

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
**ЦЕЛЕВАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНОВ ПЕПТИДОВ С
АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ГЕНОМЕ *BACILLUS
PUMILUS* 3-19 С ПОМОЩЬЮ CRISPR-CAS9 ТЕХНОЛОГИИ**

Обучающийся 2 курса

группы 01-040-2

Ю.А. Васильева

Научный руководитель

д-р биол. наук, профессор

М.Р. Шарипова

Заведующий кафедрой микробиологии

д-р биол. наук, профессор

О.Н. Ильинская

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

| | Стр. |
|--|------|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 7 |
| 1.1 Классификация антимикробных пептидов бактерий | 7 |
| 1.2 Антимикробные пептиды бацилл | 11 |
| 1.3 Система редактирования генома CRISPR-Cas | 16 |
| 1.3.1 Вектора экспрессии | 20 |
| 1.3.2 Целевая инактивация генов с помощью CRISPR-Cas9 технологии | 23 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 27 |
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 28 |
| 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 28 |
| 2.1 Штаммы бактерий | 28 |
| 2.2 Питательные среды и культивирование | 29 |
| 2.3 Конструирование плазмид несущих фрагменты генов бацилицина и бактериоцина на основе шаттл-вектора pJOE9282.1 | 30 |
| 2.4 Трансформация клеток <i>E. coli</i> DH5α | 31 |
| 2.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) | 32 |
| 2.6 Трансформация клеток <i>B. pumilus</i> 3-19 | 34 |
| 2.7 Целевая инактивация генов | 35 |
| 2.8 Динамика роста и протеолитическая активность | 36 |
| 2.9 Антимикробная активность | 37 |
| 2.10 Математическая обработка результатов | 37 |
| 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 38 |
| 3.1 Получение плазмид несущих фрагменты генов бацилицина и бактериоцина на основе шаттл-вектора pJOE9282.1 | 38 |

| | |
|---|----|
| 3.2 Трансформация клеток <i>B. pumilus</i> полученными плазмидами | 41 |
| 3.3 Целевая инактивация генов <i>bac</i> и <i>bact</i> методом редактирования CRISPR/Cas9 | 43 |
| 3.4 Динамика роста и протеолитическая активность мутантных штаммов | 45 |
| 3.5 Антимикробная активность мутантных штаммов | 48 |
| ВЫВОДЫ | 52 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 53 |

CRISPR – генетическая структура ДНК

DNA – нуклеиновая кислота

DNA-рекомбинация – методическое сведение генов

ДНК – генетический материал в клетке

Rcr – рекомбинантный белок

2,3-БГО – 2,3-бутандиол

ГПР – генетическая полимеразная реакция

Гуар – гликоген (глюкоза) альгинатан

ГАБ-буфер – гумат-адматиновый буфер

ГКУ – генетическая кислота

ДНК-лампа – днокарбонатная лампа

ДНК-полимераза

ДНК-шаблон – ДНК-матрица

ДНК-шаблон – ДНК-матрица

ВВЕДЕНИЕ

Представителей рода *Bacillus* используют в современной сельскохозяйственной, фармацевтической и пищевой промышленности [Li *et al.*, 2020]. Бациллы эффективно продуцируют различные гидролитические ферменты, в том числе, протеиназы, которые расщепляют высокомолекулярные белковые соединения до аминокислотных остатков. Широкая субстратная специфичность и устойчивость в обширных диапазонах pH и температуры позволяют целенаправленно использовать бациллярные протеиназы в практических целях.

Актуальными кандидатами для применения протеиназ являются бактерии *Bacillus pumilus* 3-19. Создание бациллярной клеточной фабрики по производству фермента затрудняется из-за многих физиологических процессов таких как спорообразование, конкурентная секреция поверхностных липопептидов и антимикробных метаболитов. Выработка антимикробных пептидов во время ферментации может препятствовать внеклеточному продуцированию целевого белка. В связи с чем, мы предположили, что ресурсы клеток *B. pumilus* 3-19 будут использоваться более эффективно при экспрессии генов протеиназ после инактивации генов бацилизина и бактериоцина. В последние годы технологию CRISPR-Cas9 используют для редактирования геномов бактерий рода *Bacillus*, например, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* [Wang *et al.*, 2017]. Технология редактирования геномов позволяет удалять специфические последовательности в геноме с высокой точностью, при этом редактированные штаммы обладают экономически выгодными свойствами.

Целью данного исследования являлась инактивация генов пептидов с антимикробной активностью в геноме штамма *B. pumilus* 3-19 с помощью CRISPR-Cas9 технологии.

ВВЕДЕНИЕ

В работе решались следующие задачи:

- 1) Создание векторной конструкции для инактивации гена бацилизина и бактериоцина на основе шаттл-вектора pJOE9282.1.
- 2) Трансформация клеток *B. pumilus* 3-19 полученными плазмидами
- 3) Целевая инактивация генов *bac* и *bact* методом направленного редактирования CRISPR/Cas9.
- 4) Исследование динамики роста, протеолитической и антимикробной активности мутантных штаммов.

Бактерии рода *Bacillus* являются одними из наиболее распространенных и разнообразных видов бактерий, способных к образованию спор. Даже гидробионты из группы спорангийных, не обладают способностью к спорованию. Вследствие антибиотиков, способных ингибировать спорообразование (Набиев *et al.*, 2021).

Первый антибиотический перекрест был обнаружен в 1939 году (Роджер Салленс, 1959). Выделение из почвы бактерии *B. brevis* публично способствовало появлению антибиотических микрорганизмов. Наиболее ранним антибиотиком стала бактерия, она инактивировала их гликозаминогликаны, а также другие антибиотики. Оказалось, что бактерии обладают способностью использовать АГГ для собственной защиты. Таким образом, обеспечивали вынужденное проникновение в определенной экологической зоне (Набиев *et al.*, 2021).

Основное отличие АГГ от антибиотиков в том, что они являются неспецифичными антибиотическими мицелии. Примечательно, что антибиотики, которые обладают гликозаминогликан-разрушительной функцией. Такое действие на различные группы бывает очень сложно, поэтому у антибиотиков из бактерий такие патчи классифицируются как бактериальные антибиотики (Набиев *et al.*, 2021). Напоми-

Список использованных источников

- 1) На основе шаттл-вектора pJOE9282.1 сконструированы плазмиды pDIb11.21 и pVYb11.2, несущие систему CRISPR/Cas9, спейсерные фрагменты (sgRNA) и целевые участки генов-мишеней – бацилизина (*bac-L* и *bac-R*) и бактериоцина (*bact-L* и *bact-R*).
- 2) Проведена трансформация клеток *B. pumilus* 3-19 векторными плазмидами pDIb11.21 и pVYb11.2, несущими фрагменты генов бацилизина и бактериоцина, соответственно.
- 3) Установлена направленная инактивация генов бацилизина (*bac*) и бактериоцина (*bact*) в геноме *B. pumilus* в результате редактирования CRISPR/Cas9 технологией.
- 4) Установлено, что инактивация генов antimикробных пептидов в геноме *B. pumilus* 3-19 привела к изменению динамики роста культуры и снижению протеолитической активности редактированных штаммов (в 18,4 раза для Δbac и 2 для $\Delta bact$), а также снижению antimикробной активности рекомбинантных штаммов.

X. M. Tan // *Bacteriocins, Bioturbators, and Biofertilizers*. – 2017. – V.51. – P. 451-459.

6) Chabreuil, A.; Chetrit; Seznec-Deruelle. – *Biofertilite*, 2013. – 349-356pp. – ISBN 978-94-927-3920-3.

7) Chen, C. Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications [Text] / C. H. Chen, T. K. Liu // *Antibiotics*. – 2020. – V. 9. – P. 24.

8) Gao, X. In: *CRISPR/Cas9 technology: genome editing and its applications in plant breeding and CRISPR/Cas systems* [Text] / R. B. Cai, Z. J. Guo, Y. H. Guo // *Advances in Plant Science and Biotechnology*. – 2015. – V. 4. – P. 723-728.

9) Gao, X. In: *Plant biotechnology—a viable alternative to antibiotic therapy* [Text] / Nitin & Ravindra Mital // *Microbiology*. – 2011. – V. 11. – P. 95-105.