

Применение системы CRISPR-Cas для нокаутирования генов у мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*

Научный руководитель – Рожкова Александра Михайловна

Кислицин Валерий Юрьевич

Аспирант

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»

РАН», Москва, Россия

E-mail: kislitsin.val@gmail.com

Мицелиальные грибы родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* находят применение в биотехнологии в качестве продуцентов ферментов, органических кислот, антибиотиков и других полезных веществ. Увеличение продуктивности промышленных штаммов микроорганизмов является актуальной задачей современной биотехнологии, решение которой позволит увеличить эффективность микробиологических процессов. Поставленную задачу можно решить в том числе и с применением системы геномного редактирования CRISPR-Cas [3].

Penicillium verruculosum является грибом-целлюлолитиком, и используется как продуцент ферментных препаратов [1]. Адаптация системы CRISPR-Cas даст новый эффективный инструмент для решения задач метаболической инженерии в штамме *P. verruculosum*.

Для проверки возможности нокаутирования генов у *P. verruculosum* системой CRISPR-Cas был выбран ген нитратредуктазы (*niaD*), нокаут которого позволяет проводить прямой отбор трансформантов на среде, содержащей хлорат натрия. Для этого было решено доставить нуклеазу Cas9 и необходимую ей направляющую-РНК (sgRNA), в двух отдельных плазидах. При этом ген *cas9* находился под регуляцией аутологичного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*gpdA*), а sgRNA - промотора 5S рРНК *A. niger*. Последовательность протоспейсера sgRNA подбиралась в программе ChopChop [2]. На 6 сутки после трансформации на среде с 0,6 М хлората натрия наблюдалось большое число колоний, большая часть из которых были очень мелкими, что свидетельствовало об их замедленном росте. Шестнадцать более крупных колоний далее были пересеяны на среду с 1 М хлоратом натрия. Далее, из выросших на селективной среде колоний, случайным образом были выбраны 8 штук, у которых был отсекуирован ген *niaD*. Результаты показали наличие мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания у 4 клонов в области, где должен был произойти двуцепочечный разрыв геномной ДНК за счёт действия нуклеазы Cas9. Таким образом была успешно проверена работоспособность данной системы редактирования генома у мицелиального гриба *P. verruculosum*.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 18-29-07070).

Источники и литература

- 1) Короткова О. Г., Рожкова А. М., Матыс В. Ю., 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) Labun K., Montague T. G., Gagnon J. A., Thyme S. B, Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering // Nucleic Acids Research. 2018. No. 44. P. 272–276.

- 3) Song R., Zhai Q., Sun L., et al. CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective // Applied Microbiology and Biotechnology. 2019. Vol. 103 P. 6919 – 6932.