

Таблица 3 – Влияние источников неорганического азота на биосинтез пуллулаказы *Bacillus licheniformis*

№	Источник азота (0,15% по азоту)	Биомасса, г/100 см ³	Активность, ед/100 см ³
1	KNO_3	0,15	119
2	NH_4NO_3	0,21	81
3	$(NH_4)_2SO_4$	0,32	89
4	$(NH_4)_2HPO_4$	0,89	272
5	NH_4Cl	0,53	145

Изучено и экспериментально показано, что оптимальная температура для роста *Bacillus licheniformis* и биосинтеза им пуллулаказы – 50 °С, рН питательной среды 7,0, длительность выращивания 48-54 ч.

Выводы: максимальное накопление пуллулаказы *Bacillus licheniformis* происходит при культивировании продуцента на оптимизированной питательной среде, при температуре 50 °С, рН 7,0 на (51,0 ± 3,0) ч роста и в 3,7 раза превышает продуктивность исходного уровня синтеза фермента.

УДК 632.959

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-3-19-20>

ОСОБЕННОСТИ ДИЗАЙНА ПЛАЗМИД ДЛЯ ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ ГРИБОВ

И.Г. Синельников, Ю.М. Веригина, К.А. Демидова

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

Развитие методов точного редактирования генома на основе системы CRISPR/Cas9 открыло новые возможности для исследования и инженерии микроорганизмов, включая промышленно значимые штаммы грибов, такие как *Trichoderma reesei* и *Aspergillus niger*. Система CRISPR/Cas9 функционирует как РНК-направляемая эндонуклеаза: направляющая РНК (gRNA) связывается с целевым участком генома за счёт комплементарности, после чего белок Cas9 вносит двухцепочечный разрыв ДНК в заданной позиции. В клетке этот разрыв далее репарируется собственными механизмами - либо путём негомологичного соединения концов (NHEJ), что способно привести к сдвигу рамки считывания и нокауту целевого гена, либо посредством гомологичной рекомбинации (HDR) с использованием шаблона для репарации. Эффективность технологии в значительной степени определяется уровнем экспрессии направляющих РНК (гРНК), которые должны транскрибироваться в клетке в достаточном количестве для формирования активного комплекса с нуклеазой Cas9. При этом подбор подходящего промотора для транскрипции гРНК остаётся ключевой задачей, поскольку от уровня транскрипции gRNA напрямую зависит эффективность работы системы.

В настоящей работе проведено тестирование различных вариантов экспрессии gRNA и оценка их эффективности для редактирования геномов *T. reesei* и *A. niger*. Для работы была создана универсальная плазмидная конструкция pFcas (Рисунок 1) на базе автономно реплицирующего региона (*AMA1*), гена устойчивости к гигромицину под контролем *ptef1* промотора *A.nidulans*, ген *cas9* под контролем сильного конститутивного промотора глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*pGAPDH*) *A.nidulans*, кассеты для экспрессии gRNA, *ori* и ген устойчивости к ампициллину *AmpR* для поддержания плазмиды в *E.coli*. Дизайн плазмиды позволяет обеспечить одинаковый уровень экспрессии белка *cas9* и селекции трансформантов на гигромицине, а наличие *AMA1* препятствует интеграции плазмиды в хромосому трансформанта [1].

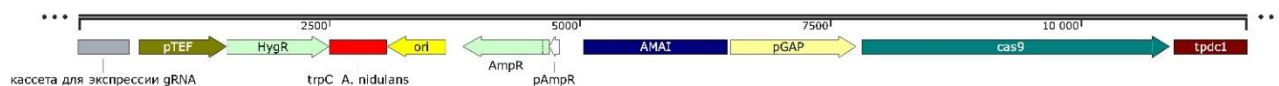


Рисунок 1 – структура базовой плазмиды pFcas

В рамках работы было исследовано три варианта экспрессии гайдовой РНК:

1) Экспрессия под промотором U6. Промотор (промотор РНК полимеразы II) – классическое решение, применяемое для экспрессии гРНК при инженерии эукариотических клеток.

2) Промотор 5S рРНК. Промотор впервые описан в 2019 году и успешно примененный для экспрессии в *A.niger* [2]

3) Так же были исследованы 3 промотора тРНК (*met, leu, arg*). За счет коротких промоторных областей, эти промоторы позволяют создавать компактные кассеты для экспрессии гайдовой РНК.

Последовательности каждого промотора были предсказаны путем анализа геномов штаммов и клонированы непосредственно из геномной ДНК штаммов *T.reesei* RUT30C и *A.niger* F745 (коллекция ВКПМ). Последовательности промоторов были объединены последовательностью гайд-РНК методом ПЦР с перекрытием и интегрированы в плазмиду рFcas при помощи метода «Golden gate».

Гайд РНК была направлена на ген кодирующий поликетидсинтазу 4 (*pkS4* для *T.reesei* и *albA* для *A.niger*). Данный ген был выбран, так как позволяет визуально детектировать фенотипические изменения трансформантов (при делеции данного гена трансформанты теряют пигментацию спор).

Полученные плазмиды были трансформированы в клетки *A.niger* и *T.reesei*, методом ПЭГ-индуцированной трансформации протопластов. Полученные трансформанты отбирались на среде с гигромицином (150 мкг/мл).

Несмотря на то, что промотор U6 традиционно применяется для экспрессии малых ядерных РНК и широко используется в системах CRISPR для эукариот, в случае грибов его эффективность оказалась низкой: доля положительных редактированных клонов составила 12% для *A.niger* и 28% для *Trichoderma*. Существенно более высокий результат был достигнут при использовании промотора 5S рРНК - уровень успешного редактирования составил около 50% для обоих микроорганизмов. Наилучшие показатели были получены при применении промоторов тРНК: эффективность редактирования варьировалась от 78 до 96% (96% для тРНК_{arg} *A.niger*), что делает данный вариант наиболее перспективным для разработки универсальных инструментов редактирования грибов.

Анализ методом ПЦР в реальном времени указывает на то, что классические промоторы малых ядерных РНК (U6), не обеспечивают должного уровня транскрипции гайд-РНК в грибных системах. Вероятной причиной этого может быть различие в архитектуре промоторных областей и механизмах транскрипции малых РНК у грибов и животных. Промоторы 5S рРНК оказались значительно более подходящими, их уровень транскрипции был примерно в 5 раз выше, чем при использовании U6 промоторов. Промоторы тРНК показали максимальную активность (уровень транскрипции более чем в 20 раз выше, чем для U6 промотора), что можно объяснить их универсальностью и эффективным распознаванием клеточной транскрипционной машиной, и базовыми высокими уровнями транскрипции [3].

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует значительные различия в эффективности экспрессии гайдовых РНК при использовании разных типов промоторов и подчёркивает необходимость подбора специфических регуляторных элементов для грибных систем. Результаты показывают, что промоторы тРНК обладают наибольшим потенциалом для внедрения в практику геномного редактирования грибов и могут стать основой для стандартизированных кассет в CRISPR/Cas9-системах. Дальнейшие исследования будут направлены на расширение линейки тРНК промоторов, а также на тестирование их универсальности в различных штаммах.

Литература

1. Aleksenko A., Clutterbuck A.J. The plasmid replicator AMA1 in *Aspergillus nidulans* is an inverted duplication of a low-copy-number dispersed genomic repeat // *Molecular Microbiology*. 1996. Vol. 19. № 3. P. 565–574. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.400937.x
2. Zheng X., Zheng P., Zhang K. et al. 5S rRNA promoter for guide RNA expression enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger* // *ACS Synthetic Biology*. 2019. Vol. 8. № 7. P. 1568–1574. doi: 10.1021/acssynbio.7b00456
3. Zhang J., Li K., Sun Y. et al. An efficient CRISPR/Cas9 genome editing system based on a multiple sgRNA processing platform in *Trichoderma reesei* for strain improvement and enzyme production // *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2024. Vol. 17. 22. doi: 10.1186/s13068-024-02468-7