

УДК 601.4

РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ НОКАУТА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ГЛИКОЗИЛ-ГИДРОЛАЗ В ШТАММАХ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

В.Ю. Кислицин, А.М. Чулкин, А.М. Рожкова

ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

Мицелиальные грибы родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* широко применяются в биотехнологии в качестве продуцентов ферментов, органических кислот, антибиотиков и других полезных веществ. В частности, *P. verruculosum* имеет высокоактивный комплекс целлюлаз и используется как продуцент ферментных препаратов [1]. Промышленный штамм *P. verruculosum* 221–151 способен секретировать до 60 г/л внеклеточных ферментов, доля целлюлаз в которых составляет 75–80 % [2]. В тоже время, для понижения стоимости получаемых ферментных препаратов актуальной задачей остаётся повышение продуктивности штаммов *P. verruculosum*.

На примере гриба *P. decumbens* было показано, что одним из перспективных способов повышения продуктивности целлюлазных штаммов мицелиальных грибов является делеция внутриклеточной β -глюкозидазы. Данный эффект связан с тем, что целлобиоза, субстрат β -глюкозидазы, является индуктором транскрипции целлюлазных генов. Соответственно делеция её гена приводит к накоплению в клетке целлобиозы и усилению транскрипции генов целлюлаз [3]. Подобный же эффект наблюдался и у штамма гриба *T. reesei* с делециями внутриклеточных β -глюкозидаз при культивировании на среде с добавлением целлобиозы [4].

Для нокаута гена внутриклеточной β -глюкозидазы *P. verruculosum* было решено использовать метод редактирования генома системой CRISPR/Cas9, который ранее нами был использован для создания штамма *P. verruculosum* с нокаутом гена целлобиогидролазы 1. Разработанная нами методика состоит в трансформации протопластов штамма *P. verruculosum* 221–151 двумя плазмидами. Первая плазмида p5SniaD, содержит последовательность, кодирующую направляющей-РНК (sgРНК) для нокаута маркерного гена нитратредуктазы (*niaD*), а вторая – ген *cas9* и кодирующую последовательность sgРНК для нокаута целевого гена [5]. Нокаут гена *niaD* удобен для отбора трансформантов на среде с хлоратом натрия, на которой штаммы дикого типа не могут расти, а использование двух плазмид гарантирует попадание в клетки трансформантов с нокаутом маркерного гена также направляющей-РНК для целевого гена.

Вначале, в геноме *P. verruculosum* нами был найден ген *bgl1*, кодирующий внутриклеточную β -глюкозидазу. Далее в данном гене с помощью онлайн программы ChopChop [<https://chopchop.cbu.uib.no/>] был произведён поиск протоспейсеров подходящих для направляющей-РНК системы CRISPR/Cas9. Из предложенных программой вариантов был выбран протоспейсер с последовательностью 5' – CGATATCCTCATGTGTACGG-3', начинающийся с 269 нуклеотида от начала гена и предсказанной эффективностью 72 %. На основе этой последовательности были подобраны ПЦР-праймеры для получения плазмиды p5Sbg11 путём ПЦР-мутации из ранее полученной плазмиды p5SniaD. Далее из плазмиды p5Sbg11 фрагмент, кодирующий sgРНК с промотором, был переклонирован в ранее полученную плазмиду pGPCas9 по рестрикционным сайтам *Bam*H1-*Sal*I. Таким образом была получена плазмида pGCB1 (рис. 1).

После трансформации протопластов штамма *P. verruculosum* 221–151 плазмидами p5SniaD и pGCB1 на чашках Петри с селективной средой было получено более 30 трансформантов. У 4 трансформантов были амплифицированы фрагменты гена *bgl1* и отданы на секвенирование. В результате у одного клона была найдена мутация в районе протоспейсера (рис. 2). Таким образом частота получения нокаутов данной методикой составила 25 %, хотя увеличение выборки может скорректировать данное значение. Эффективность нокаутирования генов системой CRISPR/Cas9 сильно зависит от вида организма и расположения протоспейсера. Полученная в данной работе частота нокаутирования сопоставима с ранее полученным результатом для гена *cbh1*, а также с результатами применения данного метода на других видах мицелиальных грибов [5–7].

Далее новый штамм *P. verruculosum* с нокаутом гена внутриклеточной β -глюкозидазы культивировался в колбах на стандартной ферментационной среде с микрокристаллической целлюлозой в качестве индуктора. При этом он показал более низкую продуктивность и активность ферментативного комплекса по сравнению с исходным штаммом.

Вероятно, это объясняется недостатком образования глюкозы из целлобиозы для его активного роста. Такой же эффект наблюдался и у гриба *T. reesei*, однако после оптимизации состава питательной среды мутантный штамм *T. reesei* превзошёл исходный по продуктивности [4]. В дальнейшем мы планируем провести оптимизацию состава питательной среды и условий культивирования нового штамма *P. verruculosum* Δ**bg11**.

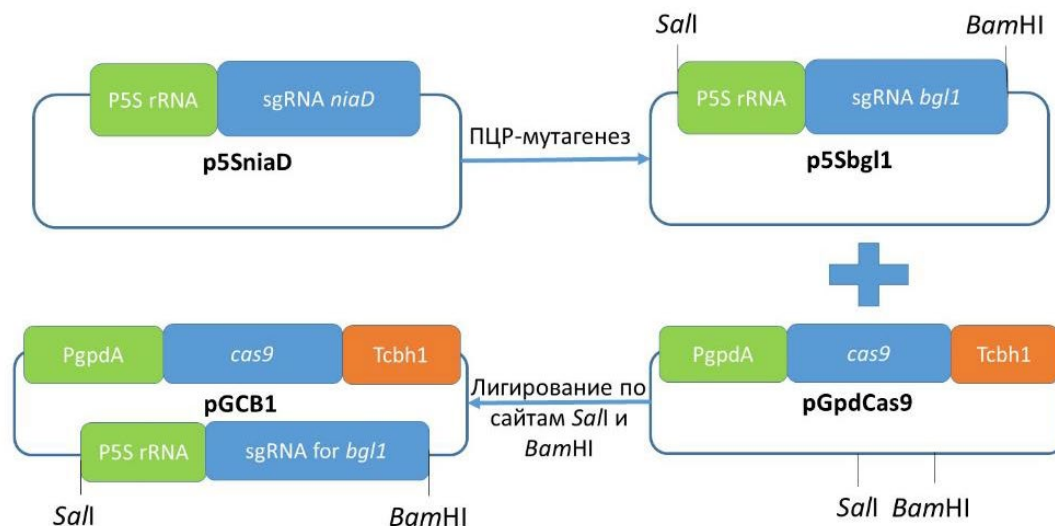


Рис. 1 – схема получения плазмиды pGCB1 для нокаута гена *bgl1*.

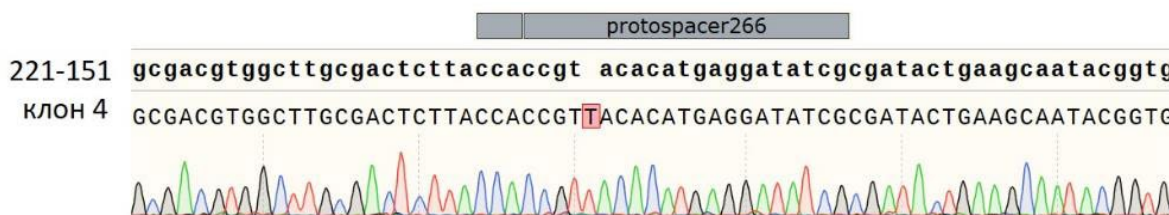


Рис. 2 – фрагмент хроматограммы с мутацией после секвенирования ПЦР-фрагментов гена *bgl1* у клонов, отобранных на селективной среде.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (Соглашение № 075–15–2021–1071 от 28.09.2021).

Литература

1. Короткова О.Г. и др. Получение комплексных биокатализаторов на основе ферментных препаратов из рекомбинантного гриба *Penicillium verruculosum* и их применение в гидролизе отходов деревообрабатывающей и сельскохозяйственной промышленности // Катализ в промышленности. 2011. № 5. С. 61–68.
2. Сеницын А.П. и др. Возможности экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* для получения продуцентов ферментов, обеспечивающих эффективную деструкцию возобновляемой растительной биомассы (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Том 56. № 6. С. 551–560.
3. Chen M., Qin Y., Cao Q., et al. Promotion of extracellular lignocellulolytic enzymes production by restraining the intracellular b-glucosidase in *Penicillium decumbens* // Bioresource Technology. 2013. No 137. P. 33–40.
4. Zhou, Q., Xu, J., Kou, Y., et al. Differential involvement of b-glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose. Eukaryot. Cell. 2012. Vol. 11. No 11. P. 1371–1381.
5. Kislitsin V. Yu. et al. The effect of cellobiohydrolase 1 gene knockout for composition and hydrolytic activity of the enzyme complex secreted by filamentous fungus *Penicillium verruculosum* // Biores. Technol. Rep. 2022. Vol. 18. P. 101023.
6. Fuller K.K., Chen S., Loros J.J., Dunlap J.C. Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus* // Eukaryotic Cell. 2015. Vol. 14. No 11. P. 1073–1080.
7. Salazar-Cerezo S. et al. Garrigues S. CRISPR/Cas9 technology enables the development of the filamentous ascomycete fungus *Penicillium subrubescens* as a new industrial enzyme producer // Enzyme and Microbial Technology. 2020. Vol. 133. P. 109463.