

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: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
СОЗДАНИЕ ВЕКТОРА ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА БАЦИЛИЗИНА  
*BACILLUS PUMILUS* 3-19

Студент 4 курса  
группы 01-806

"31" мая 2022 г.

 (Дядькина И.В.)

Научный руководитель  
к.б.н., с.н.с.


"31" мая 2022 г.

 (Данилова Ю.В.)

Заведующий кафедрой  
микробиологии

д.б.н., профессор

"31" мая 2022 г.

 (Ильинская О.Н.)

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	7
1.1 Характеристика рода <i>Bacillus</i>	7
1.1.1 Характеристика вида <i>B. pumilus</i>	11
1.2. Протеиназы бацилл	14
1.2.1 Протеиназы <i>B. pumilus</i>	15
1.3 Антимикробные пептиды бацилл	17
1.4 Система редактирования генома (CRISPR)/Cas9	19
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	27
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	27
2.1 Штаммы бактерий и плазмиды	27
2.2 Полимеразная цепная реакция	28
2.3 Питательные среды и культивирование	29
2.4 Гель-электрофорез	30
2.5 Конструирование плазмиды, несущей фрагменты гена бацилизина на основе шаттл-вектора pJOE9282.1	30
2.6 Трансформация <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	32
2.7 Трансформация клеток <i>B. pumilus</i> 3-19	33
2.8 Целевая инактивация гена бацилизина	34
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ</b>	35
3.1 Получение плазмиды, несущей фрагменты гена бацилизина на основе шаттл-вектора pJOE9282.1	35
3.2 Трансформация клеток <i>B. pumilus</i> 3-19, полученной плазмидой pDIb11.21.	38

3.3 Целевая инактивация гена бацилизина ( <i>bac</i> ) методом редактирования (CRISPR)/Cas9	41
<b>ВЫВОДЫ</b>	43
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	44

## ВВЕДЕНИЕ

Благодаря биохимическому разнообразию и простоте генетических манипуляций микробы продуцируют многообещающее количество протеаз [Razzaq *et al.*, 2019].

Среди микробов *Bacillus* широко изучаются для производства протеаз в больших масштабах [Razzaq *et al.*, 2019]. Показано, что добавление субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* в корм цыплят-бройлеров улучшает усвоение белка, что увеличивает живую массу, и снижает расход корма. Также отмечается положительное влияние на микрофлору кишечника [Pudova *et al.*, 2020]. Протеазы *B. pumilus* 3-19 не являются токсичными, а также способны инактивировать сайты полимеризации, поэтому могут служить трамплином для разработки препаратов, препятствующих агрегации. Ферменты *B. pumilus* 3–19 эффективно гидролизуют  $\beta$ -амилоидные пептиды, накопление которых характерно при болезни Альцгеймера [Danilova *et al.*, 2014].

Увеличение экспрессии генов различных протеиназ бацилл остается одной из основных задач генной инженерии и необходимости конструирования штаммов-продуцентов и разработки методов их практического применения [Rozanov *et al.*, 2021].

Известно, что продукция различных внеклеточных метаболитов может мешать секреции целевого белка [Zhang *et al.*, 2016]. Представители рода *Bacillus* секретируют большое количество антимикробных пептидов [Saggese *et al.*, 2022]. Одним из них является бацилизин, активный дипептид широкого спектра действия. Анализ *in silico* генома штаммов *B. pumilus* показал, что в нем присутствуют гены, ответственные за синтез бацилизина [Nannan *et al.*, 2021]. Для увеличения выработки протеаз может быть проведена инактивация гена бацилизина. Исходя из этого, в данной работе в качестве мишени для инактивации был выбран ген бацилизина (*bac*) в геноме *B. pumilus* 3-19. Мы предполагаем, что удаление гена *bac* позволит клеткам *B. pumilus*

секретировать протеиназы с большей эффективностью, не тратя свои ресурсы на экспрессию и секрецию бацилизина.

Целью данной работы являлось создание векторной конструкции для CRISPR-Cas9-нокаута гена бацилизина в геноме *B. pumilus* 3-19.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) Создание вектора, несущего фрагменты гена бацилизина, на основе шаттл-вектора pJOE9282.1;
- 2) Трансформация клеток *B. pumilus* 3-19 полученной плазмидой pDIb11.21;
- 3) Целевая инактивация гена бацилизина (*bac*) в геномной ДНК *B. pumilus* 3-19 методом редактирования (CRISPR)/Cas9.

## ВЫВОДЫ

- 1) На основе шаттл-вектора pJOE9282.1, содержащего систему (CRISPR)/Cas9 для целевого нокаута гена, сконструирован вектор pDIb11.21, который содержит 2 фрагмента гена-мишени бацитизина;
- 2) Получены трансформанты *B. pumilus* 3-19, содержащие плазмиду pDIb11.21. Установлено, что эффективность трансформации *B. pumilus* 3-19 полученным вектором выше при напряжении 12.5 кВ, по сравнению с 9 кВ;
- 3) Получен мутантный штамм, производный от *B. pumilus* 3-19, с инактивированным геном бацитизина (*bac*).