

Создание векторной конструкции для инактивации гена бактериоцина в геноме штамма *Bacillus pumilus* 3-19

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

Васильева Юлия Александровна

Студент (магистр)

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия

E-mail: vasileva891@mail.ru

Бациллярные протеолитические ферменты обладают важной практической ценностью и применяются в сфере сельского хозяйства, пищевого производства и медицины. Такие преимущества как широкая субстратная специфичность и устойчивость в обширных диапазонах рН и температуры позволяют эффективно использовать протеиназы бацилл во многих областях промышленности, а именно как компоненты кормов для сельскохозяйственных животных. Актуальными кандидатами для применения в качестве кормовой добавки для птиц и животных являются протеиназы *Bacillus pumilus* 3-19. Однако не всегда возможно получить достаточное количество целевого белка для применения в промышленных масштабах. Споруляция, конкурентная секреция поверхностных липопептидов и антимикробных метаболитов во время ферментации препятствуют внеклеточному продуцированию фермента. Род *Bacillus* известен своей способностью продуцировать широкий спектр антимикробных пептидов, к которым относится бактериоцин (*bact*). Выдвинуто предположение, что ресурсы клеток *B. pumilus* 3-19 будут использоваться более эффективно при экспрессии генов протеиназ впоследствии инактивации гена бактериоцина. В настоящее время в качестве метода для редактирования геномов используют систему CRISPR/Cas9. С её помощью появляется возможность удалять специфические последовательности генов с высокой точностью и эффективностью, создавая при этом штаммы с необходимыми свойствами. Целью данного исследования являлось создание и клонирование векторной конструкции для инактивации гена бактериоцина в геноме штамма *B. pumilus* 3-19.

В работе использовался шаттл-вектор рJOE9282.1, содержащий систему CRISPR/Cas9 для дальнейшей инактивации гена-мишени [1]. Плазмиду рJOE9282.1 расщепляли по сайту рестрикции *BsaI* и обрабатывали щелочной фосфатазой для предотвращения закольцовывания и димеризации. Путем гибридизации праймеров был получен спейсерный фрагмент (gRNA), который интегрировали в вектор рJOE9282.1. Далее, с геномной ДНК *B. pumilus* 3-19 были амплифицированы фрагменты гена бактериоцина, которые встраивали в вектор по сайту *SfiI*. Клонирование полученной конструкции проводили в клетках *E. coli* DH5a. Целостность конструкции подтверждали секвенированием. Для инактивации гена-мишени, клетки *B. pumilus* 3-19 трансформировали полученным вектором рVYb11.21 методом электропорации. Эффективность трансформации в среднем составила 146 трансформантов/мкг плазмидной ДНК. С помощью ПЦР анализа подтвердили наличие полученной конструкции рVYb11.21 содержащей систему CRISPR/Cas9. Таким образом, нами была создана и клонирована векторная конструкция рVYb11.21. В дальнейшем планируется инактивация гена бактериоцина в геноме штамма *Bacillus pumilus* 3-19.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана грантом РФФИ № 19-08-00853 (А).

Источники и литература

- 1) 1. Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system
// Appl Environ Microb. 2016, №82. p. 5421–5427.