

УДК:577.2:579.61+579.62+579.64

Разработка, создание и исследование бактерий генетически модифицированных штаммов *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Azotobacter chroococcum* с гиперэкспрессией генов протеиназы и целлюлазы

Ветюгов А.Д.¹ Кирпичев П.А.¹

Научный руководитель: Тарасов Сергей Сергеевич^{1,2}

¹ ГБУДО «ЦМИНК КВАНТОРИУМ»; ² ФГБОУ ВО «НГАТУ»

Направление: Науки о жизни

Введение: Разработка и создание генетически модифицированных (ГМ) штаммов бактерий является одной из важнейших задач современной молекулярной биологии и биоинженерии. Это позволяет относительно быстро получать микроорганизмы с заданными свойствами, которые можно использовать как в фундаментальной науке – для изучения генов и кодирующих их белков, так и в прикладной - получая важные для биотехнологии продукты. Бактерии родов *Escherichia* и *Bacillus* являются важнейшими микроорганизмами как в природе, так и для микробиома человека. Геномы, транскриптомы и основные реакции клеточного метаболизма этих бактерий хорошо изучены (Chen et al., 2007; Veith et al., 2004). Многие штаммы активно выделяют в среду культивирования ряд экзоферментов и метаболитов. Благодаря этой характеристике данные бактерии активно используются в промышленной биотехнологии для производства ферментов, рекомбинантных белков и целого ряда других химических веществ, которые широко используются в промышленности, сельском хозяйстве и медицине (Schallmeyer et al., 2004). Бактерии родов *Bacillus* и *Azotobacter* играют важнейшую роль в образовании ризосферы растений. *A.chroococcum* поглощает большое количество азота и превращает его в более доступную для растений форму – аммиак. Кроме того, *A.chroococcum* вырабатывает гидролитические ферменты которые разрушают структурные компоненты клеточных стенок большинства грибов и играют важную роль в деградации мицелия, тем самым защищая растения от фитопатогенов

Использование микроорганизмов в качестве пробиотиков и биоудобрений сталкивается с проблемой их закрепления в микробиоме. Известно, что симбиомикроценозы животных, человека и ризосферы растений в большинстве случаев не принимают заносные штаммы микроорганизмов, что приводит к быстрому затуханию эффекта после окончания искусственного внесения штаммов. В данной работе мы попытались разработать штаммы микроорганизмов, которые не только бы улучшили процессы пищеварения животных, человека и работу ризосферы растений, но и были способны закрепиться в микробиоме. Разрабатываемые нами микроорганизмы получали дополнительные гены протеиназы и целлюлазы, что возможно способствовало бы улучшению процесса освоения бактериальных питательных субстратов. Таким образом данные бактерии являются потенциально полезными для естественного микробиома. А следовательно они, возможно, займут свою экологическую нишу, что приведет к постоянному эффекту пробиотика без дополнительного внесения микроорганизма в среду.

Основная часть: Для разработки генетических конструкций использовали генетическую базу данных на платформе NCBI. В качестве генов интереса использовали один из генов протеиназы кролика NC_067374.1, который способен расщеплять белки до пептидов и ген целлюлазы вешенки NW_023503158.1, являющийся гликозидазой и расщепляющий целлюлозу на начальных этапах. В качестве вектора доставки использовалась плазида рAL2-Т. Для каждого гена подбирали пару праймеров, которые в дальнейшем использовали для его выделения *in vitro*. К праймерам добавляли последовательности сайтов рестрикции для создания у будущей генетической вставки липких концов. Рестриктазы подбирались таким образом, чтобы они вносили разрыв на плазмиде в области вставки будущего гена, но при этом не имели сайтов рестрикции в генах интереса и в других местах плазмиды. Были созданы генетические конструкции плазмидных векторов, в которые были встроены гены интереса. Данные векторы использовались в качестве биоинженерного проекта для осуществления генетической модификации плазмиды *in vitro*.

иРНК протеиназы извлекали из шоково-замороженных тканей поджелудочной железы кролика, а иРНК целлюлазы выделялась из вторичного мицелия вешенки, культивировавшейся на богатом целлюлозой субстрате. После выделения тотальной РНК проводили обратную транскрипцию. С помощью полученной кДНК на предыдущем этапе и вышеописанных пар праймеров проводили ПЦР для клонирования гена. Очищенные ампликоны и плазмиду обрабатывали рестриктазами *ApaI*, *EcoRI*, *MluI*. Полученные фрагменты лигировали путём добавления Т4-ДНК-лигазы. Собранные векторы использовали для трансформации бактерий. Для создания ГМ-бактерий использовались штаммы *E.coli*, *B.subtilis* и *A.chroococcum*. Данным бактериям придавали компетентность и осуществляли трансформацию созданными векторами (Takahashi et al., 1983; Bernard et al., 1985). Затем трансформируемую культуру клеток высевали на твердую питательную среду с ампициллином.

В результате эксперимента были созданы штаммы *E.coli*, экспрессирующие гены интереса в суспензиях, содержащих белок и целлюлозу, что свидетельствует о работе собранной генетической конструкции в клетках бактерий. Установлена способность ГМ микроорганизмов, содержащих ген протеиназы, повышенно расщеплять белковый субстрат по сравнению с контролем, т.е. не модифицированными штаммами. При внесении в среду целлюлозосодержащего субстрата его масса уменьшалась, а следовательно ГМ штамм был способен расщеплять целлюлозу. Оценка ферментативной активности у ГМ штаммов свидетельствует о том, что в данных клетках вставленные векторы давали работоспособный белковый продукт, который поступал в суспензионную среду и не требовал каких либо сложных систем посттрансляционной модификации.

Выводы:

- Разработаны генетические конструкции, несущие гены интереса на основе вектора *plac2-T* с использованием рестриктаз *ApaI*, *EcoRI*, *MluI* методами *in silico*;
- Созданы генетические конструкции, несущие гены интереса;
- Успешно трансформирована культура *E.coli* полученными плазмидами;
- Изучена экспрессия генов интереса и активность исследуемых ферментов у *E.coli*, *B.subtilis* и *A.chroococcum*. У культуры *E.coli* зафиксирована экспрессия генов интереса и повышенная активность исследуемых ферментов

Список литературы

1. Закатаева Н.П. Применение стратегий метаболической инженерии для генетического конструирования штаммов-продуцентов пуриновых производных на основе *Bacillus*: дис. ...док. биол. наук: 1.5.7. - АО "АГРИ", Москва, 2022 - 196 с.
2. Bernard R. Glick. Transformation of *Azotobacter vinelandii* with plasmid DNA. *Journal of Bacteriology*. 1985
3. Chen X.H., Koumoutsis A., Scholz R., Eisenreich A., Schneider K., Heinemeyer I. et al. (2007) Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol*. 25(9):1007-14.
4. Veith B., Herzberg C., Steckel S., Feesche J., Maurer K.H., Ehrenreich P. et al. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 7(4):204-11. Schallmeyer M., Singh A., Ward O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol*. 50:1-17.
5. Sumbul A, Ansari RA, Rizvi R, Mahmood I. *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi J Biol Sci*. 2020 Dec;27(12):3634-3640.
6. Takahashi W, Yamagata H, Yamaguchi K, Tsukagoshi N, Uda S. Genetic transformation of *Bacillus brevis* 47, a protein-secreting bacterium, by plasmid DNA. *J Bacteriol*. 1983 Dec;156(3):1130-4. doi:10.1128/jb.156.3.1130-1134.1983.