

ПРОТЕАЗОДЕФИЦИТНЫЕ ШТАММЫ *BACILLUS SUBTILIS* КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Баженова Ю. О.¹

Научный руководитель – канд. биол. наук, м. н. с. Селиханов Г. К.¹

¹Альметьевский государственный технологический университет «Высшая школа нефти»

Введение

Bacillus subtilis принадлежит к числу наиболее востребованных промышленных микроорганизмов. Разрешенный к применению в пищевой промышленности в качестве безопасного продуцента (ТР ТС 029/2012) [1], он сочетает эффективный секреторный аппарат с детально изученной генетикой: референсный штамм *B. subtilis* 168 полностью секвенирован и служит стандартной моделью для генетических манипуляций, что определяет его как базовую платформу для получения рекомбинантных белков.

Однако широкое применение данного продуцента ограничено наличием восьми генов экстрацеллюлярных протеаз, приводящих к деградации целевых продуктов [2]. Данная проблема приобретает критическое значение в контексте стремительного роста мирового рынка промышленных ферментов (CARG 21%), где доминирующие позиции занимают компании, использующие собственные коллекции протеазодефицитных штаммов *B. subtilis* с различными профилями протеазной активности.

Отсутствие легитимных и хорошо охарактеризованных отечественных аналогов создает импортозависимость и сдерживает развитие российской биоэкономики. В связи с этим цель работы заключается в создании технологической платформы для конструирования протеазодефицитных штаммов *B. subtilis* с использованием современных методов геной инженерии.

Основная часть

Ключевая методологическая проблема при создании протеазодефицитных штаммов *B. subtilis* заключается в необходимости разграничения двух задач: отработки генетического инструментария и собственно инактивации целевых генов протеаз. В представленной работе это решается двухстадийной стратегией. На первом этапе все элементы конструкции верифицируются в нейтральном локусе *amyE* хромосомы *B. subtilis* 168, что позволяет оценить эффективность промотора и сайта связывания с рибосомой (RBS) в условиях, максимально приближенных к нативным, но без вмешательства в протеазный аппарат клетки. Такой подход обеспечивает чистоту последующего анализа при переносе отработанной системы на гены экстрацеллюлярных протеаз.

Для сборки делеционной конструкции использован метод полимеразной цепной реакции с перекрывающимися участками (overlap extension PCR, OE-PCR) [3], позволяющий получать линейные конструкции без применения ферментов эндонуклеаз рестрикции и лигаз. Конструкция для интеграции в локус *amyE* включает левое и правое плечи гомологии, селективный маркер устойчивости к хлорамфениколу (*cat*) и репортерный ген *gfp* в варианте S65T. Выбор GFP в качестве репортера обусловлен его способностью к автономному формированию флуорофора за счет внутримолекулярной циклизации и окисления трипептида Ser65-Tyr66-Gly67, что позволяет визуально детектировать успешную интеграцию непосредственно на чашках без дополнительных биохимических манипуляций [4].

Корректность сборки делеционной конструкции методом OE-PCR подтвердилась электрофоретической верификацией. Трансформация *B. subtilis* 168 методом

электропорации с последующей селекцией на хлорамфениколе привела к получению рекомбинантных трансформантов, что подтвердилось ПЦР-скринингом колоний, однако при фенотипической валидации флуоресцентный сигнал GFP зарегистрирован не был. Было выдвинута гипотеза, что отсутствие фенотипического проявления гена *gfp* в *B. subtilis* связано с неэффективной инициацией трансляции из-за слабого сайта связывания рибосомы (RBS).

На основании этого разработана стратегия оптимизации: при сохранении сильного конститутивного промотора *Pveg* проведена замена RBS на последовательность, характерную для эффективно экспрессирующихся генов *B. subtilis*. В качестве референсной выбрана область, предшествующая старт-кодону гена *spoVG*, для которого ранее показана высокая эффективность трансляции [5–6].

В настоящее время завершается конструирование модифицированной конструкции с оптимизированным RBS для повторной интеграции в локус *amyE*. Верификация флуоресцентного сигнала на этой модели станет доказательством работоспособности разработанного экспрессионного модуля и позволит перейти к следующему этапу – направленной инактивации генов экстрацеллюлярных протеаз (*aprE*, *nprE* и др.). Принципиально важно, что предлагаемая архитектура конструкции не ограничивается функцией репортера: интеграция *gfp* в протеазные локусы создает универсальные платформы для последующей безантибиотиковой замены репортера на гены целевых промышленных ферментов. Отбор таких клонов по утрате флуоресценции соответствует современным требованиям биобезопасности и открывает путь к созданию штаммов, пригодных для промышленного лицензирования.

Выводы

Разработана двухстадийная стратегия конструирования протеадефицитных штаммов *B. subtilis*, предусматривающая первичную верификацию генетических элементов в локусе *amyE* с последующим переносом отработанной системы на гены экстрацеллюлярных протеаз. Методом OE-PCR собрана делеционная конструкция с маркером *cat* и репортером *gfp* для интеграции в *amyE*.

Отсутствие флуоресценции у *B. subtilis* 168 указало на проблему инициации трансляции. Для оптимизации экспрессии *gfp* под промотором *Pveg* проведена замена RBS на последовательность гена *spoVG*, что обеспечивает комплементарность к 3'-концу 16S рРНК, необходимую для узнавания рибосомой.

Практическая значимость работы заключается в создании универсальной платформы для получения штаммов-продуцентов: интеграция *gfp* в протеазные локусы позволяет в дальнейшем осуществлять безантибиотиковую замену репортера на гены целевых ферментов (целлюлазы, ксиланазы, пищевые гидролазы, фармацевтические белки) с отбором рекомбинантов по признаку утраты GFP-опосредованной флуоресценции, что соответствует требованиям биобезопасности. Разработанная технологическая платформа закладывает основу для формирования отечественной коллекции протеадефицитных штаммов *B. subtilis*.

Литература

1. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012. Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств: принят решением Совета ЕЭК от 20.07.2012 № 58 (с изменениями на 29.08.2023) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/902359401> (дата обращения: 22.01.2026).
2. Rosazza T., Eigentler L., Earl C., Davidson F.A., Stanley-Wall N.R. Bacillus subtilis extracellular protease production incurs a context-dependent cost // Molecular Microbiology. 2023. Vol. 120, № 2. P. 105–121.

3. Luo W.-G., Liu H.-Z., Lin W.-H., Kabir M.H., Su Y. Simultaneous splicing of multiple DNA fragments in one PCR reaction // *Biological Procedures Online*. 2013. Vol. 15, № 1. P. 9.
4. Tsien R.Y. The green fluorescent protein // *Annual Review of Biochemistry*. 1998. Vol. 67. P. 509–544.
5. RBS-spoVG (BBa_K143021) // iGEM Parts Registry [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://parts.igem.org/Part:BBa_K143021 (дата обращения: 15.02.2026).
6. Volkenborn K., Kuschmierz L., Benz N., Lenz P., Knapp A., Jaeger K.-E. The length of ribosomal binding site spacer sequence controls the production yield for intracellular and secreted proteins by *Bacillus subtilis* // *Microbial Cell Factories*. 2020. Vol. 19, № 1. P. 154.