

ДИНАМИКА РОСТА МУТАНТНЫХ ШТАММОВ *B. PUMILUS* 3-19 С ДЕЛЕТИРОВАННЫМИ ГЕНАМИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Ю.А. Васильева – аспирант, **М.Р. Шарипова** – научный руководитель

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия, e-mail: vasilova891@mail.ru

Аннотация. Создание экономически выгодных клеточных фабрик в целях высокоэффективного производства протеиназ является актуальной задачей для современной биотехнологии. В настоящей работе с помощью системы CRISPR-Cas9 инаktivированы гены бацилизина и бактериоцина в геноме штамма *Bacillus pumilus* 3-19. Изучена динамика роста, протеолитическая активность полученных мутантных штаммов.

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, протеиназы, CRISPR-Cas9, инаktivация генов, антимикробные пептиды.

Представители рода *Bacillus* широко используются в разных отраслях биотехнологического производства, например, сельскохозяйственной, фармацевтической и пищевой промышленности [1]. Бациллы эффективно продуцируют различные гидролитические ферменты, в том числе, протеиназы, которые эффективно гидролизуют пептидные связи внутри белковых соединений. Широкая субстратная специфичность и устойчивость в обширных диапазонах pH и температуры позволяют целенаправленно использовать протеиназы в практических целях.

Актуальными кандидатами для синтеза протеиназ являются бактерии *Bacillus pumilus* 3-19. Однако многие физиологические процессы, такие как спорообразование, конкурентная секреция поверхностных липопептидов и антимикробных метаболитов, мешают эффективно использовать штаммы рода *Bacillus*. В связи с этим, мы предположили, что инаktivация генов антимикробных пептидов бацилизина и бактериоцина увеличит производительность клеток штамма *B. pumilus* 3-19. В последние годы именно система CRISPR-Cas9 часто применяется для изменения геномов бактерий рода *Bacillus*, например, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* [2]. Таким образом, данная технология редактирования позволила получить новые штаммы с экономически выгодными свойствами.

В работе использовались штаммы бактерий *B. pumilus* 3-19 (strR); *E. coli* DH5α и шаттл-вектор pJOE9282.1, содержащий систему CRISPR/Cas9 [3]. В качестве питательных сред применяли LB (Lysogeny broth) и LA-агар.

Для инаktivации целевых генов были получены векторные конструкции на основе шаттл-вектора pJOE9282.1. Предварительно выделенные плазмиды обрабатывали рестриктазой *BsaI* (рисунок 1). Гибридизацию праймеров спейсерных фрагментов (gRNA) проводили параллельно. Для лигирования шаттл-вектора pJOE9282.1 с sgRNA использовали T4 ДНК-лигазу (5 Ед/мкл) (Thermo Fisher Scientific, USA).

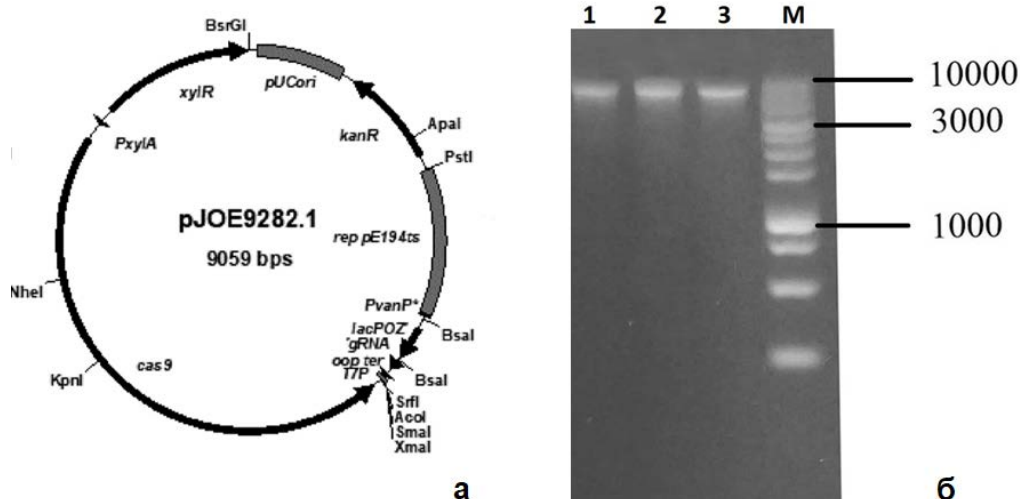


Рисунок 1 (а) Схема шаттл-вектора pJOE9282.1. Регион pUCori – точка начала репликации плазмиды; *kanR* – ген устойчивости к канамицину; *BsaI*, *SfiI* – сайты рестрикции. (б) Электрофорез рестрицированных векторов; 1-3 – вектора pJOE9282.1; М – ДНК-маркер (1 Кб).

Полученную конструкцию pJOE9282.1-sgRNA клонировали в *E. coli* DH5α. Нарботку фрагментов генов бацитизина (*bac*) и бактериоцина (*bact*) осуществляли с геномной ДНК *B. pumilus* 3-19 с помощью Phusion-полимеразы (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, ThermoFisher Scientific, USA). Полученные участки встраивали в вектор по сайту *SfiI* и клонировали в клетках *E. coli* DH5α. Целостность конструкции подтверждали секвенированием. Полимеразную цепную реакцию с колоний трансформированных клеток проводили для подтверждения наличия шаттл-вектора pJOE9282.1 (рисунок 2).

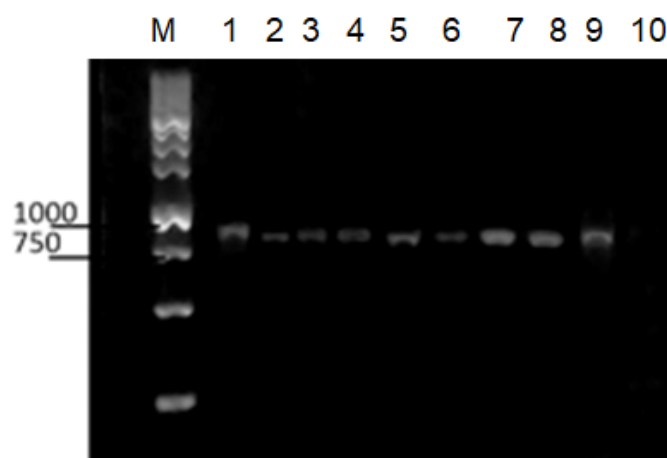


Рисунок 2 Электрофорез продуктов амплификации гена *cas9* с колоний *E. coli* DH5α: М – ДНК-маркер (1 Кб); 1-4 – колонии с конструкцией pDIb11.21; 5-8 – колонии с конструкцией pVYb11.21; 9 – положительный контроль; 10– отрицательный контроль.

В результате нами были получены две плазмиды, содержащие систему CRISPR/Cas9, sgRNA и фрагменты генов бацитизина (pDIb11.21) и бактериоцина (pVYb11.21) для гомологичной репарации.

Полученные векторные конструкции трансформировали в клетки *B. pumilus* 3-19 методом электропорации (рисунок 3) [4]. Целевую инактивацию генов выполняли на среде LA с добавлением ксилозы (0,2%) и канамицина (15 мкг/мл). Для инактивации плазмиды с CRISPR/Cas9, отобранные мутанты инкубировали при температуре 42 °C.

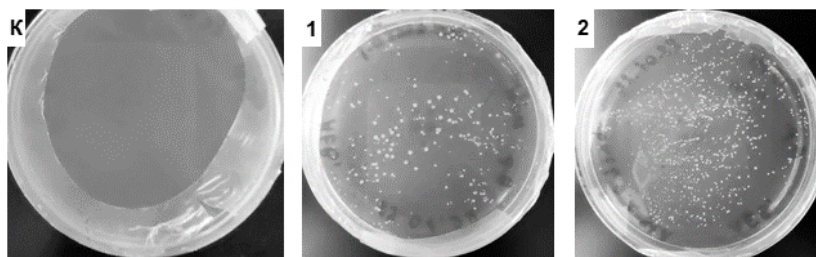


Рисунок 3 Колонии трансформированных клеток *B. pumilus* 3-19. К – отрицательный контроль; 1 – колонии трансформантов *B. pumilus* 3-19 с вектором pDIb11.21; 2 – колонии трансформантов *B. pumilus* 3-19 с вектором pVYb11.21.

В результате целевой инактивации генов бацитизина и бактериоцина нами были получены мутантные штаммы *B. pumilus* 3-19 с неактивными генами антимикробных пептидов.

Изучение динамики роста дикого и мутантных штаммов проводили в течение 83 часов. Протеолитическую активность определяли по расщеплению азоказеина (Sigma, USA) в концентрации 10 мг/мл растворенного в 0.05 М Трис-HCl-буфере, pH 7.3 [5].

В результате дикий штамм *B. pumilus* 3-19 достиг максимального значения оптической плотности равное $OD_{590}=2,13$ на 37 часов культивирования. В то же время показатели оптической плотности мутантного штамма *B. pumilus* 3-19 (Δbac) были близки к динамике роста *B. pumilus* 3-19, а максимальное количество клеток было достигнуто на 33 час роста культуры ($OD_{590}=2,09$) (рисунок 4).

Однако по сравнению с двумя исследуемыми штаммами, у мутантного штамма *B. pumilus* 3-19 ($\Delta bact$) лаг-фаза оказалась удлинённой и завершилась к 15 час культивирования. Биомасса *B. pumilus* 3-19 ($\Delta bact$) достигла максимального значения на 27 час ($OD_{590}=1,52$) и была значительно ниже по сравнению с диким штаммом. Далее культура вышла на продолжительную стационарную фазу, длившуюся с 27 по 67 часов (рисунок 5).

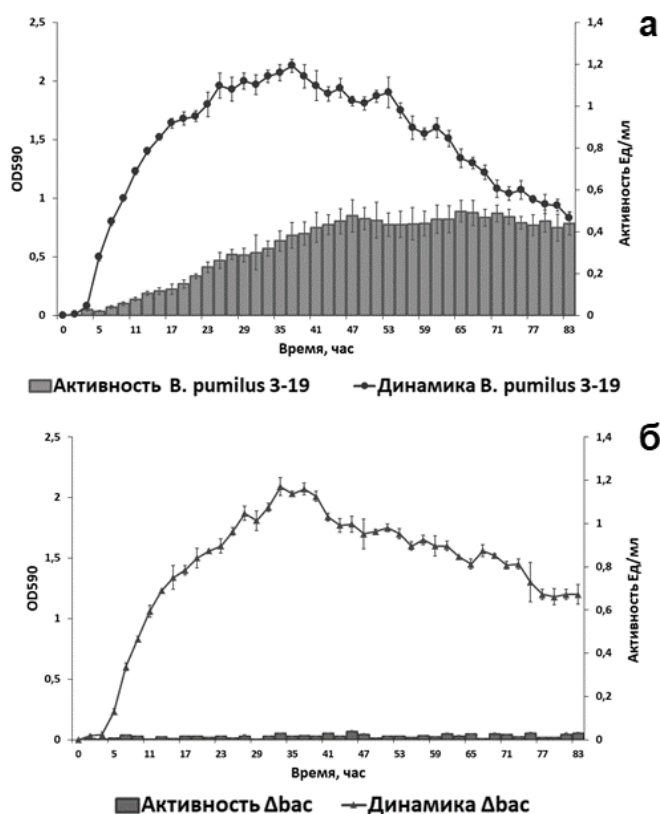


Рисунок 4 Динамика роста и протеолитическая активность *B. pumilus* 3-19 и мутантного штамма *B. pumilus* 3-19 (Δbac).

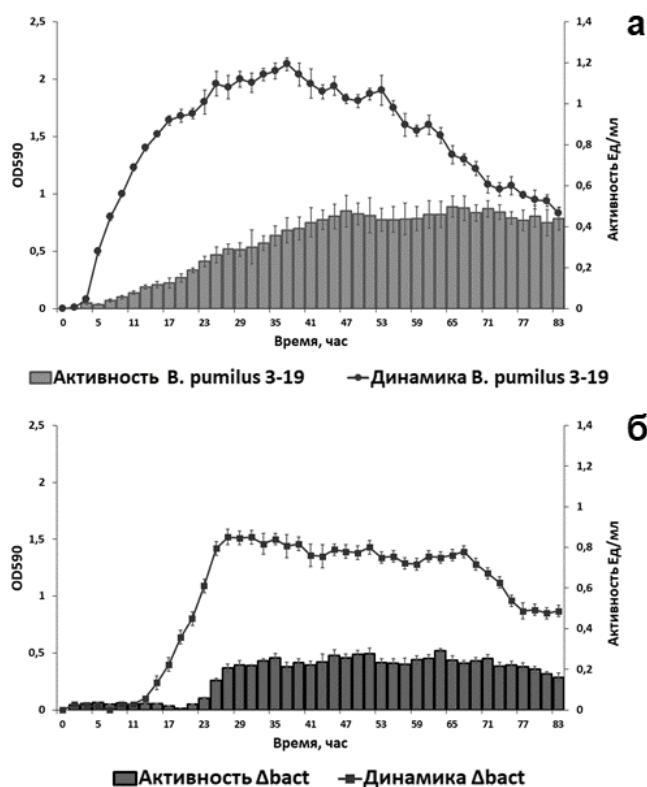


Рисунок 5 Динамика роста и протеолитическая активность *B. pumilus* 3-19 и мутантного штамма *B. pumilus* 3-19 ($\Delta bact$).

В результате проведенных исследований максимальная активность протеолитических ферментов наблюдалась у дикого штамма *B. pumilus* 3-19 на 65 час культивирования и составляла – 0,498 Ед/мл. В то же время активность внеклеточных ферментов у мутантных штаммов Δbac и $\Delta bact$ снизилась по сравнению с диким типом и была равна 0,027 Ед/мл и 0,291 Ед/мл, соответственно (рисунок 4, 5).

Таким образом, с помощью технологии CRISPR-Cas9 нами была проведена целевая инактивация генов пептидов с антимикробной активностью в геноме *B. pumilus* 3-19. Посредством анализа динамики роста и протеолитической активности, показано влияние инактивации генов бацилизина и бактериоцина на рост клеток *B. pumilus* 3-19, внеклеточную секрецию протеолитических ферментов и антагонистическую активность. Установлено, что инактивация генов антимикробных пептидов в геноме *B. pumilus* 3-19 привела к изменению динамики роста культуры и снижению протеолитической активности редактированных штаммов (в 18,4 раза для Δbac и 2 раза для $\Delta bact$).

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (приоритет 2030).

Библиографический список.

1. Efficient genome editing in *Bacillus licheniformis* mediated by a conditional CRISPR/Cas9 system / Y. Li [et al.] // Microorganisms. 2020. №8. P. 754.
2. Development and application of a highly efficient CRISPR-Cas9 system for genome engineering in *Bacillus megaterium* / P. Hartz [et al.] // Journal of Biotechnology. 2021. №329. P. 170-179.
3. Toymentseva A. A., Altenbuchner J. New CRISPR-Cas9 vectors for genetic modifications of *Bacillus* species // FEMS microbiology letters. 2019. №366. P. fny284.
4. Optimization of Electroporation Conditions for *Bacillus pumilus* 3–19 Strain / I. V. Danilova [et al.] // BioNanoScience. 2022. №12. P. 752-756.
5. Modification of substrate-binding site of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius* / I. V. Demidyuk [et al.] // Protein Eng Des Sel. 2004. №17. P. 411-416.