

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

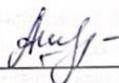
Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА ФАКТОРА СПОРУЛЯЦИИ *SIGF* В ГЕНОМЕ
BACILLUS PUMILUS 3-19

Студент 4 курса
группы 01-805

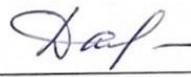
"30" март 2022 г.



(Гильмутдинова А.И.)

Научный руководитель
к.б.н., ассистент

"30" март 2022 г.



(Данилова Ю.В.)

Заведующий кафедрой
микробиологии

д.б.н., профессор

"30" март 2022 г.



(Ильинская О.Н.)

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Секретом бацилл	8
1.2 Факторы споруляции бацилл	12
1.3 Система редактирования генома CRISPR-Cas	18
1.3.1 Целевая инактивация генов с помощью CRISPR-Cas9 технологии у бацилл	24
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	27
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1 Штаммы и плазмиды	27
2.2 Питательные среды и культивирование	27
2.3 Олигонуклеотиды, используемые в работе	28
2.4 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	28
2.5 Выделение плазмидной ДНК	29
2.6 Выделение геномной ДНК	29
2.7 Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля	30
2.8 Получение компетентных клеток <i>E. coli</i> DH5 α	30
2.9 Трансформация ДНК в клетки <i>E. coli</i> DH5 α	30
2.10 Электропорация <i>B. pumilus</i> 3-19	31
2.11 Электрофоретический анализ ДНК	32
2.12 Получение рекомбинантных конструкций	32
2.13 Получение штаммов с инактивированным геном сигма фактора споруляции	32
2.14 Динамика роста	33
2.15 Определение протеолитической активности	33
2.16 Динамика спорообразования	34

2.17 Математическая обработка результатов	34
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	35
3.1 Конструирование плазмиды несущей фрагмент гена фактора споруляции <i>sigF</i>	35
3.2 Получение рекомбинантного штамма <i>B. pumilus</i>	39
3.3 Инактивация гена фактора споруляции <i>sigF</i> методом редактирования CRISPR/Cas9	41
3.4 Динамика роста и спорообразования, протеолитическая активность мутантного штамма	43
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	49

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus subtilis, охарактеризованная грамположительная бактерия, широко используется для производства гетерологичных белков. В целом виды *Bacillus* обладают повышенной секреторной способностью белка и признаны безопасными (GRAS), что делает их важными продуцентами для производства антибиотиков, лекарственных белков и промышленных ферментов.

B. pumilus широко распространен в почвах, где помогает утилизировать питательные вещества путем секреции гидролаз, разлагающих макромолекулы, таких как амилазы, протеазы, целлюлазы и фосфатазы. В сложных условиях окружающей среды с прерывистым поступлением питательных веществ, абиотическим стрессом и конкуренцией со стороны различных микроорганизмов, виды *Bacillus* разработали ряд стратегий для повышения своей конкурентоспособности и выживания, среди которых спорообразование. Также в промышленных процессах ферментации микроорганизмы часто сталкиваются с подобными неблагоприятными условиями, и бактерии могут образовывать споры, чтобы противостоять враждебным физическим и химическим воздействиям в биореакторе, что повышает требования и трудность промышленных операций, таких как неполная стерилизация и снижение выхода ферментов. Большинство процессов ферментации подвержены микробному загрязнению и требуют энергоемкого процесса стерилизации, что увеличивает потребление энергии и сложность процесса, способствуя высокой стоимости биопродуктов [Zhou *et al.*, 2019].

Вырезание и интеграция генов - часто используемая процедура для инженерии специфических мутаций у *Bacillus* и других грамположительных бактерий. За последние несколько лет адаптивная иммунная система на основе CRISPR-Cas из бактерий и архей была перепрофилирована для универсального редактирования генома или транскрипционной регуляции у многих различных видов.

Таким образом, удаление генов, связанных со споруляцией, может привести к улучшению синтеза ферментов. В частности, для инициации спорообразования главный регулятор споруляции Spo0A активирует экспрессию специфического сигма-фактора РНК-полимеразы, SigF, в предспоре. Данный сигма-фактор является первым в регуляторном каскаде, контролирующем споруляцию. Таким образом, инактивация *spoIIAC* (*sigF*) может в значительной степени блокировать споруляцию *B. pumilus*.

Цель исследования заключалась в создании штамма *B. pumilus* 3-19 с инактивированным геном фактора споруляции *sigF*.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

- 1) Сконструировать плазмиду, имеющую в своем составе фрагмент гена фактора споруляции *sigF*;
- 2) Провести интеграцию полученной плазмиды в клетки *B. pumilus* 3-19;
- 3) Осуществить инактивацию гена фактора споруляции *sigF* методом редактирования CRISPR/Cas9;
- 4) Изучить динамику роста и спорообразования, а также протеолитическую активность исследуемых штаммов.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирована плазмида (pGAs11.21) для инактивации гена фактора споруляции *sigF* в *B. pumilus* 3-19, на основе системы CRISPR/Cas9. В плазмиду встроена sgRNA – спейсерная последовательность, а также фланкирующие последовательности гена-мишени (*sigF-L* и *sigF-R*), необходимые для осуществления репарации ДНК с помощью гомологичной рекомбинации.

2. Проведена трансформация pGAs11.21 в клетки *B. pumilus* 3-19 методом электропорации. Эффективность составила 119.45 трансформантов/мкг ДНК.

3. Проведена инактивация гена фактора споруляции *sigF*. Получен мутантный штамм *B. pumilus* 3-19 (Δ *sigF*).

4. Получен аспорогенный мутантный штамм путем удаления гена сигма фактора споруляции *sigF*. Протеолитическая активность рекомбинантного штамма *B. pumilus* 3-19 (Δ *sigF*) при этом ниже, чем у нативного штамма на 53%, однако сохранена.