

Создание CRISPR/Cas9 вектора для инактивации гена бациллибактина в геноме *Bacillus pumilus* 3-19

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

Волкова Е.С.¹, Хасанов Д.И.², Гильмутдинова А.И.³, Ласточкина Е.Э.⁴, Васильева Ю.А.⁵

1 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: katenvol@mail.ru*; 2 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: hasda2149@gmail.com*; 3 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: aigwinrygilmayizn@gmail.com*; 4 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: lelya_lastochkina@bk.ru*; 5 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: vasileva891@mail.ru*

Bacillus pumilus – одна из наиболее активно изучаемых бактерий, стимулирующих рост растений. Важной характеристикой *B. pumilus* является потенциальная способность к синтезу сидерофор. Основная функция сидерофор заключается в связывании железа в почве и увеличении его подвижности и доступности для растений. Данный микроэлемент играет значимую роль в жизнедеятельности как растений, так и бактерий. Возможность связывания сидерофорами ионов двухвалентных металлов создает предпосылки для использования бактерий *B. pumilus* в сельском хозяйстве в борьбе с фитопатогенами, снижая для них доступность железа, а также выведение ионов токсичных металлов для обезвреживания загрязненной почвы. Анализ генома *B. pumilus* 3-19 из коллекции микроорганизмов НИЛ «Агробиоинженерия» КФУ показал наличие гена сидерофора катехолового типа бациллибактина [1]. Для определения роли данного сидерофора при взаимодействии *B. pumilus* 3-19 с растениями необходимо исследовать как целевая инактивация данного гена скажется на микробно-растительных взаимоотношениях.

Целью данной работы явилось создание плазмидного вектора для целевой инактивации гена бациллибактина в геноме *B. pumilus* 3-19 с помощью технологии CRISPR/Cas9.

В работе был использован вектор рJОЕ9282.1, содержащий систему CRISPR/Cas9 [2]. Данный вектор содержит ген *cas9* под контролем ксилоза-индуцируемого промотора (Р_{xyI}) и два сайта рестрикции для вставки направляющей последовательности (sgRNA) и фланкирующих участков гена-мишени для гомологичной рекомбинации (L,R-участки). Последовательность sgRNA, направляющей *cas9* к гену-мишени, интегрировали в вектор рJОЕ9282.1 по сайту рестрикции *BsaI*. L,R-участки гена бациллибактина получили с геномной ДНК *B. pumilus* 3-19 методом ПЦР, после чего встроили по сайту рестрикции *SfiI*. Наличие вставок sgRNA и фланкирующих последовательностей гена-мишени подтверждали методом ПЦР-анализа и секвенированием.

В результате проделанной работы был получен вектор рVEb11.23 для трансформации в клетки *B. pumilus* 3-19 с целью получения делеционного мутанта с инактивированным геном бациллибактина. После чего полученный штамм будет использован для дальнейших экспериментов по выяснению роли бациллибактина *B. pumilus* 3-19 в микробно-растительных взаимодействиях на *Solanum tuberosum* L. и *Arabidopsis thaliana*.

Работа выполнена за счет средств гранта РНФ №22-16-00138.

Источники и литература

- 1) D. S. Pudova et al., “Comparative Genome Analysis of Two *Bacillus pumilus* Strains Producing High Level of Extracellular Hydrolases,” *Genes (Basel)*, vol. 13, no. 3, pp. 409, Feb. 2022, doi:10.3390/genes13030409
- 2) J. Altenbuchner, “Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system” *Applied and environmental microbiology*, vol. 82, no. 17, pp. 5421–5427, Aug. 2016, doi: 10.1128/AEM.01453-16.