

ДВУХСТАДИЙНАЯ ОЧИСТКА БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА LbCAS12A

В.И. Шалгуев¹, Т. Нгуен², И.А. Сизова¹, Н.Г. Соболева¹, П. Хегеманн², В.Н. Вербенко¹

¹ *Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

² *Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany*

Одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* (хламидомонада) – популярный модельный организм, который широко используется в фундаментальных и прикладных исследованиях, а в последнее время и в биотехнологии.

Система CRISPR/Cas9 открывает перспективы для редактирования генома водоросли и создания штаммов с необходимыми свойствами путем внесения желаемых мутаций в predetermined положения генома. Ожидается, что в системе CRISPR/CAS *in vivo* использование белка LbCas12a из *Lasnospiraceae bacterium* будет более эффективно, чем белка Cas9 из *Streptococcus pyogenes*. Для тестирования такой системы *in vitro* необходимо получить значительное количество высокоочищенного белка Cas12a. Для этого в бактериальном штамме Rosetta2 с введенной плазмидой pET-28b-T7-bLbCas12a-NLS-6xHis был экспрессирован белок LbCas12a. При этом были подобраны оптимальные условия индукции: конечная концентрация индуктора IPTG в ростовой среде LB составляла 100 μ M, температура инкубации 30°C, время инкубации 4.5 часа. После экспрессии белка LbCas12a в подобранных условиях была оптимизирована процедура выделения белка LbCas12a. Для вскрытия клеток с экспрессированным белком на них воздействовали ультразвуком и далее удаляли клеточные обломки центрифугированием, затем клеточный лизат наносили на колонку с Ni-NTA агарозой, после ряда промывок белок LbCas12a элюировали в буфере, содержащем 100 mM имидазола. Для дополнительного удаления нежелательных ДНКазных, РНКазных и других примесей после Ni-NTA-хроматографии белок очищали гель-фильтрацией на носителе Sepharose 4B. Аналитический электрофорез в ПААГ показал более высокую чистоту белкового препарата LbCas12a, полученного двухэтапной очисткой, по сравнению с очисткой только на Ni-NTA-агарозе. Данные исследования позволяют добиться дальнейшего усовершенствования технологии CRISPR.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы развития «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» (соглашение № 075–15–2019–1663).

УДК 557.3

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *BACILLUS SUBTILIS***Е.С. Яценко, Б.П. Шипунов***Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия*

Bacillus subtilis – аэробные, спорообразующие микроорганизмы, которые выделяют большое количество биологически активных веществ. В природе они участвуют в процессе аммонификации, минерализуют органические соединения азота, обеспечивают пополнение запасов минерального азота в почве, обладают выраженной протеолитической и амилолитической, и липолитической активностью. На сегодняшний день активно используются в сельском хозяйстве большое количество пробиотических препаратов и средств защиты растений на основе микроорганизмов рода *Bacillus*. Влияние таких физических факторов как ультразвук, широкополосный видимый свет, лазерное излучение, ультрафиолет, электромагнитные поля на жизнедеятельность микроорганизмов встречаются в литературе [1–3]. Как правило, воздействие этих факторов, направлены на подавление активности микроорганизмов. Поскольку, *Bacillus subtilis*, является культурой, составляющей основу многих микробиологических препаратов, представляет интерес изучение стимуляции роста численности микроорганизмов в процессе культивирования.

Цель работы – оценить влияния лазерного излучения в процессе культивирования *Bacillus subtilis*. Для исследования были использованы бактерии *Bacillus subtilis* В-12079. 5 гр. спор равномерно распределяли по чашке Петри и воздействовали лазером (длина волны 638 нм, плотность потока мощности 10 мВ/см², диаметр сечения пучка равен диаметру чашки), время экспозиции 1, 3, 7, 15, 25 мин. После воздействия, из спор готовили суспензию: в колбу с питательной средой, состоящую из компонентов: пептон ферментативный, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, вода дистиллированная, вносили споры, титр 10⁻⁷. Культивировали в шейкер-инкубаторе «Innova 44» при 250 об/мин и температуре 37°. Для выявления численности микроорганизмов использовали стандартный метод десятикратных разведений, с высевом в чашки Петри на агаризованную среду, выше указанного состава. После чего чашки с посевами инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов. В качестве контрольной пробы рассматривались споры, без воздействия лазерного излучения. Все опыты были проведены в семикратной повторности. В ходе эксперимента было установлено: при воздействии лазера 1 минуту – отличий от контроля не выявлено; при 3 минутах – наблюдается незначительное увеличение численности, достоверное увеличение численности наблюдалось при воздействии лазера в течении 7 минут, при 15 и 25 минутах – подавляющий эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. Особенности воздействия низкоинтенсивных электромагнитных излучений различных диапазонов на микроорганизмы / В.А. Мониц, С.Л. Малиновская, Т.В. Махрова, Д.С. Малиновский // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – № 2, С. 435–438.
2. Индуцированное ИК лазерным излучением фототоксическое воздействие конъюгатов плазмонно-резонансных наночастиц с красителем индоцианиновым зеленым на бактерии *Staphylococcus aureus* // Е.С. Тучина, В.В. Тучин, Б.Н. Хлебцов, Н.Г. Хлебцов // Квантовая электроника. – 2011. – № 4, С. 354–359.
3. Влияние лазерного облучения на поведения бактерий/ Т.А. Матюшова // Сборник материалов 69-я научно-практическая конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы современной медицины и фармации-2015», С. 823–826.