**Получение безмаркерных штаммов *Penicillium verruculosum***

***Ерошенко Н.С.1, Синельников И.Г. 2, Зоров И.Н.1,2***

*Студент, 6 курс специалитета*

*1Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*2Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

*E-mail: nikita.eroshenko@chemistry.msu.ru*

Рекомбинантные ферменты являются основой промышленной биотехнологии. В наши дни с помощью основных экспрессионных систем: бактерий, грибов и дрожжей создаются штаммы для получения основных ферментов для пищевой и кормовой промышленности. В стандартном виде процесс получения штаммов продуцентов представляет собой процесс введение в хромосому штамма реципиента экспрессионной кассеты, содержащей целевой ген, а также управляющие элементы. Но помимо интеграции целевого гена, в процессе трансформации происходит вставка других элементов векторной системы, такие как: точка начала репликации (*ori*) и гены устойчивости к антибиотикам. Однако современные требования к штаммам-продуцентам промышленных ферментов регламентируют отсутствие данных элементов в геноме, вследствие чего необходима разработка новой стратегии получения рекомбинантных штаммов.

Целью работы является апробация двух систем трансформации для получения штаммов-продуцентов на основе гриба *Penicillium verruculosum*, не несущих в геноме нерегламентированных последовательностей. В рамках исследования были протестированы два подхода. В первом методе интеграция вектора экспрессии осуществлялась с использование агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* [1]. Был разработан дизайн плазмиды на основе челночного вектора pCambia1300, содержащего: ген *XylE* под управлением нативного промотора целлобогидролазы I (*CBHI*), селективный ген гомологичной нитрат редуктазы (*NiaD*). Часть вектора, несущая эти элементы была фланкирована направляющими элементами T-плазмиды, для селективного переноса в клетки грибов. Вектор, использовался для трансформации *Agrobacterium tumefaciens*, после чего культуру *Agrobacterium* использовали в качестве носителя для интеграции целевого гена в геном гриба. Трансформация гриба проводилась сокультивированием. Было показано, что метод агробактериальной трансформации позволяет получать экспрессионные штаммы, содержащие ген ксиланазы Е. Однако методами ПЦР в реальном времени было установлено, что 90% трансформантов несли в себе вспомогательные элементы из плазмиды.

Во втором подходе трансформация проводилась по методу PEG-опосредованной трансформации [2]. Была разработана векторная система, позволяющая удалять вспомогательные элементы из вектора перед трансформацией. Плазмида, названная pFTB\_SS\_XylE, была использована для тестирования новой системы. После трансформации были получены клоны, имеющие фенотип *NiaD+* и содержащие ген *XylE* в хромосомной ДНК*.* Скрининг трансформантов показал отсутствие генов *ampR* и *ori* в хромосомной ДНК. 85% трансформантов несли более 1 копии гена *XylE*.

**Литература**

1. Michielse C. B. et.al. Agrobacterium-mediated transformation of the filamentous fungus Aspergillus awamori // Nat. Protoc. 2008. Vol. 3. № 10. P. 1671–1678.

2. Díaz A. et.al. Genetic Transformation of the Filamentous Fungus Pseudogymnoascus verrucosus of Antarctic Origin // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10