Секция «Микробиология»

Разработка векторной конструкции для инактивации гена лихенизина в геноме Bacillus pumilus методом CRISPR/Cas9 редактирования

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

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

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

Биосурфактанты представляют собой вторичные метаболиты микроорганизмов, растений, высших животных, и по своим свойствам они выступают в качестве поверхностоактивных веществ (ПАВ). На сегодняшний день область применения биосурфактантов весьма разнообразна, они зарекомендовали себя в нефтяной и добывающей промышленности, медицине, косметологии и т.д. Рассмотрение функций биосурфактантов также немаловажно и для устойчивого развития сельского хозяйства. Известно, что биосурфактанты, продуцируемые ризобактериями, обладают антагонистическими свойствами против патогенов растений. Применение биосурфактантов в сельском хозяйстве также способствует развитию таких механизмов взаимодействия микроорганизмов с растениями, как антибиоз, конкуренция и индуцированная системная устойчивость [1]. Однако для более глобального понимания роли биосурфактантов микроорганизмов на растения необходимо изучить как целевая инактивация генов, отвечающих за выработку сурфактантов у штаммов-продуцентов ризобактерий скажется на их микробно-растительных взаимодействиях. В качестве перспективных продуцентов биосурфактантов выступают почвенные бактерии рода *Bacillus*, поэтому в настоящей работе нами был выбран штамм *Bacillus pumilus* 3-19 из коллекции микроорганизмов НИЛ «Агробиоинженерия», продуцирующий биосурфактант лихенизин.

Целью данного исследования явилось создание плазмидного вектора для целевой инактивации гена гена лихенизина в геноме *Bacillus pumilus* 3-19 методом CRISPR/Cas9 редактирования.

В настоящей работе был использован вектор pJOE9282.1, содержащий систему CRISPR/Cas9 находящуюся под контролем ксилоза-индуцируемого промотора P_{xyl} [2]. Для вставки направляющей последовательности (sgRNA) вектор предварительно расщепляли по сайту рестрикции BsaI, после чего последовательность sgRNA интегрировали в рестрицированный вектор. После этого были получены фланкирующие последовательности гена лихенизина методом ПЦР с геномной ДНК *B. pumilus* 3-19, которые затем встроили по сайту рестрикции SfiI вектора pJOE9282.1. Наличие вставок sgRNA и фланкирующих последовательностей гена-мишени подтверждали методом ПЦР и секвенированием.

В результате работы был получен и клонирован вектор pLEl11.23, который будет трансформирован в клетки *B. pumilus* 3-19 методом электрофорации для получения делеционного мутанта с инактивированным геном лихенизина. После чего полученный штамм будет трансформирован плазмидным вектором, содержащим GFP белок для дальнейших

экспериментов по выяснению роли биосурфактантов в микробно-растительных взаимодействиях на *Solanum tuberosum* L. и *Arabidopsis thaliana*.

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства "ПРИОРИТЕТ 2030".

Источники и литература

1 D.P. Sachdev, S.S. Cameotra, “Biosurfactants in agriculture,” Applied microbiology and biotechnology, vol. 97, no. 3, pp. 1005-1016, Jan. 2013, doi:10.1007/s00253-012-4641-8

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.