

**Создание вектора для целевой инактивации гена бацилизина в геноме
Bacillus pumilus 3-19**

Научный руководитель – Данилова Юлия Васильевна

Дядькина Илона Владимировна

Студент (бакалавр)

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

E-mail: ilonadiadkina@gmail.com

Представители рода *Бацилл* считаются важными промышленными бактериями из-за их способности секретировать большое количество протеаз, которые находят широкое применение в промышленных процессах [1]. Увеличение экспрессии генов различных протеиназ *Бацилл* остается одной из основных задач генной инженерии. Повысить выход целевых протеиназ в клетке можно путем удаления из генома генов, работа которых может препятствовать экспрессии генов протеиназ. В данной работе в качестве мишени для инактивации был выбран ген бацилизина (*bac*) в геноме *Bacillus pumilus* 3-19. Бацилизин представляет собой пептидный антибиотик, который проявляет противомикробную и противогрибковую активность [2]. Мы предполагаем, что удаление гена *bac* позволит клеткам *B. pumilus* секретировать протеиназы с большей эффективностью, не тратя свои ресурсы на экспрессию и секрецию бацилизина. Целью работы было создание вектора, несущего фрагменты гена бацилизина на основе шаттл-вектора рJОЕ9282.1, содержащего систему CRISPR-Cas9 для целевого нокаута гена. Плазмиду рJОЕ9282.1 расщепляли по сайту рестрикции *BsaI* и проводили интеграцию спейсерного фрагмента, полученного путём гибридизации праймеров 5'-ctcgATTTCAAGAACAATGC-3' и 5'-aaacGCATTTGTTCTTGAAAT-3'. Далее, два ПЦР фрагмента (*bac-L* (404 bp) and *bac-R* (402 bp)), полученных с геномной ДНК *B. pumilus*, клонировали по сайту *SfiI*. В результате клонирования получили плазмиду рDIb11.21. Далее планируется провести трансформацию *B. pumilus* 3-19 вектором рDIb11.21 и целевую инактивацию гена *bac* методом редактирования CRISPR/Cas9. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана грантом РФФИ № 19-08-00853 (А).

Источники и литература

- 1) Contesini F. J., Melo R. R., Sato H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application // *Critical reviews in biotechnology*. 2018, Vol.38(3). p. 321-334.
- 2) Steinborn G., Hajirezaei M. R., Hofemeister J. *bac* genes for recombinant bacilysin and anticapsin production in *Bacillus* host strains // *Archives of microbiology*. 2005, Vol.183(2). p. 71-79.