



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/11 (2021.05); C12N 15/815 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2020129013, 02.09.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.09.2020Дата регистрации:
11.08.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.09.2020

(45) Опубликовано: 11.08.2021 Бюл. № 23

Адрес для переписки:

119071, Москва, Ленинский пр-кт, 33, стр. 2,
ФГУ ФИЦ Биотехнологии РАН, патентный
отдел

(72) Автор(ы):

Синицын Аркадий Пантелеймонович (RU),
Зоров Иван Никитич (RU),
Рожкова Александра Михайловна (RU),
Синельников Игорь Геннадьевич (RU),
Синицына Ольга Аркадьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное учреждение
"Федеральный исследовательский центр
"Фундаментальные основы биотехнологии"
Российской академии наук" (ФИЦ
Биотехнологии РАН) (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2388823 C1, 10.05.2010. pGAPZα
A Plasmid. Найдено онлайн:
[https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=pGAPZ\(alpha\)_A](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=pGAPZ(alpha)_A) Находится в
электронной среде по данным сайта
web.archive.org 03.09.2019 (см. (см. прод.)(54) ИНТЕГРАЦИОННЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ МНОГОКОПИЙНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ГЕНОВ В 18SpPHK
ДРОЖЖЕЙ *Pichia pastoris*

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии и генной инженерии. Предложен
интеграционный вектор pPIG-1 для осуществления
экспрессии рекомбинантных белков в дрожжах
P. pastoris, имеющий размер 5595 п.о. ихарактеризующийся нуклеотидной
последовательностью, приведенной в SEQ ID NO
1. Изобретение обеспечивает высокую частоту
интеграции целевого гена. 3 пр., 2 табл., 2 ил.

(56) (продолжение):

[https://web.archive.org/web/20191001000000*/https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=pGAPZ\(alpha\)_A](https://web.archive.org/web/20191001000000*/https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=pGAPZ(alpha)_A)) Дата обращения 12.03.2021. NAATSAARI L. ET AL. Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. PLoS One. 2012;7(6):e39720. doi: 10.1371/journal.pone.0039720. RU 2409670 C1, 20.01.2011.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 15/11 (2021.05); C12N 15/815 (2021.05)(21)(22) Application: **2020129013, 02.09.2020**(24) Effective date for property rights:
02.09.2020Registration date:
11.08.2021

Priority:

(22) Date of filing: **02.09.2020**(45) Date of publication: **11.08.2021 Bull. № 23**

Mail address:

**119071, Moskva, Leninskij pr-kt, 33, str. 2, FGU
FITS Biotekhnologii RAN, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Sinitsyn Arkadij Pantelejmonovich (RU),
Zorov Ivan Nikitich (RU),
Rozhkova Aleksandra Mikhajlovna (RU),
Sinelnikov Igor Gennadevich (RU),
Sinitsyna Olga Arkadevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe uchrezhdenie
"Federalnyj issledovatel'skij tsentr
"Fundamentalnye osnovy biotekhnologii"
Rossijskoj akademii nauk" (FITS Biotekhnologii
RAN) (RU)****(54) INTEGRATION VECTOR FOR MULTI-COPY GENE INTEGRATION IN 18SPPHK OF PICHIA PASTORIS YEAST**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology and genetic engineering. Proposed is an integration vector pPIG-1 for expression of recombinant proteins in the *P. pastoris* yeast, with a size of 5595 bp,

characterised by a nucleotide sequence disclosed in SEQ ID NO 1.

EFFECT: invention provides a high frequency of target gene integration.

1 cl, 2 dwg, 3 ex, 2 tbl

RU 2 752 904 C1

RU 2 752 904 C1

Изобретение относится к области биотехнологии и генной инженерии. Изобретение описывает получение нового интеграционного вектора pPIG-1, имеющего модульную конструкцию и позволяющего осуществлять интеграцию и экспрессию гетерологичных генов в *Pichia pastoris*. Интеграционный вектор содержит селективный маркер для отбора трансформантов в клетках *E.coli*, сайт начала репликации, сайт интеграции и экспрессионную кассету, в состав которой входят промотор, терминатор транскрипции и кодирующую полную последовательность 18S рРНК. Особенность данного вектора заключается в использовании полноразмерной последовательности гена 18S рРНК для гомологичной рекомбинации вектора, что позволяет производить интеграцию гена вставки без выщепления нативного гена. Использование данного вектора для трансформации позволяет увеличить продуктивность штамма продуцента растительной хитиназы из *Drosera capensis*.

Изобретение относится к биотехнологии, генетической инженерии и представляет собой технологию получения вектора для мультикопийной интеграции и экспрессии различных генов в штаммах *Pichia pastoris*.

Дрожжи *Pichia pastoris* являются хорошо известными продуцентами, способными производить широкий спектр различных ферментов, антител и пептидов, продуцируя их как внутриклеточно так и в культуральную среду. Традиционно для получения штаммов продуцентов используют вектора серии pPIC (Thermo Fisher Scientific cat. №. V19520) имеющие фланкирующие участки для рекомбинации, гомологичные нативному промотору алкоголь оксидазы (*AOX1*), либо селективному гену (обычно *His4*), что позволяет получать штаммы с жестким контролем экспрессии, но при этом частота интеграции целевого гена не велика и редко превышает 5 копий на геном [Vogl et al., 2018]. Стандартным решением для получения рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris* является использование векторов серии pPICZα, имеющих удобную систему селекции на антибиотике зеоцин и обеспечивающий прогнозируемый результат при трансформации.

Несмотря на то, что *AOX1* промотор является одним из самых сильных известных промоторов в *P. pastoris*, он не всегда удобен для применения в промышленных и лабораторных условиях. Для регуляции данного промотора необходим метанол в ростовой среде. Опасность метанола и повышенные санитарно-гигиенические требования к организации работ с метанолом являются серьезным препятствием для реализации биотехнологических производств на основе индуцибельных систем экспрессии, использующих *AOX1* промотор. В связи с этим, представляется важным найти альтернативные пути, которые позволили бы использовать метилотрофные дрожжи для продукции целевого белка без использования метанола для индукции. С другой стороны, необходимо сохранить эффективность экспрессии сопоставимой с индуцибельными промоторами.

Задачей предлагаемого изобретения является расширение арсенала плазмидных векторов, пригодных для конструирования на их основе штаммов-продуцентов промышленно значимых белков.

Для решения поставленной задачи была предложена идея универсального интегративного вектора, обеспечивающего высокую частоту интеграции (мультикопийность) целевого гена.

Из коммерческих векторов, известен pGAPZα (Thermo Fisher Scientific cat. №. V20020), который позволяет получать штаммы-продуценты рекомбинантных белков, в которых экспрессия происходит конститутивно. Однако из-за конструктивных особенностей вектора, события инсерции генов в локусе промотора *GAP* возникают в результате

единичного кроссинговера между локусом и областью *GAP* промотора на векторах рGAPZ или рGAPZa. Это приводит к вставке одной копий экспрессионной кассеты с целевым геном в 3'-область от локуса *GAP* промотора, при этом множественная встройка целевого гена хоть и возможна, но вероятность данного события крайне мала.

5 Еще одним минусом данного подхода является высокая вероятность нарушения структуры гена *GAP*. В качестве селекционного маркера в данной серии плазмид используется ген *BleoR* под контролем промотора *TEF1*.

Существенным отличием предлагаемого к патентованию вектора рPIG-1 от коммерчески доступных векторов является использование полноразмерной
10 последовательности 18S рРНК для интеграции. В геноме *P. pastoris* содержится 8 копий данного гена, присутствующего на всех 4 хромосомах [Schutter De и др., 2009], тогда как обычно используемые сайты интеграции (*AOX1* промотор, *His4* и др.) представлены одной копией на весь геном. При этом при многокопийной интеграции большинство генов вставки будет сосредоточена в одном месте генома, что может негативно сказаться
15 на эффективности транскрипции.

В качестве прототипа данного вектора используется конструкция из патента RU 2388823 где успешно реализовали идею гомологичной рекомбинации по 18s рРНК. Однако в качестве плечей для рекомбинации используются не полная
последовательность 18S рРНК, а два фрагмента: 5' 18S рРНК длиной 269 п.о. и фрагмент
20 3' 18S рРНК длиной 689 п.о., что может приводить к нарушению нативной структуры гена при рекомбинации и не является оптимальным. В работе [Näätäsaari L, et al, 2012] продемонстрировано, что наибольшую частоту интеграции вставки в хромосому обеспечивают одинаковые по размеру плечи длиной более 650 п.о. Так же, в
предлагаемом изобретении осуществлена модификация нуклеотидной
25 последовательности пре-про области α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* и введен сайт рестрикции *HindIII*, что позволяет вставлять последовательность целевого гена без добавления промежуточных аминокислот на N-концевой участок секретируемого белка.

Заявляемый мультикопийный интеграционный вектор рPIG-1 для экспрессии генов
30 в дрожжах конструируют с использованием стандартных генно-инженерных методик: ПЦР, overlap-ПЦР и сборка полученных фрагментов методом Гибсона [Gibson et al., 2009].

Предложенная генетическая конструкция состоит из 3' фрагмента *18s pPHK* (18-750 п.о.), *GAP* промотора (764-1240 п.о.), модифицированный сигнал секреции гена *MF* из
35 *S. cerevisiae* (1251-1517 п.о.), сайта множественного клонирования (1518-1537 п.о.), *AOX1* терминатора (1635-1881 п.о.), *TEF1* промотора (1921-2307 п.о.), *EM7* промотора (2315-2362 п.о.), гена устойчивости к зеоцину *BleoR* (2381-2755 п.о.), *CYC1* терминатора (2821-3068 п.о.) 5' фрагмента *18s pPHK* (3069-3870), гена устойчивости к ампициллину *AmpR* (3837-4842 п.о.) и точки начала репликации *ori* (5013-6 п.о.). Плечи для интеграции
40 образуют полноразмерный ген 18S рРНК. Вектор имеет модульную структуру. Перед последовательностью *GAP* промотора введен сайт рестрикции *KpnI*. Между *GAP* промотором и пре-про сегментом α -фактора введен сайт рестрикции *NdeI*, что позволяет свободно менять сигнальные пептиды и промоторы, получая на основе интегративного вектора рPIG-1 новые конструкции. Кассета, содержащая *AmpR* и *ori* фланкированы
45 сайтами *ApaI*, которые выщепляются при линеаризации вектора перед трансформацией, что позволяет избегать вставки бактериальных генов в геном дрожжей.

Именно такое сочетание элементов вектора дает возможность эффективной трансформации *Pichia pastoris* и множественной интеграции в геном целевой

последовательности.

Для демонстрации эффективности нового вектора pPIG-1 были проведены эксперименты по клонированию в него гена *chi19*, кодирующего растительную хитиназу 19-го семейства гликозилгидролаз [AN GeneBank: MK093978.1]. Данный фермент был
 5 выбран в связи с его потенциальной промышленной значимостью для сельского хозяйства и невозможностью его получения в других экспрессионных системах из-за либо нерастворимости (в клетках *E.coli*), либо токсичности для хитинсодержащей клеточной стенки (в случае экспрессии в мицелиальных грибах) [Синельников и др., 2020].

Изобретение иллюстрируется следующими изображениями:

Рис. 1 - карта вектора pPIG-1

Рис. 2 - электрофореграмма культуральной жидкости pPIG_Chit19 и pPICZ_Chit19

Изобретение сопровождается двумя таблицами:

Таблица 1 - Структура праймеров, использованных при получении интеграционного
 15 вектора pPIG-1

Таблица 2 - Количество копий гена *chi19* в геноме продуцентов хитиназы 19 семейства pPIG_Chit19 и pPICZ_Chit19

Пример 1 Получение интеграционного вектора pPIG-1

Поставленная задача решена путем конструирования интеграционного вектора pPIG-1
 20 для экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*. Сконструированный вектор имеет размер 5595 п.о. (SEQ ID NO 1) (рис. 1)

Фрагмент ДНК размером 1747 п.о. (SEQ ID NO 2), кодирующий последовательность *ori* и гена устойчивости к ампицилину *bla* получают при помощи ПЦР с использованием Phusion™ High-Fidelity DNA полимеразы (Thermo Fisher Scientific) и праймеров N3865F
 25 и N16R. На концах олигонуклеотидных праймеров добавлены последовательности, кодирующие сайты рестрикции *ApaI*. В качестве матрицы для ПЦР используют плазмиду pUC19 [<https://www.addgene.org/50005/>].

Фрагмент ДНК (SEQ ID NO 3), кодирующий кассету обеспечивающую устойчивость трансформантов к Зеоцину, который состоит из: фрагмента множественного сайта
 30 клонирования, 6His метки, AOX1 терминатора, дрожжевого TEF1 промотора, бактериального промотора EM7, гена *ble*, CYC1 терминатор размером 1558 п.о. При помощи ПЦР с использованием Phusion™ High-Fidelity DNA полимеразы и праймеров N749F и N1254R. В качестве матрицы для ПЦР используют коммерческую плазмиду pPICZAα (Thermo Fisher Scientific Каталожный номер: V19020). Фрагмент получают
 35 при помощи ПЦР с использованием Phusion™ High-Fidelity DNA полимеразы и праймеров N1520F и N3077R.

Фрагмент ДНК, кодирующий сигнал секреции α-фактора и часть множественного сайта клонирования длиной 298 п.о. (SEQ ID NO 4) получают при помощи ПЦР с
 40 использованием Phusion™ High-Fidelity DNA полимеразы (Thermo Fisher Scientific) и праймеров N1237F и N1534R. В качестве матрицы для ПЦР используют коммерческую плазмиду pPICZAα.

Для получения нижеперечисленных элементов конструкции, из штамма штамма *Pichia pastoris GS115* (Thermo Fisher Scientific cat. № C18100) выделяют хромосомную ДНК [Lõoke, et al 2011], которая служит матрицей для синтеза GAP промотора, и
 45 фрагментов гена 18S рРНК.

Фрагмент ДНК кодирующий промотор глицеральдегид-3-фосфат - дегидрогеназы (GAP промотор) [GenBank NC_012964.1] длиной 506 п.о. фланкированный сайтами рестрикции *KpnI* и *NdeI* (SEQ ID NO 5),. получают при помощи ПЦР с использованием

Phusion™ High-Fidelity DNA полимеразы и праймеров N749F и N1254R. В качестве матрицы для ПЦР используют геномную ДНК штамма *Pichia pastoris GS115*

Фрагмент, кодирующий 3' конец 18S рРНК (SEQ ID NO 6) получают при помощи ПЦР с использованием Phusion™ High-Fidelity DNA полимеразы и праймеров N1F и N763R. В качестве матрицы для ПЦР используют геномную ДНК штамма *Pichia pastoris GS115*.

Фрагмент, кодирующий 5'-конец 18S рРНК (SEQ ID NO 7) получают при помощи ПЦР с использованием Phusion™ High-Fidelity DNA полимеразы и праймеров N3062F и N3882R. В качестве матрицы для ПЦР используют геномную ДНК штамма *Pichia pastoris GS115*.

Праймеры, использованные при получении интеграционного вектора представлены в Таблице 1.

Таблица 1 - Структура праймеров, использованных при получении интеграционного вектора pPIG-1

Название	Последовательность 5'→3'
N1F	TGGAAAAACGGGCCCCGCAGGTTACCTACGGAA
N16R	CGGGCCCGTTTTCATAGGCTCCGC
N749F	CTGGGGTACCATCCTTTTGTAGAAATGTCTTGG
N763R	AGGATGGTACCCAGATACCGTCGTAGTCTT
N1237F	CTATCCATATGGAATGAGATTTCCTTCAATT
N1254R	TCATTTCCATATGGATAGTTGTCAATTGAT
N1520F	TGCAGGCGGCCGCGAGCTCATCATCATCATCATG
N1534R	TCCGCGCCGCCTGCAGAAGCTTCAGCCTCTCTTTTC
N3062F	ATTTGCTCATCTTCGATCCCCTAAC
N3077R	CGAAGATGAGCAAATTAAAGCCTTCGAGC
N3865F	GAGACAAGGGCCCGCGGAACCCCTATTGT
N3882R	TCCGCGGGCCCTTGTCTCAAAGATTAAGC

Аmplифицированные фрагменты ДНК очищают из геля, используя с этой целью набор Qiagen (Qiagen, cat. №28706)

Далее очищенные фрагменты 2, 3, 4, 5, 6 и 7 смешивались в эквимоллярных количествах и лигировались по методу Гибсона с применением Gibson Assembly® Master Mix (NEB cat. № E2611S). Полученной лигазной смесью трансформируют компетентные клетки *Escherichia coli* One Shot™ Mach1™ (Thermo Fisher Scientific cat. № C862003), после стандартной процедуры трансформации [Маниатис, 1984] клетки разводят в три раза средой LB и инкубируют при 37°C 1 час, после чего высевают на агар LB, содержащий ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Посевы инкубируют 24 часа при 37°C, после чего выросшие ампициллин-резистентные колонии выращиваются в 5 мл среды LB, после чего выделяют плазмидную ДНК при помощи набора QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN Cat No.12123). Правильность сборки всех элементов проверяется путем секвенирования по методу Сэнгера. При расщеплении рестриктазами: ApaI, KpnI, HindIII и NdeI вектор pPIG-1 дает фрагменты массой 2363, 1733, 743 и 270 п.о., что позволяет надежно идентифицировать данную конструкцию.

Схема интеграционного вектора pPIG-1 приведено на Рисунке 1.

Пример 2 Создание штамма продуцента растительной хитиназы 19-ого семейства (pPIG_Chit19) на основе вектора pPIG-1

Для проверки применимости, полученного в примере 1, интеграционного вектора для создания штаммов продуцентов, был создан штамм-продуцент растительной хитиназы на основе штамма *Pichia pastoris* GS115.

Синтетический ген растительной хитиназы 19 семейства (SEQ ID NO 8)

амплифицируют при помощи Phusion™ High-Fidelity полимеразы и праймеров ChitF (5'-AAGCTTGTCCAGTGTGGTAGCGAAGTCG-3') и ChitR (5'-ATGCGGCCGCTCAGCTGAACGGACGTTGATTG-3'). Полученный ПЦР-фрагмент обрабатывают рестриктазами *HindIII* и *NotI* и очищают из геля, используя набор Qiagen (Qiagen, cat. № 28706).

Вектор pPIG-1 обрабатывают рестриктазами *HindIII* и *NotI*, после чего очищают из геля, используя набор Qiagen (Qiagen, cat. № 28706).

Вектор и вставка смешиваются в соотношении 1 к 5 и лигируются T4 лигазой (Thermo Fisher Scientific cat. № EL0011). Лигазной смесью трансформируют компетентные клетки *Escherichia coli* One Shot™ Mach1™ (Thermo Fisher Scientific cat. № C862003), после стандартной процедуры трансформации [Маниатис, 1984] клетки разводят в три раза средой LB и инкубируют при 37°C 1 час, после чего высеваяют на агар LB, содержащий ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Посевы инкубируют 24 часа при 37°C, после чего выросшие ампициллинрезистентные колонии выращиваются в 5 мл среды LB, после чего выделяют плазмидную ДНК при помощи набора QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN Cat No. 12123). Правильность сборки плазмидной ДНК проверяют путем секвенирования по методу Сэнгера в обоих направлениях. В результате получена конструкция pPIG_Chit19.

Для проведения трансформации pPIG_Chit19 препаративно выделили из клеток *E. coli* и линейаризовали с помощью рестриктазы *ApaI*. Трансформацию линейаризованной pPIG_Chit19 проводили с использованием электропорации и последующим отбором трансформантов на среде, содержащей 300 мкг/мл зеоцина (Thermo Fisher Scientific, cat. № R25005). Полученные штаммы-трансформанты серии pPIG_Chit19 пересевали на стандартную среду YPD. В результате был получен штамм продуцент pPIG_Chit19.

Продуктивность полученного штамма определяют путем скрининга 10 выбранных клонов путем анализа культуральной жидкости на содержание целевого белка. Штаммы культивировали в 10 мл стандартной среды YP с добавлением 2% глицерина в течении 36 часов и анализировали культуральную жидкость методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (рис. 2).

Таким образом за 36 часов культивирования после скрининга определен выход целевой хитиназы в культуральной жидкости каждого штамма, который составил от 20 до 150 мг/л. Выход белка определялся количественно методом Лоури [Lowry и др., 1951]

Для сравнения эффективности были создан штамм продуцент pPICZ_Chit19, представляющий собой штамм *Pichia pastoris* GS115, который был трансформирован плазмидой, представляющей собой коммерческий вектор pPICZAα (Invitrogen, США), трансформированный синтетическим геном хитиназы 19 семейства под контролем *AOX1* промотора. Выбранные трансформанты были ферментированы согласно рекомендациям производителя [Thermo Fisher Scientific MAN00000034]. Что позволило получить выходы от 10 до 30 мг/л chit19 на 4 сутки после индукции метанолом.

В данном примере показано, что при использовании плазмид на основе pPIG-1 удастся получать целевой белок (в данном случае растительную хитиназу 19-ой семьи гликозилгидролаз) с эффективностью, сопоставимой с сильным индуцибельным промотором *pAOX1*, при этом не требуется использование сложных сред и добавление метанола в качестве индукции.

Пример 3 Определение частоты интеграции структурных элементов вектора pPIG-1 с геном *chi19*

Для измерения частоты интеграции конструкции pPIG_Chit19 в геном *Pichia Pastoris*

используют ПЦР в реальном времени. В трех наиболее продуктивных штаммах pPIG_Chit19 и pPICZ_Chit19(из примера 2)анализировали количество последовательностей *pAOX1* (промотор алкогольоксидазы 1) *chi19*(хитиназа *D.capensis*), *pGAP*(промотор глицеральдегид-3-фосфат - дегидрогеназы) и *act* (актин) в геноме трансформантов, показавших наибольшую продуктивность. В качестве контроля и образца для построения калибровочных кривых использовали родительский штамм *Pichia pastoris GS115*. Результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2 - Количество копий структурных элементов в геноме продуцентов хитиназы 19 семейства pPIG_Chit19 и pPICZ_Chit19.

Вариант штамма Ppastoris	количество копий			
	pAOX1	pGAP	chi19	act
GS115	1	1	0	1
pPIG_chit19/1	1	14	12	1
pPIG_chit19/2	1	8	9	1
pPIG_chit19/3	1	10	10	1
pPICZ_Chit19/1	3	1	2	1
pPICZ_Chit19/2	3	1	3	1
pPICZ_Chit19/3	3	1	1	1

Для проверки точности и стабильности количественного определения были построены стандартные кривые для всех генов. Значения коэффициента вариации (CV) для данных последовательностей составили от 0,55% до 6,15%, а значения стандартного отклонения (SD) варьировалось от 0,03 до 0,16. Эти данные показали, что значения CV и SD незначительно различались в экспериментах, указывая на то, что системы РТ-ПЦР функционировали стабильно и надежно.

Максимальное количество копий гена Chit 19 в геном дрожжей составило 12 для штамма продуцента pPIG_chit19/1, что в 4 раза выше, чем максимальное число интеграций при использовании конструкций на основе коммерческого вектора pPICZAα. Количество GAP промоторов увеличивается пропорционально количеству интеграций гена Chit 19, что говорит о введении полной экспрессионной кассеты, а не отдельных ее элементов.

Таким образом, полученный интеграционный вектор pPIG-1 повышает эффективность интеграции экспрессионной кассеты в геном *P. pastoris GS115* в 4~12 раз по сравнению с коммерческим вектором pPICZAα.

Список используемых источников

1. Gibson D.G., Young L., Venter C., Hutchinson C., Smith H. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases // Nat. Methods. 2009. Т. 6. № 5. С. 343–345.
2. RU 2388823 (10.05.2010). Интегративный плазмидный вектор для экспрессии генов в дрожжах.
3. Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications // Biotechniques. 2011. Т. 50. № 5. С. 325–328.
4. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование'; Маниатис, Т.И.; Фрич, Э.; Сэмбрук, Дж.; Изд-во: М.: Мир, 1984 г
5. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // J. Biol. Chem. 1951. Т. 193. № 1. С. 265–275.
6. Näätäsaari L, Mistlberger B, Ruth C, Hajek T, Hartner FS, Glieder A. Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology// PLoS One. 2012;7(6):e39720.
7. Schutter K. De, Lin Y-C., Van Hecke A., Glinka S., Weber-Lehmann J., Rouze P., Peer Y.,

Cakkewaert N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris* // Nat. Biotechnol. 2009. Т. 27. № 6. С. 561–566.

8. Vogl T., Gebbie L., Palfreyman R., Speight, R. Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris* // Appl. Environ. Microbiol. 2018. Т. 84. № 6.

9. Синельников И.Г. и др. Клонирование и экспрессия новой хитиназы из хищных растений *Drosera Capensis* // Вестник Московского университета. Серия 2 Химия. 2020. Т. 61. № 5. С. 361–368.

SEQ ID NO 1

TGGAAAAACGGGCCCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTC
CTCTAAATGACCAAGTTTGTCCAAGTTCAGGCTCGCGCCCTCCCAAAGCCTCACTAA
ACCATTCATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCA
GCGCGAGCTGATGACTCGCGCTTACTAGGAATTCCTCGTTGAAGCGCCTCTTGCAAA
GCGCTATCCCCAGCACGACGGAGTCTAAGATTCCCCGGCCATCTCTGGCAAGGACT
CGCTGCCTCCGTCAAGTGTAGCGCGCGTGC GGCC CAGAACGTCTAAGGGCATCACAG
ACCTGTTATTGCCTCGCTTCCGCTGGCTTGCGCCAGTTGTCCTTCTAAGAAGATCCCC
CAGCAATGCCAGGTAACCTAGTTAAAAGCCAAGGTCTCGTTCGTTATCGCAATTAA
GCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCACAAAATCA
AGAAAGTGCTCTCATCCTGTCAATCCTCATTGTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCCG
TGTTGAGTCAAATTAAGCCGCAGGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCC
TTTAAGTTTCAGCCTTGCGACCATACTCCCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTC
GTAAGGTGCCGGGGAAGGCTATTCCCCGATCCCTAGTCGGCATCGTTTATGGTTAAG
ACTACGACGGTATCTGGGGTACCATCCTTTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCTCGTC
CAATCAGGTAGCCATCTCTGAAATATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCT
GGCAACGTAAAATTCTCCGGGGTAAACTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAAC
GTCTCTTCCCTTCTCTCTCCTTCCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACTCT
GCTGGAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAATGCTCTTCCCAGCATTACGTTG
CGGGTAAAACGGAAGTCGTGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGGAAAAGTCCCCG
GCCGTGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGAGATTATTGGAAACCAC
CAGAATCGAATATAAAAGGCGAACACCTTTCCCAATTTTGGTTTCTCCTGACCCAAA
GACTTTAAATTTAATTTATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAACCTATCCATATGG
AAATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGC
TGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTG
TCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAA
CAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAA
AGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTCTGCAGGCGGCCGC
GAGCTCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAG
TTCAAGTTGGGCACCTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATG
TCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTTGATACTTTTTTATTTGTA
ACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTTGTCATTTTGTCTTCTCTCGTACGAGCTTGCTCCT
GATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCATT
CGAGTTTGATGTTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGT
GAGACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACACACCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCC
TTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCACTTCAAAACAC
CCAAGCACAGCATACTAAATTTTCCCTCTTCTTCTCCTCTAGGGTGTGCTTAATTACCC
GTAATAAGGTTTGGAAAAGAAAAAGAGACCGCCTCGTTTCTTTTTCTTCGTGCGAA
AAAGGCAATAAAAATTTTTATCACGTTTCTTTTTCTTGAAATTTTTTTTTTAGTTTTT
TTCTCTTTCAGTGACCTCCATTGATATTTAAGTTAATAAACGGTCTTCAATTTCTCAA

GTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTCTATTACAACCTTTTTTTACTTCTTGTTCATTAGAAA
 GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGT
 ATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGTTGACC
 AGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGTCGCCGGAGCGGTGAGTTCTGGAC
 5 CGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCG
 GGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACA
 CCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCCGAG
 GTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCCTCCGGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGA
 GCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCCT
 10 TCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCGACGGCGGCCACGGGTCCCAGGCCT
 CGGAGATCCGTCCCCCTTTTCTTTTGTGCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTA
 CATTCACGCCCTCCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACC
 TGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTT
 ATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAAACATTATAC
 15 TGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCTCATCTT
 CGATCCCCTAACTTTCTTCTTGATTAATGAAAACGTCCTTGCGCAATGCTTTTCGA
 GTAGTTAGTCTTGGGGCGATCCAAGAATTTACCTCTGACGCCCAATACTGACGCC
 CCCGACCGTCCCTGTTAATCATTACGCGGCCCCGAACCAACAAAAGAACCGTATCC
 TCTTCTGTTATTCCATGCTAATATATTCAACTACTGCCTTGAACACTCTAATTTCTC
 20 AAAGTAACGTCCGTTCAACTACGAGCTTTTTAACTGCAACAACCTTTAATATACGCTA
 TTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGTTCTCG
 TTAAGGTATTTACGTTGTACTCATTCCAATTACAAGACCAAAGGCCCTGTATCGTTA
 TTTATTGTCACTACCTCCCTGTGTCAGGATTGGGTAAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCC
 TTGGATGTGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCCTTATCCCCG
 25 TTACCCGTAGAAACCATGGTAGGCCTCTATCCTACCATCGAAAGTTGATAGGGCAG
 AAATTTGAATGAACCATCCTAAGATTCGAAAAGTTATTATGAATCACCAAAACGAA
 GGTTTTATCTAATAAATACGCCCCGAGGGCTGATCAAGTATTAGCTCTAGAATTACCA
 CGGTTATCCTTGTAGCAACACTATCAAATAAACGATAACTGATTTAATGAGCCATTC
 GCAGTTTCACCGTATAATGCTATACTTAGACATGCATGGCTTAATCTTTGAGACAAG
 30 GGCCCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC
 ATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAG
 TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTT
 TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA
 CGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGC
 35 CCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTA
 TTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAG
 AATGACTTGGTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC
 AGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACT
 TACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATG
 40 GGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC
 TATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGG
 AGGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTA
 TTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGG
 45 GGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCA
 ACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA
 TTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCA
 TTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAT

CCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
 GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAC
 CACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGA
 AGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGT
 5 AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAA
 TCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACT
 CAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGC
 ACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA
 GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTA
 10 AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCT
 GGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTG
 ATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTA

SEQ ID NO 2

GAGACAAGGGCCCGCGGAACCCCTATTgtTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATG
 15 TATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA
 GAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGC
 CTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAG
 TTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGA
 GAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATG
 20 TGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATAC
 ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG
 ATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACT
 GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT
 GCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATG
 25 AAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACG
 TTGCGCAAATACTAATACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATA
 GACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGC
 TGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCAT
 TGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG
 30 GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCA
 CTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGAT
 TTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCA
 TGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAA
 AGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC
 35 AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTC
 TTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAG
 TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCG
 CTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG
 GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGG
 40 GGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
 ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGG
 TATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG
 GAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC
 GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACggggcccg

SEQ ID NO 3

TGCAGGCGGCCGCGAGCTCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGAC
 ATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATT
 TAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGAT

ACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTTGTCAATTTGTTTCTTCTCG
 TACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGG
 TTTGGGAAAATCATTGAGTTTGATGTTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAG
 TACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCCACACCATAGCTTCA
 5 AAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGT
 ACCACTTCAAAACACCCAAGCACAGCATACTAAATTTTCCCTCTTCTTCTCTAGG
 GTGTCGTTAATTACCCGTAATAAAGGTTTGGAAAAGAAAAAAGAGACCGCCTCGTT
 TCTTTTTCTTCGTCGAAAAAGGCAATAAAAATTTTTATCACGTTTCTTTTTCTTGAAA
 TTTTTTTTTTAGTTTTTTTCTCTTTCAGTGACCTCCATTGATATTAAAGTTAATAAAC
 10 GGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTCTATTACAATTTTTTTAC
 TTCTTGTTCAATAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGGTGTTGACAA
 TTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAA
 CCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGTCGCCGGA
 GCGGTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGA
 15 CTTCCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACC
 AGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTG
 TACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAATTCGGGGACGCCTCCGGGGCCGGC
 CATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGG
 CCGGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCGACGGCGG
 20 CCCACGGGTCCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCCTTTTCTTTGTGCGATATCATGTA
 ATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAA
 GGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAGTTATGTT
 AGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTG
 TACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAG
 25 GCTTTAATTTGCTcatctteg

SEQ ID NO 4

ctatcCATATGGaaATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCC
 TCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCC
 GGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTT
 30 GCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAG
 CATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTCTG
 CAGGCGGCCGCGA

SEQ ID NO 5

CTGGGGTACCATCCTTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCTCTCGTCCAATCAGGTAG
 35 CCATCTCTGAAATATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACGTAAA
 ATTCTCCGGGGTAAACTTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACGTCTCTTCCCTT
 CTCTCTCCTTCCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACTCTGCTGGAGAGCTT
 CTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAATGCTCTTCCCAGCATTACGTTGCGGGTAAAACGG
 AAGTCGTGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTGCTGGC
 40 AATAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGAGATTATTGGAAACCACCAGAATCGAATA
 TAAAAGGCGAACACCTTTCCCAATTTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTT
 AATTTATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAACCTATCCATATGGAAATGA

SEQ ID NO 6

TGGAAAACGGGCCCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTC
 45 CTCTAAATGACCAAGTTTGTCCAAGTTCAGGCTCGCGCCCTCCCAAAGCCTCACTAA
 ACCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCA
 GCGCGAGCTGATGACTCGCGCTTACTAGGAATTCCTCGTTGAAGCGCCTCTTGCAAA
 GCGCTATCCCCAGCACGACGGAGTCTAAGATTCCCCGGCCATCTCTGGCAAGGACT

CGCTGCCTCCGTCAGTGTAGCGCGCGTGCGGCCAGAACGTCTAAGGGCATCACAG
 ACCTGTTATTGCCTCGCTTCCGCTGGCTTGCGCCAGTTGTCCTTCTAAGAAGATCCCC
 CAGCAATGCCAGGTAACCTAGTTAAAAGCCAAGGTCTCGTTCGTTATCGCAATTAA
 GCAGACAAATCACTCCACCACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCACAAAATCA
 5 AGAAAGTGCTCTCATCCTGTCAATCCTCATTGTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCCG
 TGTTGAGTCAAATTAAGCCGCAGGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCC
 TTTAAGTTTCAGCCTTGCGACCATACTCCCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTC
 GTAAGGTGCCGGGGAAGGCTATTCCCCGATCCCTAGTCGGCATCGTTTATGGTTAAG
 ACTACGACGGTATCTGGGGTACCATCCT

10 SEQ ID NO 7

ATTTGCTCATCTTCGATCCCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTAATGAAAACGTCCTTGG
 CGAATGCTTTTCGCAGTAGTTAGTCTTGGGGCGATCCAAGAATTTACCTCTGACGCC
 CCAATACTGACGCCCCCGACCGTCCCTGTTAATCATTACGCGGCCCCCGAACCAACAA
 AAGAACCGTATCCTCTTCTGTTATTCCATGCTAATATATTCAACTACTGCCTTGAACA
 15 CTCTAATTTCTCTCAAAGTAACGTCCGTTCAACTACGAGCTTTTTAACTGCAACA
 TTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTC
 CAATTGTTCTCGTTAAGGTATTTACGTTGTACTCATTCCAATTACAAGACCAAAGG
 CCCTGTATCGTTATTTATTGTCACTACCTCCCTGTGTCAGGATTGGGTAAATTTGCGCG
 CCTGCTGCCTTCTTGATGTGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAA
 20 CCCTTATTCCCCGTTACCCGTAGAAACCATGGTAGGCCTCTATCCTACCATCGAAAG
 TTGATAGGGCAGAAATTTGAATGAACCATCCTAAGATTCGAAAAGTTATTATGAAT
 CACCAAAACGAAGGTTTTATCTAATAAATACGCCCCGAGGGCTGATCAAGTATTAGC
 TCTAGAATTACCACGGTTATCCTTGTAGCAACACTATCAAATAAACGATAACTGATT
 TAATGAGCCATTCGCAGTTTCACCGTATAATGCTATACTTAGACATGCATGGCTTAA
 25 TCTTTGAGACAAGGGCCCCGCGGA

SEQ ID NO 8

atgCGCATCACGGTCCTGTTGCTCTTGTGTGTCGCTCCTCTGTTGTCTGGCACGTAT
 GCTGTCCAGTGTGGTAGCGAAGTCGGTGGAGCTCTGTGTCCGAATGGTCTGTGTTGC
 AGCAAGTATGGCTACTGTGGCACTACGTCTGCCTACTGTGGTCCGGGCTGTCAGAGC
 30 CAGTGTGGTGGTTCTCTCCTCCGCCTGCTCCTCCCAGCCCCGACTCCGAGTCTCCTCGT
 CTCCTCTGGAGGTGGTGATGTGTCCAGCATCATCACCTCCCAGATCTTCAATCAGA
 TGCTGCTCCATCGCAATGACAATGCCTGTCTGCCCATGGCTTCTACAGCTATCAAG
 CCTTCTTGATGCTGCACGCAAGTTTACTGGTTTCGGTACGACTGGTGACATCAACA
 CTCGCAAACGTGAACCTGGCTGCCTTCTTTGGTCAGACGAGCCACGAGACCACTGGT
 35 GGCTGGCCCCACTGCTCCTGATGGTCCGTATGCCTGGGGCTACTGCTTCAAACAGGAA
 CAAGGCAATCCTGGTGACTACTGTGTCCAGTCTTCCACGTATCCCTGTGCCCCCTGGC
 AAGAAGTACTATGGTCGTGGACCGATTACAGATCTCCTACAACCTACAACCTATGGTCA
 GTGTGGAGCCGCCATTAATCAACCCCTGCTGAGCAATCCGGATCTGGTCGCGTCCAA
 TGCCGATGTGTCCTTCGAGACTGCCATCTGGTTCTGGATGACTCCTCAAGGTAGCAA
 40 ACCCTCCTGTCATGCCGTCGCCACTGGTCACTGGACTCCGTCCGTGCGCGATCAAGC
 TGCTGGACGTGTTCTGGCTATGGTGTCAATTACGAACATCATCAATGGAGGTGTGCA
 GTGTGGCAAAGGCACGGTCCCGCAAGTTGCCGATCGCATTTGGCTTCTATCAACGCTA
 CTGCTCCATCATGGGTATTGCGCCTGGTGGCAATCTTGGCTGCTACAATCAACGTCC
 GTTCAGCGCGGCCGCA

45 Перечень последовательностей

<110> Федеральное государственное учреждение «Федеральный
 Исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
 Российской академии наук»

<120> Интеграционный вектор для многокопийной интеграции в 18S рРНК
 дрожжей *Pichia pastoris*
 <160> 7
 <210> 1
 5 <211> 5595
 <212> plasmid DNA
 <213> synthetic DNA construct
 <221> misc_feature
 <222> (18)...(750)
 10 <223> 18S ArmI
 <221> promoter
 <222> (764)...(1240)
 <223> GAP promoter. *Pichia pastoris* promoter
 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 15 <221> CDS
 <222> (1251)...(1517)
 <223> N-terminal secretion signal from *S. cerevisiae*
 MF-alpha-factor-1
 <221> misc_feature
 20 <222> (1514)...(1537)
 <223> multiple cloning site
 <221> CDS
 <222> (1538)...(1555)
 <223> 6xHis affinity tag
 25 <221> terminator
 <222> (1635)...(1881)
 <223> *Pichia pastoris* AOX1 terminator
 <221> promoter
 <222> (1921)...(2307)
 30 <223> TEF1 promoter from *S. cerevisiae*
 <221> promoter
 <222> (2315)...(2362)
 <223> synthetic bacterial promoter EM7
 <221> CDS
 35 <222> (2381)...(2755)
 <223> Sh ble gene product from *Streptoalloteichus hindustanus*
 <221> terminator
 <222> (2821)...(3068)
 <223> *S. cerevisiae* CYC1 terminator
 40 <221> misc_feature
 <222> (3069)...(3870)
 <223> 18S ArmII
 <221> promoter
 <222> (3878)...(3981)
 45 <223> AmpR promoter
 <221> CDS
 <222> (3982)...(4842)
 <223> beta-lactamase

<221> rep_origin

<222> (5013)...(6)

<223> high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication

<400> 1

```

5  1  tggaaaaaacg ggccccgcagg ttcacctacg gaaaccttgt tacgactttt acttcctcta
   61  aatgaccaag tttgtccaag ttcaggctcg cgccctccca aagcctcact aaaccattca
  121  atcggtagta gcgacgggcg gtgtgtacaa agggcaggga cgtaatcagc gcgagctgat
  181  gactcgcgct tactaggaat tcctcgttga agcgctctt gcaaagcgct atccccagca
  241  cgacggagtc taagattccc cggccatctc tggcaaggac tcgctgcctc cgtcagtgtg
10  301  gcgcgcgtgc ggcccagaac gtctaagggc atcacagacc tgttattgcc tcgcttccgc
   361  tggcttgccg cagttgtcct tctaagaaga tccccagca atgccaggta acctagttaa
   421  aagccaaggt ctcgttcgtt atcgcaatta agcagacaaa tcaactccacc aactaagaac
   481  ggccatgcac caccaccac aaaatcaaga aagtgtctc atcctgtcaa tcctcattgt
   541  gtctggacct ggtgagtttc cccgtgttga gtcaaattaa gccgcaggct ccaactcctg
15  601  tggtgccctt cgtcaattc ctttaagttt cagccttgcg accatactcc ccccagaacc
   661  caaagacttt gatctctcgt aaggtgccg ggaaggctat tccccgatcc ctagtcggca
   721  tcgtttatgg ttaagactac gacggtatct ggggtaccat cttttttgt agaaatgtct
   781  tgggtgcctc gtccaatcag gtagccatct ctgaaatatac tggctccgtt gcaactccga
   841  acgacctgct ggcaacgtaa aattctccgg ggtaaaactt aaatgtggag taatggaacc
20  901  agaaacgtct ctcccttct ctctccttcc accgcccgtt accgtcccta ggaaatttta
   961  ctctgctgga gagcttcttc tacggccccc ttgcagcaat gctcttccca gcattacgtt
  1021  gcgggtaaaa cggaagtcgt gtacccgacc tagcagccca gggatggaaa agtcccggcc
  1081  gtcgctggca ataatacgcg gcgacgcat gtcatgagat tattggaaac caccagaatc
  1141  gaataataaaa ggccaacacc tttcccaatt ttggtttctc ctgacccaaa gactttaaat
25  1201  ttaattttatt tgtccctatt tcaatcaatt gaacaactat ccatatggaa atgagatttc
   1261  cttcaatttt tactgctgtt ttattcgag catcctccgc attagctgct ccagtcaaca
   1321  ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt tactcagatt
   1381  tagaagggga tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcaciaat aacgggttat
   1441  tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga
30  1501  aaagagaggc tgaagcttct gcaggcggcc gcgagctcat catcatcatc atcattgagt
   1561  ttgtagcctt agacatgact gttcctcagt tcaagttggg cacttacgag aagaccggtc
   1621  ttgctagatt ctaatcaaga ggatgtcaga atgccatttg cctgagagat gcaggcttca
   1681  tttttgatac ttttttattt gtaacctata tagtatagga tttttttgt cattttgttt
   1741  cttctcgtac gagcttgctc ctgatcagcc tatctcgag ctgatgaata tcttggtgta
35  1801  ggggttttggg aaaatcattc gagtttgatg tttttcttgg tatttccac tcctcttcag
   1861  agtacagaag attaatgtag accttcgttt gtgcggatcc cccacacacc atagcttcaa
   1921  aatgtttcta ctcccttttt actcttcag attttctcgg actccgcgca tcgccgtacc
   1981  acttcaaaac acccaagcac agcactactaa attttccctc tttcttcctc taggggtgctg
   2041  ttaattaccc gtactaaagg tttggaaaag aaaaaagaga ccgcctcgtt tctttttctt
40  2101  cgtcgaaaaa ggcaataaaa atttttatca cgtttctttt tcttgaaatt ttttttttta
   2161  gtttttttct ctttcagtga cctccattga tatttaagtt aataaacggc cttcaatttc
   2221  tcaagtttca gtttcatttt tcttgttcta ttacaacttt ttttacttct tgttcattag
   2281  aaagaaagca tagcaatcta atctaagggg cgggtgtgac aattaatcat cggcatagta
   2341  tatcggcata gtataatacg acaagggtgag gaactaaacc atggccaagt tgaccagtgc
45  2401  cgttccggtg ctcaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc gagttctgga ccgaccggct
   2461  cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcgccggg gtggtccggg acgacgtgac
   2521  cctgttcatac agcgcggtcc aggaccagg ggtgccggac aacaccctgg cctgggtgtg
   2581  ggtgcgcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag gtcgtgtcca cgaacttccg

```

2641 ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag ccgtgggggc gggagttcgc
2701 cctgcgcgac ccggccggca actgcgtgca cttcgtggcc gaggagcagg actgacacgt
2761 ccgacggcgg cccacgggtc ccaggcctcg gagatccgtc ccccttttcc tttgtcgata
2821 tcatgtaatt agttatgtca cgcttacatt cacgccctcc cccacatcc gctctaaccg
5 2881 aaaaggaagg agttagacaa cctgaagtct aggtccctat ttattttttt atagtattgt
2941 tagtattaag aacgttatatt atatttcaaa tttttctttt ttttctgtac agacgcgtgt
3001 acgcatgtaa cattatactg aaaaccttgc ttgagaaggt tttgggacgc tcgaaggcct
3061 taatttgctc atcttcgata ccctaacttt cgttcttgat taatgaaaac gtccttggcg
3121 aatgcttttcg cagtagttag tcttggggcg atccaagaat ttcacctctg acgccccaat
10 3181 actgacgccc ccgaccgtcc ctgttaatca ttacgcggcc ccgaaccaac aaaagaaccg
3241 tatcctcttc tggtattcca tgctaataata ttcaactact gccttgaaca ctctaatttc
3301 ctcaaagtaa cgtccgttca actacgagct ttttaactgc aacaacttta atatacgcta
3361 ttggagctgg aattaccgcg gctgctggca ccagacttgc cctccaattg ttcctcgtaa
3421 aggtattttac gttgtactca ttccaattac aagaccaaag gccctgtatc gttattttatt
15 3481 gtcactacct ccctgtgtca ggattgggta atttgcgcgc ctgctgcctt ccttggatgt
3541 ggtagccgtc tctcaggctc cctctccgga atcgaaccct tattccccgt tacccgtaga
3601 aaccatggta ggccctctatc ctaccatcga aagttgatag ggcagaaatt tgaatgaacc
3661 atcctaagat tcgaaaagtt attatgaatc accaaaacga aggttttatc taataaatac
3721 gcccgagggc tgatcaagta ttagctctag aattaccacg gttatccttg tagcaacact
20 3781 atcaaataaa cgataactga tttaatgagc cattcgcagt ttcaccgtat aatgctatac
3841 ttagacatgc atggcttaat ctttgagaca agggcccgcg gaaccctat ttgtttattt
3901 ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa
3961 taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt
4021 tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat
25 4081 gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag
4141 atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagacttt taaagttctg
4201 ctatgtggcg cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata
4261 cactattctc agaatgactt gggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat
4321 ggcattgacag taagagaatt atgcagtgc gccataacca tgagtataaa cactgcggcc
30 4381 aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg
4441 ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac
4501 gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact
4561 ggcgaactac ttactctagc ttcccgcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa
4621 gttgcaggac cacttctgcg ctccggccct cccgctgggt ggtttattgc tgataaatct
35 4681 ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc
4741 tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga
4801 cagatcgctg agatagggtc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac
4861 tcatatatac tttagattga tttaaaactt catTTTTaat ttaaaaggat ctaggtgaag
4921 atcctttttg ataattctcat gacaaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg
40 4981 tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc
5041 tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag
5101 ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt
5161 cttctagtgat agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac
5221 ctgcgtctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc
45 5281 gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggg
5341 tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt
5401 gagctatgag aaagcgccac gcttccgaa gggagaaagg cggacaggtg tccggtgaagc
5461 ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt

5521 tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca
 5581 ggggggcgga gccta
 <210> 2
 <211> 1747
 5 <212> DNA
 <213> The sequence encodes part of vector pPIG-1 responsible for
 replication in E.coli
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(15)
 10 <223> sequence encodes 5 'end for Gibson assembly
 <221> promoter
 <222> (13)...(117)
 <223> AmpR promoter
 <221> CDS
 15 <222> (118)...(978)
 <223> beta-lactamase
 <221> rep_origin
 <222> (1149)...(1737)
 <223> high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication
 20 <221> misc_feature
 <222> (1730)...(1747)
 <223> sequence encodes 3 'end for Gibson assembly
 <400> 1
 1 gagacaaggc cccgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat
 25 61 ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg
 121 agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ctttcctggt
 181 tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga
 241 gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa
 301 gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt
 30 <221> misc_feature
 361 attgacgccg ggcaagagca actcggctgc cgcatatact attctcagaa tgacttggtt
 421 gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc
 481 agtgctgcca taaccatgag tgataaact gcggccaaact tacttctgac aacgatcgga
 541 ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat
 601 cggttggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cagcatgcct
 35 661 gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaact ttaactggcg aactacttac tctagcttcc
 721 cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagtgt caggaccact tctgcgctcg
 781 gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc
 841 ggtatcattg cagcactggg gccagatggg aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg
 901 acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca
 40 961 ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta
 1021 aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc
 1081 aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa
 1141 ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca
 1201 ccgctaccag cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta
 45 1261 actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc
 1321 caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca
 1381 gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta
 1441 ccggataagg cgcagcgggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag

1501 cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt
 1561 cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc
 1621 acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac
 1681 ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac
 5 1741 gggcccgc
 <210> 3
 <211> 1558
 <212> DNA
 <213> The sequence encodes part of vector pPIG-1: MCS, 6xHis-tag, AOX1
 10 terminator and cassette required for
 zeocin selection
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(15)
 <223> sequence encodes 5 'end for Gibson assembly
 15 <221> CDS
 <222> (19)...(39)
 <223> 6xHis affinity tag
 <221> terminator
 <222> (116)...(362)
 20 <223> Pichia pastoris AOX1 terminator
 <221> promoter
 <222> (402)...(788)
 <223> TEF1 promoter from S. cerevisiae
 <221> promoter
 25 <222> (796)...(843)
 <223> synthetic bacterial promoter EM7
 <221> CDS
 <222> (862)...(1236)
 <223> Sh ble gene product from Streptoalloteichus hindustanus
 30 <221> terminator
 <222> (1302)...(1549)
 <223> S. cerevisiae CYC1 terminator
 <221> misc_feature
 <222> (1544)...(1558)
 35 <223> sequence encodes 3 'end for Gibson assembly
 <400> 1
 1 tgcaggcggc cgcgagctca tcatcatcat catcattgag tttgtagcct tagacatgac
 61 tgttcctcag ttcaagttgg gcacttacga gaagaccggt cttgctagat tctaatcaag
 121 aggatgtcag aatgccatth gcctgagaga tgcaggcttc atttttgata cttttttatt
 40 181 tgtaacctat atagtatagg attttttttg tcattttggt tcttctcgta cgagcttgct
 241 cctgatcagc ctatctcgca gctgatgaat atcttgtggt agggggttgg gaaaatcatt
 301 cgagtttgat gttttttcttg gtattttcca ctctcttca gagtacagaa gattaagtga
 361 gaccttctgt tgtgcggatc cccacacac catagcttca aaatgtttct actccttttt
 421 tactcttcca gattttctcg gactccgcgc atcgccgtac cacttcaaaa caccacagca
 45 481 cagcatacta aattttccct ctttcttcct ctagggtgtc gttaattacc cgtactaaag
 541 gtttggaataa gaaaaaagag accgcctcgt ttctttttct tcgtcgaaaa aggcaataaa
 601 aatttttatc acgtttcttt ttcttgaaat tttttttttt agtttttttc tctttcagtg
 661 acctccattg atatttaagt taataaacgg tcttcaattt ctcaagtttc agtttcattt

721 ttcttgttct attacaactt tttttacttc ttgttcatta gaaagaaagc atagcaatct
781 aatctaaggg gcggtgttga caattaatca tcggcatagt atatcggcag agtataatac
841 gacaagggtga ggaactaaac catggccaag ttgaccagtg ccgttccggt gtcaccgcg
901 cgcgacgtcg ccggagcggg cgagttctgg accgaccggc tcgggttctc ccgggacttc
5 961 gtggaggacg acttcgccgg tgtggtccgg gacgacgtga ccctgttcat cagcgcggtc
1021 caggaccagg tgggtgccga caacaccctg gcttgggtgt gggcgccgg cctggacgag
1081 ctgtacgccg agtggtcgga ggtcgtgtcc acgaacttcc gggacgcctc cgggccggcc
1141 atgaccgaga tcggcgagca gccgtggggg cgggagttcg ccctgcgcga cccggccggc
1201 aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag gactgacacg tccgacggcg gccacgggt
10 1261 cccaggcctc ggagatccgt ccccttttct ctttgcgat atcatgtaat tagttatgtc
1321 acgcttacat tcacgccctc cccccacatc cgctctaacc gaaaaggaag gagttagaca
1381 acctgaagtc taggtcccta tttatttttt tatagttatg ttagtattaa gaacgttatt
1441 tataatttcaa atttttcttt tttttctgta cagacgcgtg tacgcatgta acattatact
1501 gaaaaccttg cttgagaagg ttttgggacg ctcgaaggct ttaatttgct catcttcg
15 <210> 4
<211> 298
<212> DNA
<213> The sequence encodes part of vector pPIG-1: N-terminal
secretion signal from *S. cerevisiae* MF-alpha-factor-1 and MCS
20 <221> misc_feature
<222> (1)...(18)
<223> sequence encodes 5 'end for Gibson assembly
<221> CDS
<222> (15)...(281)
25 <223> N-terminal secretion signal from *S. cerevisiae* MF-alpha-factor-1
<221> misc_feature
<222> (277)...(298)
<223> multiple cloning site
<221> misc_feature
30 <222> (284)...(298)
<223> sequence encodes 3 'end for Gibson assembly
<400> 1
1 ctatccatat ggaaatgaga tttccttcaa tttttactgc tgttttattc gcagcatcct
61 ccgcattagc tgctccagtc aactactaca cagaagatga aacggcaca attccggctg
35 121 aagctgtcat cggttactca gatttagaag gggatttcga tgttgctgtt ttgccatttt
181 ccaacagcac aaataacggg ttattgttta taaatactac tattgccagc attgctgcta
241 aagaagaagg ggtatctctc gagaaaagag aggtgaagc ttctgcaggc ggccgcga
<210> 5
<211> 506
40 <212> DNA
<213> The sequence encodes part of vector pPIG-1: GAP promoter
<221> misc_feature
<222> (1)...(15)
<223> sequence encodes 5 'end for Gibson assembly
45 <221> promoter
<222> (16)...(492)
<223> GAP promoter. *Pichia pastoris* promoter
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

```

<221> misc_feature
<222> (489)...(506)
<223> sequence encodes 3 'end for Gibson assembly
<400> 1
5 1 ctggggtacc atcctttttt gtagaaatgt cttggtgtcc tcgtccaatc aggtagccat
61 ctctgaaata tctggctccg ttgcaactcc gaacgacctg ctggcaacgt aaaattctcc
121 ggggtaaaac ttaaattgtg agtaattgga ccagaaacgt ctcttccctt ctctctcctt
181 ccaccgcccc ttaccgtccc taggaaattt tactctgctg gagagcttct tctacggccc
241 ccttgcagca atgctcttcc cagcattacg ttgcgggtaa aacggaagtc gtgtaccgca
10 301 cctagcagcc cagggatgga aaagtcccg cgcgcgctgg caataatagc gggcggacgc
361 atgtcatgag attattggaa accaccagaa tcgaatataa aaggcgaaca cttttcccaa
421 ttttggtttc tcctgaccga aagactttta atttaattta tttgtcccta tttcaatcaa
481 ttgaacaact atccatatgg aaatga
<210> 6
15 <211> 763
<212> DNA
<213> The sequence encodes 18s rRNA from Pichia pastoris
<221> misc_feature
<222> (1)...(16)
20 <223> sequence encodes 5 'end for Gibson assembly
<221> misc_feature
<222> (18)...(750)
<223> Pichia pastoris 18s rRNA
<221> misc_feature
25 <222> (749)...(763)
<223> sequence encodes 3 'end for Gibson assembly
<210> 7
<211> 820
<212> DNA
30 <213> The sequence encodes 18s rRNA from Pichia pastoris
<221> misc_feature
<222> (1)...(15)
<223> sequence encodes 5 'end for Gibson assembly
<221> misc_feature
35 <222> (7)...(808)
<223> Pichia pastoris 18s rRNA
<221> misc_feature
<222> (803)...(820)
<223> sequence encodes 3 'end for Gibson assembly
40 <210> 8
<211> 975
<212> DNA
<213> The sequence encodes of chitinase 19 family from Drosera capensis
<221> CDS
45 <222> (1)...(975)
<223> chitinase 19 family from Drosera capensis
<400> 1
ATG CGC ATC ACG GTC CTG TTG CTC TTG TGT GTC GCT CCT CTG TTG TCT GGC ACG TAT GCT

```

M R I T V L L L L C V A P L L S G T Y A
 GTC CAG TGT GGT AGC GAA GTC GGT GGA GCT
 V Q C G S E V G G A
 CTG TGT CCG AAT GGT CTG TGT TGC AGC AAG TAT GGC TAC TGT GGC ACT ACG TCT GCC TAC
 5 L C P N G L C C S K Y G Y C G T T S A Y
 TGT GGT CCG GGC TGT CAG AGC CAG TGT GGT
 C G P G C Q S Q C G
 GGT TCC TCT CCT CCG CCT GCT CCT CCC AGC CCG ACT CCG AGT CCT CCG TCT CCC TCT GGA
 G S S P P P A P P S P T P S P P S P S G
 10 GGT GGT GAT GTG TCC AGC ATC ATC ACC TCC
 G G D V S S I I T S
 CAG ATC TTC AAT CAG ATG CTG CTC CAT CGC AAT GAC AAT GCC TGT CCT GCC CAT GGC TTC
 Q I F N Q M L L H R N D N A C P A H G F
 TAC AGC TAT CAA GCC TTC TTG GAT GCT GCA
 15 Y S Y Q A F L D A A
 CGC AAG TTT ACT GGT TTC GGT ACG ACT GGT GAC ATC AAC ACA CGC AAA CGT GAA CTG GCT
 R K F T G F G T T G D I N T R K R E L A
 GCC TTC TTT GGT CAG ACG AGC CAC GAG ACC
 A F F G Q T S H E T
 20 ACT GGT GGC TGG CCC ACT GCT CCT GAT GGT CCG TAT GCC TGG GGC TAC TGC TTC AAA CAG
 T G G W P T A P D G P Y A W G Y C F K Q
 GAA CAA GGC AAT CCT GGT GAC TAC TGT GTC
 E Q G N P G D Y C V
 CAG TCT TCC ACG TAT CCC TGT GCC CCT GGC AAG AAG TAC TAT GGT CGT GGA CCG ATT CAG
 25 Q S S T Y P C A P G K K Y Y G R G P I Q
 ATC TCC TAC AAC TAC AAC TAT GGT CAG TGT
 I S Y N Y N Y G Q C
 GGA GCC GCC ATT AAT CAA CCC CTG CTG AGC AAT CCG GAT CTG GTC GCG TCC AAT GCC GAT
 G A A I N Q P L L S N P D L V A S N A D
 30 GTG TCC TTC GAG ACT GCC ATC TGG TTC TGG
 V S F E T A I W F W
 ATG ACT CCT CAA GGT AGC AAA CCC TCC TGT CAT GCC GTC GCC ACT GGT CAG TGG ACT CCG
 M T P Q G S K P S C H A V A T G Q W T P
 TCC GTC GCC GAT CAA GCT GCT GGA CGT GTT
 35 S V A D Q A A G R V
 CCT GGC TAT GGT GTC ATT ACG AAC ATC ATC AAT GGA GGT GTC GAG TGT GGC AAA GGC ACG
 P G Y G V I T N I I N G G V E C G K G T
 GTC CCG CAA GTT GCC GAT CGC ATT GGC TTC
 V P Q V A D R I G F
 40 TAT CAA CGC TAC TGC TCC ATC ATG GGT ATT GCG CCT GGT GGC AAT CTT GGC TGC TAC AAT
 Y Q R Y C S I M G I A P G G N L G C Y N
 CAA CGT CCG TTC AGC TGA
 Q R P F S *

(57) Формула изобретения

Интеграционный вектор pPIG-1 для осуществления экспрессии рекомбинантных
 белков в дрожжах *P. pastoris*, имеющий размер 5595 п.о. и характеризующийся
 нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO 1.

1

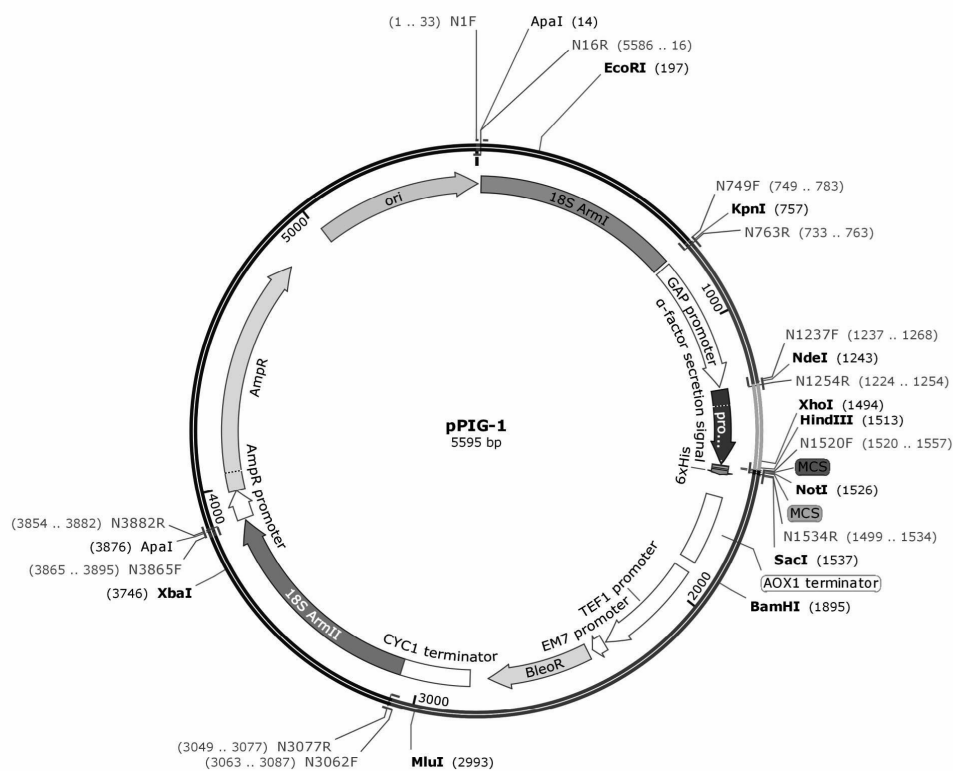


Рисунок 1- Схема интеграционного вектора рPIG-1.

2

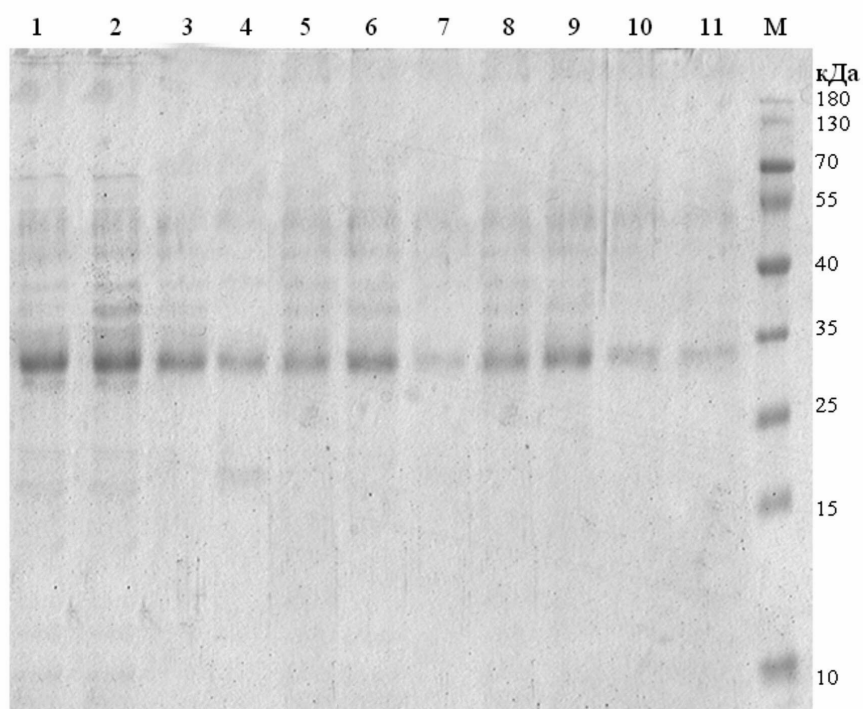


Рисунок 2 – Электрофореграмма культуральной жидкости после культивирования штаммов: 1 – pPIG_Chit19/1; 2 - pPIG_Chit19/2; 3- pPIG_Chit19/3; 4 - pPIG_Chit19/4; 5 - pPIG_Chit19/5; 6- pPIG_Chit19/6; 7 - pPIG_Chit19/7; 8- pPIG_Chit19/8, 9- - pPIG_Chit19/9, 10- pPIG_Chit19/10 ,11 - pPICZ_Chit19/1