

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 (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

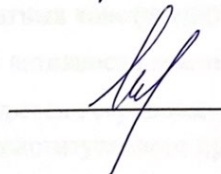
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ СУБТИЛИЗИНОПОДОБНОЙ
ПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS PUMILUS* В ШТАММАХ *BACILLUS*
SUBTILIS.

Обучающийся 2 курса
группы 01-040-2



А. В. Солодкая

Научный руководитель
д-р биол. наук, профессор



М.Р. Шарипова

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань–2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Сериновые протеиназы бактерий	6
1.2 Штаммы-продуценты гетерологичных белков	20
1.3 Практическое применение протеиназ	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	28
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	28
2.1. Штаммы бактерий и вектора	28
2.2 Питательные среды и культивирование	29
2.3 Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса	30
2.4 Трансформация клеток <i>B. subtilis</i> 2036	31
2.5 Трансформация клеток <i>B. subtilis</i> 27–31 и <i>B. subtilis</i> Δ6	31
2.6 Полимеразно–цепная реакция	31
2.7 ДНК электрофорез	32
2.8 Изучение динамики роста и активности протеиназы	33
2.9 Изучение протеолитической активности на азоказеине	33
2.10 Статистическая обработка данных.....	34
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	35
3.1 Трансформация рекомбинантных конструкций	35
3.2 Изучение динамики роста и активности рекомбинантных штаммов.....	37
3.3 Сравнительный анализ экспрессии сериновых протеиназ <i>B. pumilus</i> под контролем индуцибельного и конститутивного промотора.....	42
ВЫВОДЫ	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	45

ВВЕДЕНИЕ

Использование рекомбинантных штаммов бацилл в качестве продуцентов протеиназ – одно из актуальных направлений современной биоинженерии. Вместе с тем, наличие комплекса внеклеточных протеиназ в секретоме бацилл создает проблему в генной инженерии и биотехнологии, поскольку снижает накопление гетерологичных белков в культуральной жидкости продуцентов вследствие их расщепления внеклеточными протеиназами. Решение этой проблемы связано с созданием новых штаммов-продуцентов и применением экспрессионных систем, основанных на индуцибельных бациллярных промоторах.

Практически важной группой протеолитических ферментов являются сериновые протеиназы. Они обнаружены у бактерий, вирусов, простейших и высших эукариот [Rawlings *et al.*, 2012]. Сериновые протеиназы эукариот участвуют в регуляции эмбриогенеза и развитии патологических состояний. Исследование прокариотических аналогов этих ферментов является удобной моделью для разработки инновационных лекарственных средств и кормовых добавок. Расшифровка механизмов регуляции генов прокариотических сериновых протеиназ может стать основой для новой стратегии получения гетерологичных белков и создания высокоэффективных систем их экспрессии, что является актуальным направлением современной молекулярной биотехнологии.

Цель работы – сравнительный анализ экспрессии субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* под контролем индуцибельного и конститутивного промоторов и разных сигнальных пептидов в составе рекомбинантных штаммов *B. subtilis*.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

1) Получение трансформантов на основе протеазодефицитного штамма *B. subtilis* 20-36 и штаммов с редактированными геномами *B. subtilis* Δ6 и *B. subtilis* 27-31.

2) Сравнительное изучение динамики роста и накопления протеолитической активности штаммов-трансформантов.

3) Сравнительное изучение динамики роста и накопления протеолитической активности у трансформантов в зависимости от гетерологичного промотора.

4) Сравнительное изучение динамики роста и накопления протеолитической активности у трансформантов в зависимости от гетерологичного сигнального пептида.

ВЫВОДЫ

1) Получены трансформанты, несущие ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* 7P/3-19 на основе протеазодефицитного штамма *B. subtilis* 2036 и штаммов *B. subtilis* с редактированными CRISPR/cas геномами: PG 27–31 и $\Delta 6$, а также трансформанты, включающие гетерологичные промоторы и сигнальные пептиды.

2) У рекомбинантов на основе протеазодефицитного (20-36) и редактированных штаммов (PG 27–31 и $\Delta 6$) наблюдали схожий характер динамики роста. Динамика накопления протеолитической активности у штаммов 20-36 и $\Delta 6$ носит двухфазный характер, у штамма 27-31 – однофазный, активность субтилизиноподобной протеиназы в 1,5 выше в рекомбинантном штамме *B. subtilis* $\Delta 6$.

3) Установлено, что замена собственного сигнального пептида гена субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* 7P/3-19 (SP_{AprBr}) на рекомбинантный смоделированный сигнальный пептид SP_{Asp} привела к увеличению секреции фермента в ~ 3 раза в рекомбинантных штаммах.

4) Показано, что экспрессия субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* 20-36 под контролем индуцибельного промотора P_{Lial} в 2 раза эффективнее, чем в рекомбинантных штаммах под контролем конститутивного P_{degQ36} промотора.