

**CRISPR/Cas9 – редактированный штамм *Bacillus subtilis* как продуцент
внеклеточной металлопротеиназы *B. pumilus***

Научный руководитель – Рудакова Наталья Леонидовна

Хасанов Дамир Ильдарович

Выпускник (бакалавр)

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной
медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия

E-mail: hasda2149@gmail.com

Учеными Казанского федерального университета, была впервые выделена и охарактеризована новая металлэндопептидаза (MprBp) из культуральной жидкости природного штамма *Bacillus pumilus* 3-19. Идентифицированная металлопротеиназа представляет собой первый бактериальный фермент - гомолог эукариотических астафинов и адамализинов среди внеклеточных протеиназ бацилл. Для более детального изучения структуры и функций данного фермента необходима эффективная система экспрессии целевого белка.

Целью настоящей работы явилась трансформация экспрессионным вектором pGP382, несущим ген *mprBp* [1], штамма *Bacillus subtilis* дельта 6 с deletированными профагами природного штамма *B. subtilis* WT 168 с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 [2], а также оценка эффективности полученной экспрессионной системы.

Трансформацию *B. subtilis* дельта 6 проводили путем электропорации бактериальных клеток. Для подтверждения наличия в штамме *B. subtilis* дельта 6 вектора, несущего ген *mprBp* проводили ПЦР - амплификацию с последующим электрофоретическим разделением амплифицированных фрагментов ДНК в 2% агарозном геле.

Изучение динамики роста трансформированного штамма *B. subtilis* дельта 6+*mprBp* показало, что культура демонстрирует экспоненциальный рост до 22 часа, а после 46 часа следует стадия отмирания.

Фермент экспрессируется на протяжении всего периода роста штамма с максимумом активности на 46 час, что соответствует поздней стационарной фазе роста бактериальной культуры. Для определения доли MprBp в общем пуле детектированной протеолитической активности параллельно определяли уровень активности фермента в присутствии специфического ингибитора металлопротеиназ 1,10-фенантролина (5 мМ). Остаточная активность в присутствии ингибитора составила не более 20%, что указывает на преобладание MprBp в пуле внеклеточных протеаз.

Результатом проделанной работы было получение эффективного штамма-продуцента адамализиноподобной металлопротеиназы MprBp, который будет использован при наращивании фермента для последующих исследований.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Источники и литература

- 1) Корягина А.О. Протеиназа бацилл на основе генной конструкции как кормовая добавка для птицеводства / А.О.Корягина, Н.Л. Рудакова, М.Т. Лутфуллин, Г.Ф. Хадиева, А.А. Тойменцева, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова // Сельскохозяйственная биология. - 2018. - Т.53, №6. - С. 1274-1284. doi: 10.15389/agrobiology.2018.6.1274rus
- 2) Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System / J. Altenbuchner // Appl. Environ. Microbiol. - 2016. -V. 82(17). -P. 5421-5427. doi: 10.1128/AEM.01453-16