

Экспрессия модифицированных генов протеиназ *B. pumilus* 7P в редуцированном штамме *B. subtilis* ПГ-Bs27-28.

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

Васильева Юлия Александровна

Студент (магистр)

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

E-mail: vasileva891@mail.ru

Бациллярные протеолитические ферменты имеют важное прикладное значение в сфере сельского хозяйства, медицины и пищевой промышленности. Такие преимущества как широкая субстратная специфичность и устойчивость в широких диапазонах pH и температуры позволяют эффективно использовать протеиназы бацилл во многих отраслях промышленности, в частности как компоненты кормов для сельскохозяйственных животных. Актуальными кандидатами для применения в качестве кормовой добавки для животных и птиц являются протеиназы *B. pumilus* 7P. На сегодняшний день, упрощение и снижение стоимости промышленного производства ферментов является актуальной задачей для биотехнологии. Одним из способов решения данной проблемы является использование гетерологичных систем экспрессии белков. Появление технологии направленного редактирования геномов CRISPR/Cas9 позволяет получать штаммы-реципиенты, обладающие способностью к высокой экспрессии гетерологичных генов. Целью данного исследования являлся анализ экспрессии модифицированных генов протеиназ *B. pumilus* 7P в редуцированном штамме *B. subtilis* ПГ-Bs27-28.

В качестве штамма-реципиента использовали штамм *B. subtilis* ПГ-Bs27-28 с редуцированным геномом по методу направленного редактирования системой CRISPR/Cas9 (Altenbuchner, 2016). Из исходного штамма *B. subtilis* 168 были удалены гены профагов, внеклеточных протеиназ (*bpr*, *wprA*, *nprB*, *vpr*, *nprE*, *epr*, *mpr*, *aprX*), вторичных метаболитов (бациллизина, бациллина, субтилозина), гены, продукты которых ответственны за подвижность, спорообразование (*spoIIGA*, *sigE*, *sigG*, *sigF* и др) и образование биопленок. Для повышения эффективности трансформации в геном штамма ПГ-Bs27-28 была интегрирована кассета *comK/comS* под контролем промотора PmtIA. Сверхэкспрессия как *comK*, так и *comS* повышала эффективность трансформации *B. subtilis* плазмидной ДНК в 6-7 раз по сравнению со штаммом дикого типа *B. subtilis* 168. Для получения эффективной экспрессии белка, в клетки *B. subtilis* ПГ-Bs27-28 трансформировали вектора MRE035 и MRE050 с генами глутамил-эндопептидазы (*gseBp*) и субтилизиноподобной протеиназы (*aprBp*) *B. pumilus* 7P соответственно. Состояние компетентности индуцировали путем добавления 0.5% маннита к экспоненциальным растущим клеткам. Колонии трансформантов отбирали на среде с антибиотиком эритромицином (20 мг/мл). С помощью ПЦР анализа подтвердили наличие генов протеиназ *B. pumilus* 7P в редуцированном штамме *B. subtilis* ПГ-Bs27-28. Экспрессию гетерологичных генов индуцировали, добавляя в культуральную среду антибиотик бацитрацин. Появление протеолитической активности внеклеточных рекомбинантных ферментов проверяли на 12 час роста культуры по гидролизу азоказеина. Активность рекомбинантных ферментов глутамил-эндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы была равна 0,425 и 0,589 Ед/мл соответственно. При этом у контрольного штамма *B. subtilis* ПГ-Bs27-28 внеклеточная протеолитическая активность отсутствовала. В дальнейшем планируется установить зависимость уровня активности от

динамики роста модифицированных штаммов и оптимизировать условия культивирования для получения большей экспрессии рекомбинантных белков.

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

1.

Источники и литература

- 1) Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system // *Appl Environ Microb.* 2016. V.82. P.5421–5427.