

# ABSTRAKT

## **Vývoj na CRISPR-Cas9 technologie pro genetickou modifikaci *Lactococcus lactis subsp. cremoris***

*Lactococcus lactis*, také známý jako bakterie kyseliny mléčné (LAB), je široce používaná bakterie produkující kyselinu mléčnou z laktózy. Jedná se o důležitý mikroorganismus používaný při fermentaci sýrových produktů, stal se ale také prvním geneticky modifikovaným mikroorganismem, který byl použit z terapeutických důvodů. LAB je také běžné probiotikum užívané jako doplněk stravy při mírném průjmu. Cílem této studie je vyvinout technologii, která umožňuje modifikovat *Lactococcus lactis* pomocí systému Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats - Cas9 (CRISPR-Cas9), který se stane rychlejším, jednodušším a poměrně levným nástrojem pro genetické inženýrství této bakterie.

První část projektu je testoval efekt dvou plazmidů, jeden plazmid obsahoval rezistenci na antibiotikum erytromycin, druhý plazmid systém CRISPR-Cas9, který rezistenci deaktivoval. Selekcí v médiích s antibiotikem a sledováním optické hustoty bakterií byla potvrzena účinnost tohoto systému.

Druhá část projektu byla založena na genetické modifikaci buněčného chromozomu za použití homologní rekombinace a poté byla použita CRISPR-Cas9 jako nástroj pro eliminaci buněk, které zůstaly nezměněné.

Pro oba experimenty jsem použil NIsin genový expresní systém (Mo Bi Tech, 2008). Expresse plazmidových genů byla indukována zavedením nisinu do růstového média. Experimenty ukázaly některé slibné výsledky, i když genetický návrh plazmidů a protokoly růstu buněk stále vyžadují určité optimalizace a úpravy.

Projekt byl realizován ve spolupráci s kolegy z biotechnologické laboratoře v Ústavu Jožefa Štefana, Lublaň, Slovinsko (Berlec a kol., 2017).