

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): 06.03.01 – Биология
Профиль (специализация): Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
СОЗДАНИЕ CRISPR/Cas9 ВЕКТОРА ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА
БАЦИЛЛИБАКТИНА В ГЕНОМЕ *BACILLUS PUMILUS* 3-19

Обучающийся 4 курса
группы 01-004



Волкова Е.С.

Научные руководители
д-р биол. наук, профессор



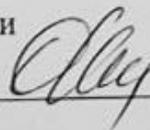
Шарипова М.Р.

к-д биол. наук, с.н.с



Рудакова Н.Л.

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| СОДЕРЖАНИЕ..... | 2 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 3 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 6 |
| 1.1 <i>Bacillus pumilus</i> как PGPR-штамм..... | 6 |
| 1.2 Сидерофоры..... | 8 |
| 1.3 Бациллизин..... | 11 |
| 1.4 Система редактирования генома CRISPR/Cas9..... | 12 |
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ..... | 18 |
| 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 18 |
| 2.1 Штаммы и плазмиды..... | 18 |
| 2.2 Питательные среды и условия культивирования микроорганизмов..... | 19 |
| 2.3 Выделение геномной ДНК..... | 20 |
| 2.4 Выделение плазмидной ДНК..... | 20 |
| 2.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)..... | 20 |
| 2.6 ДНК-гель-электрофорез..... | 22 |
| 2.7 Выделение продуктов ПЦР-реакции из геля..... | 23 |
| 2.8 Трансформация клеток <i>E.coli</i> DH5 α | 25 |
| 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ..... | 27 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ..... | 34 |

ВВЕДЕНИЕ

Сельское хозяйство, как одна из важнейших отраслей экономики, из года в год нуждается в усовершенствовании применяемых технологических приемов. Одним из передовых методов повышения продуктивности является вовлечение в производство микроорганизмов. Бактерии, сосуществующие с растениями на взаимовыгодных условиях, могут быть использованы для сокращения воздействия применяемых в сельском хозяйстве химикатов на окружающую среду. Одним из наиболее часто применяемых в качестве биоудобрения PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) является *Bacillus pumilus*. Данный вид характеризуется выработкой спектра метаболитов, стимулирующих рост растений [Dobrzyński *et al.*, 2022]. К таким веществам относятся сидерофоры, позволяющие микроорганизмам захватывать железо из окружающей среды, переводить в биохимически доступную форму, а также накапливать его [Rabbee *et al.*, 2019]. Из коллекции микроорганизмов НИЛ «Агробιοинженерия» ИФМиБ КФУ был выбран штамм *Bacillus pumilus* 3-19, являющийся производным почвенного изолята *B. pumilus* 7P. Ранее была определена полная последовательность генома *B. pumilus* 3-19 [Pudova *et al.*, 2022]. Анализ данной последовательности показал наличие у *B. pumilus* 3-19 гена сидерофора катехолового типа – бациллибактина.

Для оценки вклада бактериального метаболита в комплекс взаимоотношений растение-микроорганизм часто применяются мутантные штаммы микроорганизмов с делетированным геном метаболита. Для удаления гена может быть использована система редактирования генома CRISPR/Cas9. В данном исследовании мы конструировали плазмидный вектор системы CRISPR/Cas9, который в последствии будет использован для целевой инактивации гена сидерофора и получения рекомбинантного штамма *B. pumilus* 3-19, лишённого способности синтезировать сидерофор бациллибактин.

Цель работы: сборка плазмидного вектора для инактивации гена бациллибактина в геноме *B. pumilus* 3-19.

Задачи исследования:

- 1) Подобрать целевые последовательности гена бациллибактина для комплектации рабочей векторной конструкции: последовательность гидовой РНК (sgRNA), а также фланкирующих участков гена бациллибактина (L,R-*dhb*).
- 2) Нарботать подобранные участки методом ПЦР.
- 3) Собрать рабочий вектор на основе базовой CRISPR/Cas9 конструкции pJOE9282.1 с целевыми элементами (sgRNA, L, R-*dhb*) для гена бациллибактина.
- 4) Подтвердить правильность сборки конструкции.

ВЫВОДЫ

1) В ходе работы были подобраны последовательности sgRNA и фланкирующие L, R-участки гена бацилликсина *B. pumilus* 3-19, необходимые для функционирования векторной конструкции.

2) Подобранные участки были наработаны методом ПЦР с использованием соответствующих праймеров в оптимизированных условиях.

3) На основе плазмиды pJOE9282.1 был сконструирован рабочий вектор pVEb11.23, содержащий направляющую РНК и фланкирующие участки для гена бацилликсина.

4) Правильность сборки готовой конструкции была подтверждена методом постановки ПЦР с праймерами по гену *cas9* и праймерами DesVer, а также секвенированием.