 (прямой) 100рМ/мкл | 0,2 мкл | 0,2 мкл |
| Раствор праймера 2 (обратный) 100рМ/мкл | 0,2 мкл | 0,2 мкл |
| Раствор нуклеотидов 50х | 0,5 мкл | 0,5 мкл |
| Буферный раствор 10х | 2,5 мкл | 2,5 мкл |
| Раствор полимеразы Thersus 50х (Евроген, Россия) | 0,4 мкл | 0,4 мкл |
| Вода | 21 мкл | 21,2 мкл |

Амплификатор – устройство, в котором проходит реакция ПЦР. Он нагревает и охлаждает пробирки по ходу циклов

Реакция ПЦР состоит из 3 этапов:

- 1) Денатурация. Пробирки в амплификаторе нагреваются до температуры в 95 градусов по Цельсию. Происходит расплетание нитей ДНК.
- 2) Отжиг. Праймеры присоединяются к участкам интереса.
- 3) Элонгация. Полимеразы достраивают цепь, используя нуклеотиды.

И так происходит несколько десятков раз, чтобы размножить наш ген интереса.



1.3. Используемая программа ПЦР:

- 1) 95 градусов Цельсия – 3 минуты первичная денатурация
- 2) 95 градусов по Цельсию – 30 секунд
53 градуса по Цельсию – 30 секунд
72 градуса по Цельсию – 5 минут для полной ПЦР (или 2 минуты для аналитической ПЦР)
И таких 30 циклов
- 3) 72 градуса по Цельсию – 2 минуты. Эта стадия проводится для окончательной достройки всех фрагментов.

2. Электрофорез молекул ДНК в агарозном геле

- Взвесил необходимое количество порошка агарозы и смешал его с соответствующим объемом буфера для электрофореза ТАЕ в колбе (0,35 г на 50 мл геля – 0,7% гель).
- Разогрел раствор в микроволновой печи до полного растворения агарозы, периодически помешивал. Старался избегать закипания.
- Дал раствору остыть примерно до температуры (60°C). Добавил краситель для ДНК (dsSafe безопасная альтернатива бромистому этидию) и аккуратно перемешал.
- Вылил расплавленную агарозу в форму для заливки геля, вставил гребенку для создания углублений. Дал ему полностью застыть, что заняло 20-30 минут.

- Смешал образцы ДНК с добавочным красителем. Краситель содержал глицерин, который помогал ДНК проникать в лунки, и видимый маркерный краситель для отслеживания миграции молекул в ходе электрофореза.
- Вынул «расческу» из затвердевшего геля и поместил поддон с гелем в камеру для электрофореза так, чтобы углубления располагались рядом с отрицательным (черным) электродом.
- Заполнил камеру достаточным количеством жидкого буфера ТАЕ, чтобы покрыть гель на 1-2 мм.
- Используя микропипетку, аккуратно поместил образцы ДНК в отдельные лунки. Внес ДНК – маркер (Евроген 1 kb или 100 bp)

3. Выделение ДНК из агарозного геля

Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля использовал набор от фирмы «Евроген» (Россия) Cleanup Standard. Следовал прилагаемому протоколу:

1. Вырезал фрагмент геля, содержащего ДНК. Поместил его в пробирку. Взвесил пробирку относительно пустой.
2. В пробирку с гелем добавил 3 объёма «Связывающего раствора». Объём рассчитывал исходя из веса геля (1 мг соответствует 1 мкл).
3. Инкубировал смесь при температуре 55°C до полного растворения геля. Для ускорения растворения перемешивал раствор встряхиванием пробирки.
4. Перенес подготовленный образец в колонку с фильтром и центрифугировал 30 секунд. Все центрифугирования проводил при 10000 оборотах в минуту. Удалил профильтрованный раствор из собирательной пробирки.
5. Добавил в колонку 700 мкл «Промывочного раствора», центрифугировал 30 секунд. Удалил раствор из собирательной пробирки. Повторил этот пункт.
6. Центрифугировал пустую колонку 1 минуту для полного удаления промывочного раствора.
7. Перенес колонку в новую пробирку объёмом 1,5 мл.
8. Оставил при комнатной температуре не менее чем на 5 минут для полного испарения остатков спирта, который был в «Промывочном растворе».
9. Не касавшись наконечником мембраны колонки, нанес в её центр 30 мкл «Элюирующего раствора». Оставил при комнатной температуре не менее чем на 5 минут для полного растворения ДНК.
10. Центрифугировал 1 минуту для сбора очищенной ДНК.

4. Трансформация и культивирование бактерий

Клетки бактерий кишечной палочки штамма DH5a, способные поглощать ДНК, были подготовлены и предоставлены научным руководителем. Проводили доставку в них ДНК (трансформацию) по следующей методике:

1. ДНК раствор добавил к бактериальным клеткам и помешал.
2. Держал при 4°C 25 минут.
3. Поставил в термостат на 30 секунд на 42°C.
4. Добавил 900 микролитров жидкой питательной среды LB.
5. Держал 30 минут при 37°C.
6. Центрифугировал 3 минуты 6000 оборотов – осадив клетки.
7. Слил среду. Осадок клеток развел в её остатке (около 70 мкл).
8. Втирал клетки в питательную среду с антибиотиком зеоцином. (концентрация 200 мкг/мл).

5. Выделение ДНК из клеток бактерий

Для выделения плазмидной ДНК из клеток бактерий использовал набор от фирмы «Евроген» (Россия). Следовал прилагаемому протоколу:

- Подготовил и промаркировал пробирки объемом 2 мл по числу образцов.
- Перенес 2 мл бактериальной культуры в промаркированную пробирку.
- Осадил клетки центрифугированием (не более 1 700 g) в течение 1 минуты. Полностью удалил супернатант.
- Добавил 250 мкл Ресуспендирующего раствора с РНКазой А к осадку и тщательно перемешал на вортексе до образования мутной суспензии.
- Добавил 250 мкл «Лизирующего раствора». Содержимое пробирки осторожно перемешал переворачиванием, пока лизат не стал прозрачным. Инкубировал при комнатной температуре не более 1 минуты.
- Подготовил и промаркировал колонки с собирательными пробирками по числу образцов.
- Добавил 350 мкл «Нейтрализующего раствора». Осторожно перемешал переворачиванием содержимое пробирки до образования творожистой взвеси. Инкубировал при комнатной температуре 1 минуту. Не использовал вортекс.
- Центрифугировал пробирку в течение 10 минут с ускорением 11 000 g.
- Перенес осветленный супернатант в колонку и центрифугировал в течение 30 секунд. Удалил фильтрат из собирательной пробирки. Колонку вернул в собирательную пробирку.
- Добавил 700 мкл разбавленного «Промывочного раствора» в колонку. Центрифугировал в течение 30 секунд.
- Удалил фильтрат из собирательной пробирки. Колонку вернул в собирательную пробирку.

- Повторил два предыдущих пункта.
- Центрифугировал пустую колонку 1 минуту для полного удаления «Промывочного раствора».
- Подготовил и промаркировал пробирки объемом 1.5 мл по числу образцов.
- Собирательную пробирку утилизировал. Поместил колонку в новую промаркированную пробирку.
- Оставил колонку в пробирке с открытой крышкой при комнатной температуре на 5 минут для полного испарения остатка спирта.
- Нанес в центр мембраны 50 мкл «Элюирующего раствора».
- Инкубировал при комнатной температуре 1 минуту. Центрифугировал в течение 1 минуты. Элюат содержал очищенную ДНК

IV. Ход работы

На первом этапе с помощью метода ПЦР размножил фрагмент кольцевой ДНК pPICZ-BLG (рис. 6). при этом использовал праймеры, представленные в научной работе [3] - newdel57-70-F GCCATTTTCCGCCAGCATTGCTGCTAAAG и newdel57-70-R CAATGCTGGCGGAAAATGGCAAAACAGCAAC.

В составе фрагмента есть вся последовательность исходного вектора, кроме участка, кодирующего аминокислоты 57-70 в составе сигнала секреции. Согласно статье [3] удаление (делеция) этого участка повышает эффективность процесса секреции – выделения белка в среду.

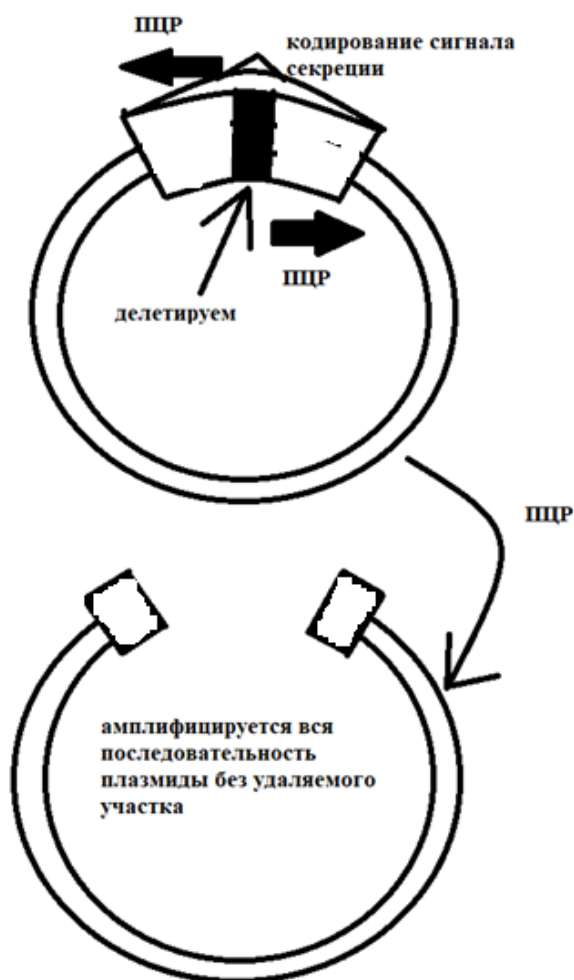


Рисунок 6. Принципиальная схема амплификации фрагмента вектора pPICZ-BLG.

На втором этапе провел проверку результатов ПЦР с помощью метода электрофореза в агарозном геле (рис. 7). Показано, что был амплифицирован нужный фрагмент.

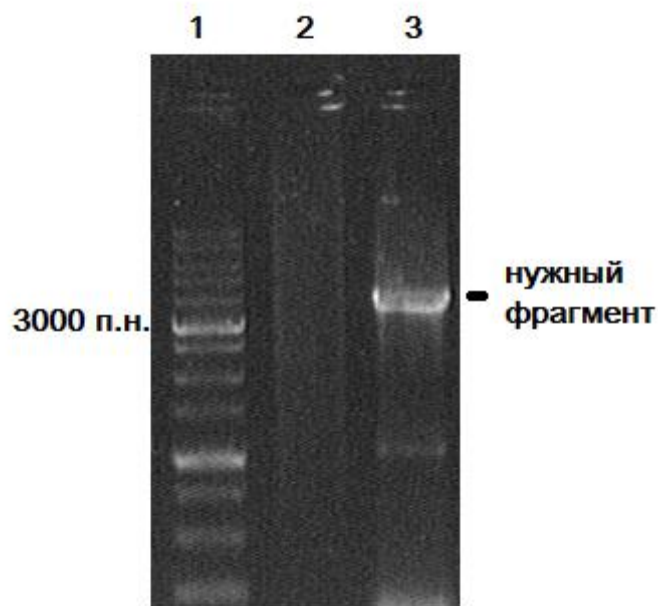


Рисунок 7. Результаты разделения фрагментов ДНК после ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле.

Дорожки:

- 1) Маркер длин ДНК Ladder Evrogen 1kb
- 2) Отрицательный контроль (– К)
- 3) Результат амплификации нужного фрагмента > 3000 п.о. (3898 п.о.)

На третьем этапе очистил из агарозного геля нужный фрагмент ДНК.

На четвертом этапе трансформировал клетки бактерий. При этом фрагмент ДНК попал в их клетки. Бактерии провели репарацию (исправление). Они соединили фрагмент ДНК в кольцо, но уже без одного участка, который требуется удалить из pPICZ-BLG (рис. 8).

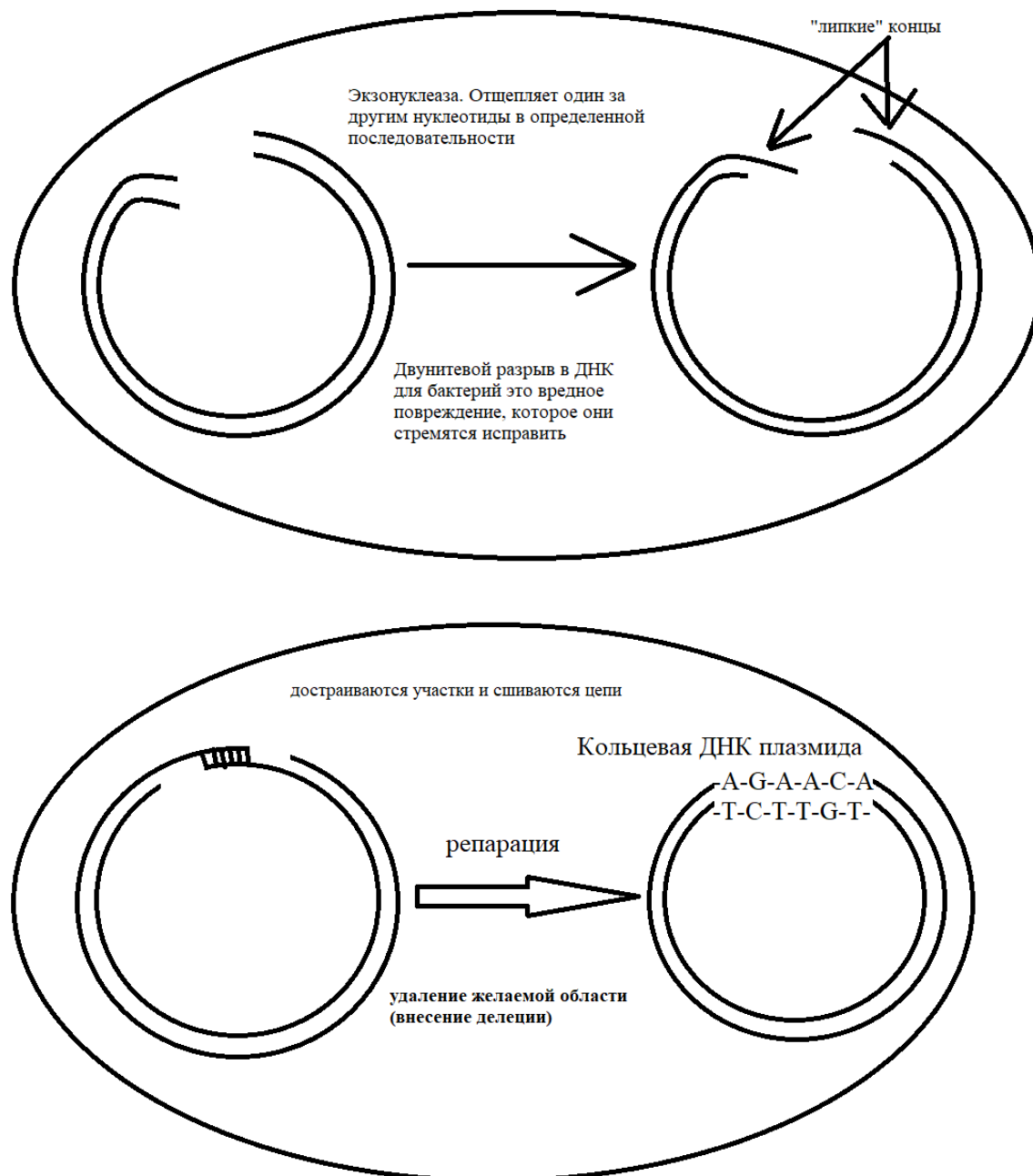


Рисунок 8. Попавший в клетки бактерий в ходе трансформации линейный фрагмент ДНК будет исправлен (репарирован) и соединен в кольцевую молекулу ДНК – плазмиду.

На пятом этапе высеял трансформированные бактерии на питательную среду с антибиотиком зеоцином. В этих условиях смогут расти и делиться только те клетки, которые захватили и репарировали фрагмент ДНК, потому что в плазмиде есть ген, дающий устойчивость к данному антибиотику.

На шестом этапе проводил культивирование отдельных трансформантов. Было взято 2 колонии отдельных колоний бактерий после трансформации. Они были высеяны и выращены на чашках Петри со средой с зеоцином. Они содержали интересующую нас плазмиду. Выделял из их клеток плазмидную ДНК.

Далее проанализировал выделенные из бактерий образцы плазмидной ДНК с помощью метода ПЦР. Использовал праймеры, которые подготовил

научный руководитель, 3' AOX1 GCAAATGGCATTCTGACATCC и 5' AOX1 GACTGGTTCSSAATTGACAAGC. С их помощью амплифицируется небольшой фрагмент с кодирующей последовательностью сигнала секреции - 917 п.н. в случае исходной плазмиды и 875 п.н. в случае наличия требуемой делеции. В качестве источника матрицы ДНК использовал выделенные плазмиды. В контрольную пробу добавил исходную плазмиду pPICZ-BLG.

На завершающем этапе провел проверку результатов ПЦР с помощью метода электрофореза в агарозном геле (рис. 9).



Рисунок 9. Результаты разделения фрагментов ДНК после анализирующей ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле.

Дорожки:

1 – контрольная проба ПЦР с добавлением исходного вектора pPICZ-BLG в качестве матрицы. Амплифицируется фрагмент с кодирующей последовательностью сигнала секреции (917 п.н.).

2 и 3 – опытные пробы ПЦР. В качестве источника матрицы использовали полученные плазмиды. Ожидается, что в этих плаزمидях будет удалён желаемый участок. Поэтому фрагменты, размноженные на их основе, будут меньше размером (875 п.н.) и пройдут дальше в геле в ходе электрофореза.

Было продемонстрировано, что на основе полученных плазмид можно размножить ожидаемый фрагмент ДНК. А значит, эти плазмиды получены на основе исходного вектора pPICZ-BLG. Но из-за того, что в этих плазмидях удалён желаемый участок в области, кодирующей сигнальную последовательность, получаемый в ходе фрагмент ДНК меньше контрольного, размноженного на основе исходного вектора pPICZ-BLG. В дальнейшем планируется проверить полученные плазмиды с помощью метода секвенирования. А затем полученные векторы будут использованы для работы с дрожжами в качестве организма-продуцента. И будет изучено влияние удаления участка вектора на синтез бета-лактоглобулина.

V. Результат работы

В ходе работы были предположительно получены модифицированные векторы pPICZ- Δ -BLG, в которые введена делеция ($\Delta 57 - 70$) в сигнал секреции. На основе литературных данных [3] можно предположить, что такая модификация повысит эффективность секреции синтезируемого в дрожжах бета-лактоглобулина.

VI. Список литературы

- 1) https://elementy.ru/trefil/74/Tsentrlnaya_dogma_molekulyarnoy_biologii
- 2) Min Gong, Huanhuan Shi, Zuquan Hu, Fang Wang, Meiling Dong, Ronghua Lei, Zhu Zeng, Yun Wang, Jin Chen, Aerogel-hydrogel biphasic gels based on physically crosslinked β -lactoglobulin fibrils/polyvinyl alcohol for skin wound dressings: In vitro and in vivo characterization, Chemical Engineering Journal, Volume 473, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145394>.
- 3) Lin-Cereghino G. P. и др. The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris* // Gene. 2013. Т. 519. № 2. С. 311–317.