


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 (магистерская программа): Микробиология и вирусология

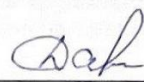
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА CRISPR-РЕДАКТИРОВАННОГО ШТАММА
BACILLUS SUBTILIS С ИНАКТИВИРОВАННЫМ ГЕНОМ *DHBF*,
ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА ПРОДУКЦИЮ СИДЕРОФОРА

Обучающийся 2 курса
группы 01-240-2




Гильмутдинова А.И.

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



Данилова Ю.В.

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Характеристика бактерий рода <i>Bacillus</i>	7
1.2 Сидерофоры.....	8
1.2.1 Синтез, поглощение и экспорт бациллибактина	9
1.2.2 Антагонистическая активность сидерофоров	11
1.3. Характеристика программируемых нуклеаз.....	13
1.3.1 Целевая инактивация генов технологией CRISPR-Cas9 в <i>B. subtilis</i> ...	16
1.4 Получение GFP – меченых штаммов бацилл	19
1.4.1 Флуоресцентные белки в исследовании взаимодействия растений и бактерий	22
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	24
2.1 Штаммы и плазмиды.....	24
2.2 Растения, используемые в работе	24
2.3 Питательные среды и культивирование	24
2.4 Олигонуклеотиды, используемые в работе.....	25
2.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	26
2.6 Электрофоретический анализ ДНК.....	26
2.7 Получение компетентных клеток и трансформация <i>E. coli</i> DH5a	27
2.8 Получение рекомбинантного вектора	28
2.9 Трансформация клеток <i>B. subtilis</i>	29
2.10 Получение штаммов с инактивированным геном биосинтеза бациллибактина <i>dhbF</i>	29
2.11 Исследование способности бактерий к образованию сидерофоров.....	30
2.12 Динамика роста и анализ образования биопленок.....	30
2.13 Антагонистическая активность штаммов <i>B. subtilis</i>	31

2.14	Получение флуоресцентно меченых штаммов и анализ взаимодействия бактерий с растениями	31
2.15	Математическая обработка результатов	32
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1	Конструирование плазмиды, несущей фрагмент гена биосинтеза бациллибактина <i>dhbF</i>	33
3.2	Трансформация штамма <i>B. subtilis</i> 168 сконструированной плазмидой и инактивации гена биосинтеза бациллибактина методом редактирования CRISPR/Cas9.....	37
3.3	Исследование способности бактерий к продукции сидерофоров.....	39
3.4	Динамика роста и образование биопленок	41
3.5	Исследование антагонистической активности штаммов <i>B. subtilis</i>	44
3.6	Получение флуоресцентно меченые штаммов и изучение колонизации корней растений картофеля сорта Жуковский ранний и модельного <i>A. thaliana</i>	46
	ВЫВОДЫ	51
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	52

ВВЕДЕНИЕ

Железо необходимо для большинства процессов роста, являясь кофактором в многочисленных клеточных процессах, таких как цикл трикарбоновых кислот, цепь переноса электронов и окислительное фосфорилирование, а также биосинтез витаминов, антибиотиков, токсинов и других Fe-содержащих ароматических соединений. В естественной среде уровень физиологически доступных концентраций железа может опускаться гораздо ниже 1 мМ, необходимого многим микроорганизмам для оптимального роста. В качестве стратегии выживания многие бактерии, грибы и однодольные растения синтезируют и выделяют высокоаффинные внеклеточные сидерофоры для получения железа.

Катехоловый сидерофор – бациллибактин (ВВ), продуцируемый представителями рода *Bacillus*, является примером хелатора железа, выполняющего множество функций. У *Bacillus subtilis* это основной метаболит усвоения железа с высоким сродством к трехвалентному железу, Fe(III). Дополнительные функции включают изменение сообщества почвенных микроорганизмов, стимулирование роста растений, потенциальное использование в качестве агентов биоконтроля и усиление биоремедиации тяжелых металлов, а также использование в качестве биосенсоров [Puja *et al.*, 2023] и селективных медиаторов антибиотиков для клинических бактерий [Xie *et al.*, 2024; Yin *et al.*, 2024].

Сидерофоры в большом количестве изучались в отношении их вклада в приспособленность и вирулентность бактериальных патогенов. В связи с этим, понимание механизмов биосинтеза на разных стадиях формирования ВВ бактерий *B. subtilis*, а также роли бациллибактина во взаимодействии с растениями открывает возможности для разработки улучшенных штаммов бацилл, новых стратегий биоконтроля и инновационных препаратов для защиты растений.

Целью данного исследования являлась инактивация гена биосинтеза бациллибактина *dhbF* в геноме *B. subtilis* 168 с помощью CRISPR-Cas9 технологии и характеристика полученного штамма.

В соответствии с поставленной целью, в работе решались следующие задачи:

- 1) Получение векторной конструкции для инактивации гена *dhbF* в геноме *B. subtilis* 168;
- 2) Трансформация клеток *B. subtilis* 168 полученным вектором и целевая инактивация гена биосинтеза бациллибактина *dhbF* методом редактирования CRISPR-Cas9;
- 3) Изучение динамики роста и образования биопленок мутантного штамма *B. subtilis* 168 Δ *dhbF*;
- 4) Оценка способности продуцировать сидерофоры и анализ антимикробной активности мутантного штамма;
- 5) Получение флуоресцентно меченых штаммов *B. subtilis* 168 и *B. subtilis* 168 Δ *dhbF* для изучения колонизации корней растений.

ВЫВОДЫ

1) Получена плаزمида (pGAb08.23), несущая в составе sgRNA – спейсерную последовательность, а также фланкирующие последовательности гена-мишени (dhbF-L и dhbF-R), необходимые для осуществления репарации ДНК с помощью HDR.

2) Получены трансформанты *B. subtilis* 168, проведена инактивация гена технологией CRISPR-Cas9. Получен мутантный штамм *B. subtilis* 168 Δ dhbF.

3) Установлено, что инактивация гена *dhbF* привела к снижению динамики роста культуры мутантного штамма на 20% и увеличению образования биопленок на 10 %, по сравнению с нативным штаммом.

4) Полученный мутантный штамм *B. subtilis* 168 Δ dhbF характеризуется сниженным синтезом сидерофоров и увеличением ингибиторной активности на 40% против микромицета *F. oxysporum* DR57, против которого *B. subtilis* 168 не проявлял активности.

5) Анализ колонизации флуоресцентно меченых штаммов показал, что мутантный штамм *B. subtilis* 168 Δ dhbF проявляет большую способность к колонизации и проникновению в корни растений.