

Разработка вектора (pGAs11.21) для инактивации гена sigF Bacillus pumilus 3-19 с помощью технологии CRISPR-Cas9.

Научный руководитель – Данилова Юлия Васильевна

Гильмутдинова Айгуль Ильдусовна

Студент (бакалавр)

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

E-mail: aigwinrygilmtyizn@gmail.com

Бактерии *Bacillus pumilus* известны своей способностью продуцировать гидролитические ферменты. Протеазы широко используются в различных отраслях промышленности - фармацевтике и медицине, сельском хозяйстве, пищевой и текстильной промышленности.

Для получения целевого фермента часто используют штаммы бактерий с делетированными генами протеиназ, то есть достигаются условия, при которых экспрессия генов протеиназ не влияет на продукцию целевых ферментов [2].

Регуляция экспрессии генов у бактерий на уровне транскрипции осуществляется в присутствии ключевого фермента - ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Его взаимодействие со специфическими участками ДНК - промоторами осуществляется за счет дополнительного полипептида - σ -транскрипционного фактора, который специфически связывается с консервативными последовательностями нуклеотидов. В обстоятельствах, когда спорообразование нежелательно, например, при промышленной ферментации, экспериментах с хеостатом, использование штаммов, лишенных споруляции, может быть решением. Следовательно, актуально оценить влияние инактивации гена *sigF* на экспрессию генов протеиназ в *B. pumilus*.

Таким образом, для редактирования генома *B. pumilus* в качестве мишени для инактивации был выбран ген сигма-фактора спорообразования *sigF*.

В работе использовали челночный вектор pJOE9282.1 на основе системы *Streptococcus pyogenes* типа CRISPR-Cas9 II. Для редактирования генома он нес ген *cas9* под контролем промотора, индуцируемого ксилозой (*Pxyl*).

Для создания вектора, исключая хромосомный участок *sigF*, плазмиду pJOE9282.1 сначала разрезали BsaI, а фрагмент *lacZ* α заменяли на sgRNA, полученную путем гибридизации праймеров. Эта sgRNA направляет нуклеазу Cas9 к ее мишени. Далее два ПЦР-фрагмента (*sigF*-L (500 п.н.) и *sigF*-R (716 п.н.)) из геномной ДНК *B. pumilus* 3-19 вырезали с помощью SfiI и вставляли между двумя сайтами SfiI.

Таким образом, мы сконструировали плазмиду pGAs11.21 для инактивации гена *sigF* в геноме *B. pumilus* 3-19. В дальнейшем эта плазмида будет трансформирована в клетки бацилл методом электропорации, описанным Shen с соавторами [1] для получения делеционных мутантов с инактивированным геном сигма-фактора споруляции (*sigF*).

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

Источники и литература

- 1) Shen X., Chen Y., Liu T., Hu X., Gu Z. Development of a high-efficient transformation system of *Bacillus pumilus* strain DX01 to facilitate gene isolation via gfp-tagged insertional mutagenesis and visualize bacterial colonization of rice roots // *Folia Microbiologica*. 2013. Vol.58(5). P. 409–417.

- 2) Тоументсева А., Altenbuchner J. New CRISPR-Cas9 vectors for genetic modifications of *Bacillus* species // FEMS Microbiol Lett. 2019. 366(1).