

## Редактирование геномов продуцентов антибиотиков при помощи CRISPR-Cas системы

Научный руководитель – Остерман Илья Андреевич

*Точилкина Мария Сергеевна*

*Студент (специалист)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет  
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

*E-mail: mtoch@mail.ru*

В настоящее время проблема резистентности бактериальных патогенов к антибиотикам остаётся актуальной, поэтому поиск и изучение новых веществ, обладающих антибактериальными свойствами, имеет первостепенное значение. Изучение кластеров генов биосинтеза антибиотиков важный этап в изучении механизма синтеза вещества и его действия. Генно-инженерные методы редактирования генома являются незаменимым инструментом для решения подобных задач. Так CRISPR-Cas система позволяет получить клоны с knock-out целевых генов и таким образом подтвердить или опровергнуть их предполагаемые функции в процессе биосинтеза антибиотика. Также с помощью этой технологии можно увеличивать продукцию антибиотика за счёт исключения регуляторных генов синтеза активного вещества. Поэтому отработка методики редактирования генов кластера биосинтеза антибиотиков является практически важной задачей.

В качестве объектов для отработки методики были выбраны два вида бактерий: *Amycolatopsis* sp. A23 - продуцент тетраценомицина X, ингибитора синтеза белка [1], и *Streptomyces* sp. Реб - продуцент нибомидина, обладающего антибактериальными свойствами. [3] В качестве целевых были выбраны ген из кластера биосинтеза тетрациномицина X - AfsR, являющийся транскрипционным регулятором, и ген NubW из кластера биосинтеза нибомидина. Ожидается, что нокауты этих генов обеспечат увеличенную продукцию антибиотиков.

Для редактирования данных генов использовалась система Crispr-Cas9. Продуценты *Amycolatopsis* sp. A23 и *Streptomyces* sp. Реб были трансформированы (посредством электропорации) плазмидами, содержащими ген нуклеазы Cas9, соответствующие последовательности gRNA и ген апрамициновой устойчивости. Трансформация *Streptomyces* sp. Реб проводилась по нескольким протоколам, устойчивые клоны не были получены. В случае с *Amycolatopsis* sp. A23 были получены устойчивые клоны, в которых методом ПЦР детектировался ген устойчивости к апрамицину, однако ген нуклеазы Cas9 не был обнаружен. Поэтому далее для редактирования генома *Amycolatopsis* sp. A23 планируется использовать систему Crispr-Cas12a. [2] Будут осуществлены две последовательные трансформации продуцента: плазмидой, содержащей ген Cas12a, который должен встроиться в геном, далее плазмидой содержащей последовательность соответствующей crRNA. Так как выполненные протоколы электропорации *Streptomyces* sp. Реб продемонстрировали неэффективность данного метода, далее предполагается вносить плазмиды в клетку с помощью конъюгации со штаммом *E.coli*.

Таким образом, был отработан протокол трансформации *Amycolatopsis* sp. A23 и выявлена неэффективность электропорации для *Streptomyces* sp. Реб.

### Благодарности

Работа выполнена под руководством Остермана И.А., при поддержке гранта РФФИ 19-34-51021.

### Источники и литература

- 1) I.A. Osterman. Tetracenomycin X inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel
- 2) Yajuan Zhou. CRISPR-Cas12a-assisted genome editing in *Amecolopsis mediterranei*
- 3) Yuliya V. Zakalyukina. Nybomycin-producing *Streptomyces* isolated from carpenter ant *Camponotus vagus*