

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-252

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННОГО ШТАММА *E. COLI*, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕН САХАРАЗЫ SACB, ПРИ ПОМОЩИ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ**GETTING A GENETICALLY MODIFIED STRAIN OF *E. COLI* EXPRESSING THE SACB SACCHARASE GENE WITH THE USE OF MOBILE GENETIC ELEMENTS**В. В. Куликов¹, Д. Н. Щербаков^{1,2}, Е. А. Колосова^{1,2}¹ Алтайский государственный университет, Барнаул² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. КольцовоV. V. Kulikov¹, D. N. Shcherbakov^{1,2}, E. A. Kolosova^{1,2}¹ Altai State University, Barnaul² State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ coolervvk@gmail.com

Аннотация

Ряд ДНК-вакцин разрабатывается на основе плазмид. Устойчивость к антибиотикам применяется для селекции и удержания плазмидной ДНК в микроорганизмах. Однако требования к производству вакцин исключают антибиотики и устойчивые микроорганизмы. Альтернативным маркером может стать фермент сахаразы. Методами генной инженерии с применением CRISPR/Cas был получен генно-модифицированный штамм *E. coli* с экспрессией гена SacB, способный обеспечить селекцию без антибиотиков.

Abstract

A number of DNA vaccines derives from plasmids. Antibiotic resistance is used for selection and containment of plasmid DNA in microorganisms. However production requirements of vaccine exclude of antibiotics and resistant microorganisms. As an alternative marker the enzyme sucrose can be used. A genetically modified strain of *E. coli* with *sacB* gene expression, which is capable of providing antibiotic-free breeding was obtained by genetic engineering using CRISPR/Cas.

ДНК-вакцины и терапевтические средства зачастую разрабатываются на основе плазмид и применяются на людях, животных, птицах и рыбах. Такие маркеры устойчивости к антибиотикам позволяют селективно удерживать плазмидную ДНК во время бактериальной ферментации и являются наиболее часто используемым селективируемым маркером.

В целях обеспечения безопасности регулирующие органы рекомендуют исключить маркеры устойчивости к антибиотикам из терапевтических и вакцинных плазмидных ДНК-векторов. Присутствие гена устойчивости к антибиотикам в составе плазмиды регулирующие органы считают нежелательным по причине: 1) потенциальной передачи устойчивости к антибиотикам эндогенной микробной фауне; 2) потенциальной активации и транскрипции генов с промоторов млекопитающих после клеточного включения в геном.

Кроме того, использование антибиотиков в ферментационной культуре требует дорогостоящей проверки процесса удаления антибиотиков во время очистки плазмиды, чтобы предотвратить загрязнение конечного продукта остаточными антибиотиками.

Альтернативным маркером для проведения селекции может служить использование генов, кодирующих фермент левансахаразы. Ген *Bacillus subtilis sacB* кодирует секретлируемый фермент левансахаразы. У таких грамотрицательных бактерий, как *E. coli*, экспрессия гена *sacB* в присутствии сахарозы приводит к летальному исходу.

В настоящем исследовании подробно описаны протоколы, клонирования и тестирования векторов для доставки компонентов системы CRISPR/Cas, а также интегрируемого посредством транспозона гена SacB в клетки.

Интеграция гена SacB в геном была осуществлена посредством системы INTEGRATE с использованием эффекторного комплекса Cas678 из системы CRISPR-Cas типа IF из *Vibrio cholerae HE-45*, а также транспозазы TnsABC-TniQ, которая отвечает за гидролиз ДНК и транспозицию участка мобильного элемента, располагающегося между последовательностями узнавания (плечи транспозонов) в донорной плазмиде. Сайт транспозиции определяется последовательностью направляющей РНК, связанной с комплексом Cas678.

Система позволяет интегрировать длинные последовательности (до 10Kb) в геном грамотрицательных организмов, таких как *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* и *Pseudomonas putida* [1]. Вставка в геном была под-

тверждена секвенированием. Полученный ГММ штамм оценивался на чувствительность к сахарозе, в среде LB-Medium без NaCl с добавлением сахарозы 6 % от общего объема среды рост культуры отсутствовал.

При параллельной трансформации ГММ *E.coli* плазмидой pVEA, содержащей участок, кодирующий интерферирующую РНК, блокирующую РНК с гена SacB, на среде с сахарозой наблюдается множество колоний, что позволяет убедиться в корректной работе гена SacB в полученном ГММ штамме 10-beta/SacB, а также эффективно блокировании гена сахаразы плазмидой pVEA, что позволяет осуществлять отбор клеток, получивших плазмиду.

Таким образом, был получен генно-модифицированный штамм *E. coli* 10-beta/SacB, экспрессирующий ген сахаразы SacB. Проведена оценка чувствительности полученного штамма к сахарозе. Полное подавление роста культуры происходит при достижении концентрации сахарозы в среде 6 %. Показано, что при трансформации плазмидой, блокирующей ген сахаразы, генно-модифицированный штамм *E. coli* 10-beta/SacB растет в среде, содержащей сахарозу.

Литература

1. Pechenov P. Y. et al. New effective method of *Lactococcus* genome editing using guide RNA-directed transposition // Intern. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, No. 22. P. 13978.