

Использование системы CRISPR-Cpf1 для генетического редактирования в *Corynebacterium glutamicum***Научный руководитель – Дербиков Денис Дмитриевич****Суворов Дмитрий Александрович**

Студент (магистр)

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Факультет биотехнологии и промышленной экологии (БПЭ), Москва, Россия

E-mail: dimitriui@mail.ru

Валин является незаменимой аминокислотой, имеющей важное значение для различных областей промышленности. Одним из перспективных направлений для промышленного получения этой аминокислоты является микробиологический синтез с помощью бактерий *Corynebacterium glutamicum*, полученных генноинженерным способом. В последние годы наблюдается значительный интерес к разработке новых способов генетического редактирования, основанных на действии CRISPR/Cas систем. Использование таких систем позволяет значительно упростить и ускорить процесс введения необходимых мутаций в штамм-продуцент. Однако, использование CRISPR/Cas системы значительно ограничено сравнительно низкой электрокомпетентностью клеток *Corynebacterium glutamicum* [1].

Для преодоления этого ограничения, в геноме *C. glutamicum* ATCC13869 нами была введена делеция гена *ponA*. Он кодирует бифункциональную пептидогликан гликозилтрансферазу/ пептидогликан транспептидазу - фермент, участвующий в синтезе пептидогликанового слоя клеточной стенки [2]. После введения этой делеции наблюдалось увеличение электрокомпетентности. что, совместно с использованием ослабляющих клеточную стенку веществ, позволяет увеличить эффективность трансформации клеток *C. glutamicum* ATCC13869 до значений, достаточных для использования системы CRISPR-Cpf1.

Также, нами была сконструирована плаزمида pJYS3- $\Delta ilvA$, содержащая CRISPR-Cpf1-систему и адаптированную для работы в бактериальной клетке. В штамм ATCC13869 $\Delta ponA$ с помощью плазмиды pJYS3- $\Delta ilvA$ была введена делеция гена *ilvA*, кодирующего треониндегидратазу. Делеция гена *ilvA* приводит к снижению биосинтеза 2-кетобутирата из треонина, вследствие чего снижается расход пирувата на биосинтез изолейцина и большее количество пирувата идет на синтез валина. Продуктивность по валину после 48 часов культивирования на среде, содержащей гидролизат пшеничного глютена, для ATCC13869 и ATCC13869 $\Delta ponA$ была равной и составляла 3 г/л, в то время как для ATCC13869 $\Delta ponA$ $\Delta ilvA$ она возросла до 18 г/л.

Таким образом, нами была показана возможность использования CRISPR-опосредованных систем для получения бактериальных штаммов-продуцентов валина на основе *C. glutamicum* на примере делеции гена *ilvA*.

Источники и литература

- 1) Zhang J. et al. Optimizing a CRISPR-Cpf1-based genome engineering system for *Corynebacterium glutamicum* // Microbial cell factories. – 2019. – Т. 18. – №. 1. – С. 60
- 2) Liu J. et al. Mutations in peptidoglycan synthesis gene *ponA* improve electrotransformation efficiency of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 // Appl. Environ. Microbiol. – 2018. – Т. 84. – №. 24. – С. e02225-18