

**Поиск генов-кандидатов для направленного редактирования генома *Bacillus pumilus* 7P методом CRISPR/Cas9.****Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна*****Пудова Дарья Сергеевна****Студент (магистр)*

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

*E-mail: DashulyaBaranova@mail.ru*

Бациллярные протеиназы имеют высокий потенциал практического использования в птицеводстве в качестве кормовых добавок. Использование протеиназ способно усилить усвоение белков животными и птицами, увеличивает биодоступность азота, снижая уровень загрязнения почвы аммиаком. На сегодняшний день используется ограниченное количество коммерческих препаратов протеиназ, поэтому поиск новых перспективных ферментов-кандидатов является важной задачей микробной биотехнологии. Потенциальными кандидатами для практического использования являются протеиназы *B. pumilus*. Однако высокий уровень спорообразования, конкурентная секреция других внеклеточных белков во время ферментации, а так же синтез поверхностных липопептидов могут препятствовать внеклеточному продуцированию и очистке целевого белка. С целью получения эффективной экспрессии генов внеклеточных протеиназ мы планируем провести редактирование генома *B. pumilus* 7P путем использования метода CRISPR/Cas9. С помощью данной системы появилась возможность удалять специфические последовательности генов с высокой точностью и эффективностью, создавая при этом мутантные штаммы с необходимыми свойствами. Для эффективного использования технологии CRISPR/Cas9 необходимо наличие точной информации о расположении и последовательностях генов в геноме. Целью данной работы являлось завершение секвенирования и сборка полного генома *B. pumilus* 7P, аннотация и подбор генов-кандидатов для направленного редактирования методом CRISPR/Cas9.

Полногеномное секвенирование штамма *B. pumilus* 7P проводили на платформах Ion Torrent, 454 GS Junior и Oxford Nanopore MinION, что обеспечило общее покрытие генома равное 42x. Сборку генома проводили с использованием геномного ассемблера SPAdes v.3.12.0, качество сборки проверяли с помощью программы QUAST v.2.3. В результате была получена полная последовательность генома длиной 3.61 Мб, которую депонировали в базу данных NCBI под номером CP058911.1. Аннотацию генома выполняли с помощью автоматического аннотатора NCBI PGAP и программы Prokka v.1.12. Наличие в геноме штамма генов внеклеточных протеолитических ферментов устанавливали с помощью базы данных MEROPS и SignalP v.4.1. Удаление генов внеклеточных протеиназ может способствовать увеличению секреции нативных ферментов - субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы. В результате было найдено 143 гена протеиназ, среди которых 12 генов кодируют внеклеточные ферменты (*epr*, *gseBp*, *aprBp*, *vpr*, *bprA*, *aprN*, *mprBp* и др.). Используя базы данных IMG\_ER\_v5.0, RAST\_v2.0 и сервер antiSMASH были идентифицированы ген второй стадии споруляции *spoIIAC* (*sigF*), кластеры биосинтеза антимикробных метаболитов (бацилликцина, бациллизина, бактериоцина) и поверхностных липопептидов (лихенизина), которые могут препятствовать секреции и очистке целевого белка. В дальнейшем планируется провести редактирование генома штамма *B. pumilus* 7P, путем удаления найденных генов с помощью системы CRISPR/Cas9.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-08-00853 (А).