

АННОТАЦИЯ

научно-квалификационной работы Армяниновой Дарьи Константиновны на тему «CRISPR/Cas как инструмент генной инженерии микобактерий»

Целью работы стало изучение возможностей системы CRISPR/Cas в получении делеций больших (более 1000 п.н.) участков хромосомы микобактерий на примере *M. smegmatis* и *M. bovis* BCG.

В результате проведенной работы получен вектор, кодирующий структурную часть направляющей РНК соответствующей нуклеазе Cpf1 с α -пептидом β -галактозидазы для эффективного клонирования направляющих РНК. Разработан новый подход с использованием двойной направляющей РНК и нуклеазы Cpf1 для делеции генов микобактерий. С помощью разработанного подхода был удален ген *ureC* *M. smegmatis*, размером более 1700 пар оснований. Обнаружено, что процесс удаления целевого гена сопровождается избыточным удалением областей правее и левее от целевого гена.

Была проведена оценка целесообразности использования рекомбиназы микобактериофага Che9c для повышения частот гомологичной рекомбинации. Было показано, что рекомбиназа микобактериофага Che9c в составе вектора pJV53 способствовала гомологичной рекомбинации в случае получения делеции гена *ureC* *M. smegmatis*.

Получены 7 вариантов рекомбинантных штаммов BCG на основе вакцинного штамма BCG – 1 (Russia), несущих различные комбинации последовательностей генов протективных антигенов. Штаммы получены методом интеграции целевых последовательностей в геном BCG. Однако такой метод получения рекомбинантных вакцин сопровождается введением в геном генов устойчивости к антибиотикам.

Для разработки методики эффективного удаления гена антибиотикорезистентности с помощью созданных векторов CRISPR/Cpf1, вместе с целевыми генами протективных антигенов в геном BCG были введены гены *LacZ* и *SacB*.

Получены варианты одноплазмидной CRISPR/Cpf1 системы с направляющими РНК и/или Cpf1 нуклеазой под конститутивными и/или регулируемыми промоторами позволяющие ускорить и оптимизировать процесс редактирования.

Разрабатываемый нами метод вставки целевых последовательностей в геном *M. bovis* BCG основанный на сочетании сайт-специфической рекомбинации бактериофага L5 с системой CRISPR/Cpf1 для удаления селективных генов. позволяет эффективно удалять тело интегративной плазмиды с геном антибиотикорезистентности, не затрагивая введенный целевой ген за счет двух двухцепочечных разрывов индуцируемых Cpf1, двойной gRNA и NHEJ механизма репарации ДНК. Использование двух селективирующих маркеров *sacB* и *lacZ* позволяет легко отобрать желаемые клоны после NHEJ репарации. Метод позволил получить немаркированный рекомбинантный штамм *M. bovis* rBCG