

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
РАЗРАБОТКА ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ
ГЕНА ЛИХЕНИЗИНА В ГЕНОМЕ *BACILLUS PUMILUS 3-19*
МЕТОДОМ CRISPR/Cas9 РЕДАКТИРОВАНИЯ

Обучающийся 4 курса

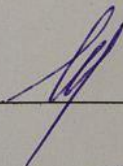
группы 01-004



Ласточкина Е.Э.

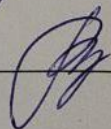
Научные руководители

д-р биол. наук, профессор



Шарипова М.Р.

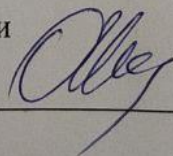
к-т биол. наук, с.н.с



Рудакова Н.Л.

Заведующий кафедрой микробиологии

д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 <i>Bacillus pumilus</i> – бактерия, стимулирующая рост растений.....	7
1.2 Биосурфактанты их строение, свойства и классификация	8
1.2.1 Гликолипиды	9
1.2.2 Жирные кислоты и фосфолипиды	12
1.2.3 Поликетидогликозиды	13
1.2.4 Липопептиды.....	14
1.2.5 Липопротеины	16
1.3 Потенциальное применение биосурфактантов в сельском хозяйстве.....	18
1.4 Принцип CRISPR/Cas9 технологии редактирования генома.....	19
1.5 Заключение	21
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	23
2.1 Используемые штаммы и плазмиды	23
2.2 Питательные среды и культивирование	24
2.3 Выделение ДНК	24
2.4 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	25
2.5 Гель-электрофорез	27
2.6 Конструирование плазмиды, несущей фрагменты гена лихенизина на основе шаттл-вектора pJOE9282.1	27
2.7 Трансформация <i>E. coli</i> DH5 α	30
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1 Получение челночного вектора, несущего фрагменты гена лихенизина, на основе плазмиды pJOE9282.1	31
ВЫВОДЫ	39
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	40

ВВЕДЕНИЕ

В условиях постоянного роста населения мира, уменьшения площади пахотных земель и истощения генетического потенциала сельскохозяйственных культур существует насущная необходимость внедрения новых сельскохозяйственных технологий. Подавляющее большинство предприятий с этой целью использует синтетические пестициды и удобрения. Однако прогрессирующее изменение климата и загрязнение окружающей среды требуют разработки экологически чистых продуктов с данными свойствами [Zielewicz *et al.*, 2021]. Одним из лучших решений для безопасного использования удобрений являются удобрения на основе ризобактерий, стимулирующих рост растений (PGPR) [Ćimo *et al.*, 2020].

Bacillus pumilus – одна из наиболее изученных ризобактерий, стимулирующих рост растений. Как было показано в многочисленных исследованиях, данный вид способен вырабатывать ряд фитогормонов, среди них различные гибберелины и индолил-3-уксусная кислота (ИУК); переводить фосфорсодержащие минералы в доступные для растений формы, продуцировать дезаминазу 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, которая способствует снижению уровня этилена, а также фиксировать атмосферный N_2 [Chakraborty *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2021; Masood *et al.*, 2020; Upadhyay *et al.*, 2019].

Важной характеристикой *B. pumilus* как PGPR-штамма является способность к синтезу биосурфактанта лихенизина.

Биосурфактанты являются вторичными метаболитами микроорганизмов, высших животных, растений, и по своим свойствам они выступают в качестве поверхностно-активных веществ (ПАВ). На данный момент область применения биосурфактантов весьма разнообразна, они широко используются в нефтяной и добывающей промышленности, медицине, косметологии и т.д. Стоит отметить, что рассмотрение функций биосурфактантов также необходимо и для устойчивого развития сельского

хозяйства. Было выявлено, что биосурфактанты, продуцируемые ризобактериями, обладают антагонистическими свойствами по отношению к патогенам растений. Применение биосурфактантов в сельском хозяйстве также способствует развитию таких механизмов взаимодействия микроорганизмов с растениями, как антибиоз, конкуренция и индуцированная системная устойчивость [Sachdev, Cameotra, 2013]. Однако для более глобального понимания влияния биосурфактантов микроорганизмов на растения необходимо изучить, как целевая инактивация генов, отвечающих за выработку сурфактантов у штаммов-продуцентов ризобактерий, скажется на их микробно-растительных взаимодействиях.

Целью данного исследования явилось создание плазмидного вектора для целевой инактивации гена лихенизина методом CRISPR/Cas9 редактирования.

Задачи работы:

- 1) На основе данных структуры гена лихенизина *Bacillus pumilus* 3-19 провести подбор последовательностей sgRNA и фланкирующих участков к гену лихенизина (*L,R-lchA*).
- 2) Нарботать подобранные последовательности методом ПЦР для последующей вставки в векторную конструкцию.
- 3) Сконструировать вектор на основе исходной плазмиды pJ0E9282.1, содержащий все уникальные конструкторы для корректной инактивации гена лихенизина в геноме *Bacillus pumilus* 3-19.
- 4) Подтвердить корректность сборки вектора.

ВЫВОДЫ

- 1) На основе структуры гена лихенизина были подобраны функциональные компоненты системы CRISPR/Cas9 для инактивации данного гена: последовательность sgRNA и последовательности фланкирующих участков к гену лихенизина (L,R-*lchA*).
- 2) С помощью соответствующих праймеров подобранные последовательности были наработаны методом ПЦР для последующей вставки в векторную конструкцию.
- 3) Был сконструирован плазмидный вектор, содержащий уникальные последовательности sgRNA и фланкирующих участков L,R-*lchA* для инактивации гена лихенизина в геноме *B. pumilus* 3-19 методом CRISPR/Cas9 редактирования на основе челночного вектора pJOE9282.1.
- 4) Корректность сборки конструкции для инактивации гена лихенизина была подтверждена методом ПЦР и секвенированием.