

**Изучение возможности введения рекомбинантной плазмидной ДНК в штаммы бактерий *Rhodococcus* и функциональности в штаммах промотора генов нитрилгидратазы из *R. rhodochrous* M8**

**Научный руководитель – Лавров Константин Валерьевич**

**Крюк Мария Витальевна**

*Студент (бакалавр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

*E-mail: lady.loshadka@yandex.ru*

Бактерии *Rhodococcus* - активно развивающаяся микробная платформа для биотехнологии. Эти микроорганизмы используются для биоремедиации (в т.ч. для очистки от нефтяных загрязнений) и для биокаталитического получения акриловых мономеров (по технологиям, разработанным в ГосНИИ генетика). Перспективным направлением использования является биокаталитическое получение хиральных молекул для фармацевтики и биосинтез триацилглицерина и других предшественников биодизеля. Создание современных штаммов для биотехнологии требует развитого инструментария для генетической инженерии. Эти инструменты включают и регуляторные элементы для экспрессии генов, функционирование которых охарактеризовано в родококках, и набор штаммов родококков, охарактеризованных физиологически и генетически. В настоящей работе использованы штаммы родококков, заложенные во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов - *R. baikonurensis* AC-1794, *R. coprophilus* AC1795, *R. percolatus* AC-1799, *R. qingshengii* AC-1800, *R. ruber* AC-1800, *R. erythropolis* HX7 (AC-1267) и TA37 (AC-1793). Изучены возможность введения в эти штаммы плазмид и функциональность в них промотора генов нитрилгидратазы (Рнг) из *R. rhodochrous* M8. Прочитаны геномы штаммов *R. erythropolis*, проведён поиск геномной информации для остальных штаммов.

Для штаммов апробированы методики получения электрокомпетентных клеток и введения плазмиды путём электротрансформации (для *R. baikonurensis* и *R. coprophilus* - впервые). Для получения компетентных клеток, определяли динамику роста штаммов на жидкой среде LB, содержащей 7 г/л NaCl. При оптической плотности (ОП) засева 0,1 ед. штаммы *R. baikonurensis* и *R. erythropolis* достигали ОП 0,6 ед. (ок. 0,3 г сухого веса клеток/л) за 6 часов, а штаммы *R. qingshengii* и *R. percolatus* - за 8 часов. Штаммы *R. coprophilus* и *R. ruber* давали биомассу в виде хлопьев. Для получения нормальной суспензионной культуры в этих случаях в среду добавлялся Твин-80 (до 0,1%). Такие культуры достигали ОП 0,6 ед. за 8 ч. Введение плазмиды оказалось возможным во все штаммы, с эффективностями ок.  $10^5$  трансформантов на мкг ДНК (*R. coprophilus*),  $10^4$  (*R. baikonurensis* и *R. qingshengii*),  $10^3$  (*R. ruber* и *R. erythropolis*), и  $10^0$  (*R. percolatus*).

Функционирование промотора Рнг оценивалось с использованием экспрессионной кассеты Рнг-аам (аам - ген ациламидазы из *R. erythropolis* TA37). Штаммы, содержащие плазмиду рRY16-7 с этой кассетой, выращивались на жидкой минимальной среде MS с глюкозой, дрожжевым экстрактом, апрамицином и мочевиной или  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Полученные клетки всех плазмидных штаммов проявляли ациламидазную активность (0,09-0,91 мкМ/мг с.в.\*мин), что свидетельствует о функциональности Рнг в этих штаммах.

В базах данных NCBI/EMBL/DBJ обнаружены WGS последовательности геномов всех видов родококков, использованных в работе, кроме *R. percolatus*. Эта информация, наряду с нашими результатами геномного секвенирования, создаёт фундаментальную базу для генетической инженерии изученных нами штаммов.