

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



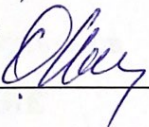
Ю.А. Васильева

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 бацилизина и бактериоцина на основе шаттл-вектора рJOE9282.1	30
2.4 Трансформация клеток <i>E. coli</i> DH5 α	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 бацилизина и бактериоцина на основе шаттл-вектора рJOE9282.1	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

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 отредактированные 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.

ГОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В работе решались следующие задачи:

- 1) Создание векторной конструкции для инактивации гена бацитилина 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.

СВЯЗЬ ИСТОЧНИКОВ

ВЫВОДЫ

1) На основе шаттл-вектора pJOE9282.1 сконструированы плазмиды pD1b11.21 и pVYb11.2, несущие систему CRISPR/Cas9, спейсерные фрагменты (sgRNA) и целевые участки генов-мишеней – бацитилина (*bac-L* и *bac-R*) и бактериоцина (*bact-L* и *bact-R*).

2) Проведена трансформация клеток *B. pumilus* 3-19 векторными плаزمидами pD1b11.21 и pVYb11.2, несущими фрагменты генов бацитилина и бактериоцина, соответственно.

3) Установлена направленная инактивация генов бацитилина (*bac*) и бактериоцина (*bact*) в геноме *B. pumilus* в результате редактирования CRISPR/Cas9 технологией.

4) Установлено, что инактивация генов антимикробных 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 антимикробной активности рекомбинантных штаммов.