

Оптимизация этапов сборки фаговых геномов методом TAR-клонирования на примере литического бактериофага КР32_195 против *Klebsiella pneumoniae*

Курченко Ольга Михайловна

Студент (бакалавр)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: o.kurchenko@g.nsu.ru

Около ста лет назад была продемонстрирована способность бактериофагов уничтожать бактериальные патогены, однако идея использования фагов для лечения бактериальных инфекций активно развивается лишь в последнее десятилетие в связи с широким распространением антибиотикоустойчивых штаммов. Существуют данные о положительных результатах лечения фагами, и ряд препаратов уже применяется на практике. Однако основной проблемой фаготерапии остается узкий спектр хозяев большинства природных бактериофагов. В качестве решения предложено изменять специфичность фага, редактируя гены, кодирующие белки хвостовых шипов.

Редактирование геномов бактериофагов является нетривиальной задачей, поскольку классические подходы (гидролиз эндонуклеазами рестрикции и лигирование) неэффективны. А вот TAR-клонирование, основанное на способности дрожжей поглощать и объединять фрагменты ДНК за счет гомологичной рекомбинации, является эффективным методом. Этот подход был использован в данной работе для сборки протяженного генома из ПЦР-фрагментов.

Цель — оптимизировать этапы сборки фагового генома из перекрывающихся ДНК-фрагментов для получения инфекционных фаговых частиц на основе генома. В качестве объекта исследования был выбран литический бактериофаг КР32_195 с подовирусной морфологией, поражающий некоторые штаммы *Klebsiella pneumoniae*.

Идеология эксперимента была разработана ранее и адаптирована нами для исследуемого объекта [1]. На первом этапе геном бактериофага КР32_195 был собран из ПЦР-фрагментов и встроен в центромерную дрожжевую плазмиду рRSII415 методом TAR-клонирования. Из дрожжей выделили плазмиду, несущую фаговый геном размером около 40 тыс. п.н.

Далее на основе собранного генома был получен инфекционный бактериофаг КР32_195. Поскольку клетки клебсиелл обладают толстой полисахаридной капсулой, препятствующей эффективной электротрансформации, “перезапуск” фагового генома осуществляли в промежуточном хозяине *E. coli*. Для этого клетки *E. coli* трансформировали дрожжевой плазмидой, несущей фаговый геном, а после наработки фагового потомства бактерии разрушали хлороформом и отделяли водную фазу с бактериофагами. Полученный образец использовали для заражения клеток *K. pneumoniae* (штамм 2337 Коллекции экстремофилов и типовых культур ИХБФМ СО РАН), в результате чего регистрировали формирование фаговых бляшек на “газоне” клебсиелл.

Таким образом, геном бактериофага КР32_195 был собран из перекрывающихся фрагментов с помощью TAR-клонирования и “перезапущен” в *E. coli* с образованием инфекционных бактериофагов. В дальнейшем этот подход совместно с методами сайт-направленного мутагенеза будет использован для объединения различных элементов фаговых геномов, что позволит конструировать бактериофаги с заданными свойствами, а также детально изучать функции различных фаговых генов.

Источники и литература

- 1) Ando H., Lemire S., Pires D.P., et al. Engineering Modular Viral Scaffolds for Targeted Bacterial Population Editing // Cell Systems. 2015. Vol. 1. No. 3. P. 187–196.