

Конструирование вектора для целевой инактивации гена металлопротеиназы *Bacillus pumilus* с использованием технологии CRISPR/Cas9

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

Хасанов Д.И.¹, Ласточкина Е.Э.², Гильмутдинова А.И.³, Волкова Е.С.⁴, Васильева Ю.А.⁵

1 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: hasda2149@gmail.com*; 2 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: lelya_lastochkina@bk.ru*; 3 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: aigwinrygilmyizn@gmail.com*; 4 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: katenvol@mail.ru*; 5 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: vasileva891@mail.ru*

Внеклеточная металлопротеиназа *B. pumilus* 3-19, обнаруженная учеными Казанского федерального университета, представляет собой первый бактериальный фермент-гомолог эукариотических металлопротеиназ семейства астацинов и адамализинов среди внеклеточных протеиназ бацилл, не имеющий гомологов среди других протеолитических ферментов прокариот [1,2]. Для изучения роли металлопротеиназы *B. pumilus* в бактериальной клетке необходимо исследовать, как инактивация её гена скажется на физиологических характеристиках штамма. Анализ полученных данных в сравнении с нативным штаммом с активным геном металлопротеиназы позволит установить функции фермента в клетках бацилл.

Целью данного исследования явилось создание плазмидного вектора для целевой инактивации гена металлопротеиназы *B. pumilus* 3-19 (*mprBp*) с помощью технологии CRISPR/Cas9.

В работе был использован вектор рJOE9282.1, содержащий систему CRISPR/Cas9 [3]. Для вставки последовательности направляющей последовательности (sgRNA), направляющей эднуклеазу cas9 к гену-мишени, вектор рJOE9282.1 предварительно расщепляли по сайту рестрикции BsaI. Последовательность sgRNA получили путем отжига двух праймеров и затем лигировали с рестрицированным вектором. Фланкирующие последовательности гена *mprBp* были получены с геномной ДНК *B. pumilus* 3-19 методом ПЦР, после чего встроены по сайту SfiI в вектор рJOE9282.1. Наличие вставок sgRNA и фланкирующих последовательностей гена-мишени подтверждали методом ПЦР-анализа и секвенированием.

В результате проделанной работы был получен вектор рKDm06.23, который в дальнейшем будет трансформирован в клетки *B. pumilus* 3-19 для получения делеционного мутанта с инактивированным геном внеклеточной металлопротеиназы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ и Кабинета Министров Республики Татарстан в рамках научного проекта № 23-24-10059.

Источники и литература

- 1) Rudakova, N.L. Characteristics of a novel secreted zinc-dependent endopeptidase of *Bacillus intermedius* / N.L. Rudakova, N.P. Balaban, Y.V. Danilova, G.N. Rudenskaya, and M.R. Sharipova // *Biochemistry (Moscow)* – 2010. – V.75, – P. 1462-1470. doi:10.1134/s0006297910100123

- 2) Sabirova, A.R., A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius* / A. R. Sabirova, N. L. Rudakova, N.P. Balaban, O.N. Ilyinskaya, I.V. Demidyuk, S.V. Kostrov, G.N.Rudenskaya, M.R. Sharipova // FEBS Letters – 2010. – V.584. – P.4419-4425 doi:10.1016/j.febslet.2010.09.049
- 3) Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System / J. Altenbuchner // Appl. Environ. Microbiol. - 2016. –V. 82(17). –P. 5421-5427. doi: 10.1128/AEM.01453-16