**Получение и изучение свойств L-лактатдегидрогеназы из *Limosilactobacillus reuteri***

***Широкова А. A.1 Пометун А. А.1,2 Тишков В. И.1,2***

*Студентка, 6 курса специалитета*

1Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова *химический факультет, Москва, Россия*

*2Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН (ИНБИ РАН)*

*E-mail:* [*annaevashirokova@gmail.com*](mailto:annaevashirokova@gmail.com)

В последнее время очень острой проблемой современной медицины является возрастающая антибиотикорезистентность патогенов. В 2018 году ВОЗ причислил *Klebsiella pneumoniae* к наиболее опасным бактериям в связи с их резистентностью к существующим антибактериальным препаратам. Одним из способов борьбы с клебсиеллой – подавление ее роста. Недавно было показано, что некоторые штаммы молочнокислых бактерий могут эффективно ингибировать *K.pneumoniae* при ее росте в виде биопленок. Одним из таких штаммов является *Limosilactobacillus reuteri*, секретирующие в среду несколько типов ферментов, которые можно разделить на внеклеточные и внутриклеточные. Эти ферменты можно классифицировать на 3 типа: протеазы, воздействующие на клеточные стенки клебсиеллы, гидролазы нуклеиновых кислот и ферменты метаболизма лактобактерий. Довольно большой интерес вызывают продукты метаболизма (L-, D-лактатдегидрогеназы и цистеинсинтаза), т.к. они секретируются в большом количестве на контакте с биопленками патогенами. [1]

В качестве объекта исследования нами был выбрана – L-лактатдегидрогеназа. Это фермент, катализирующий реакцию превращения пирувата в лактат с сопряженным окислением NADH в NAD+. Нами были проанализированы базы данных и найдена последовательность, соответствующая L-LDH из *L.reuteri* (LreLLDH)*.* Далее были спроектированы праймеры на основе данной последовательности, конструкция которых предполагает два варианта расположения дополнительного His-tag участка на С- или N- концах, необходимого для очистки белка. После этого были получены два варианта плазмидной ДНК с генами LreLLDH\_NHis и LreLLDH\_СHis, которыми была произведена трансформация клеток *E.coli* для дальнейшей наработки LreLLDH *.* Для полученных двух форм были проведены подбор и оптимизация условий экспрессии. Оптимизация проводилась по двум параметрам: концентрация индуктора IPTG и поглощения культуральной среды в момент индукции. Оптимизация условий экспрессий позволила увеличить выход по активности фермента более, чем в 2 раза. Наличие целевого фермента подтверждали с помощью белкового электрофореза и масс-спектрометрии MALDI/TOF/TOF. Очистку обеих форм белка проводили с помощью аффинной метал-хелатной хроматографии. Для нее также был проведен подбор условий и подобрана точная концентрация имидазола, при которой белок перестает связываться с колонкой, что значительно увеличивает выход очистки.

\*Белок выделен из лактобактерий *Limosilactobacillus reuteri.* Штамм бактерий был предоставлен Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности.

*Данное исследование проводится с финансовой поддержкой РНФ по гранту № 23-64-10029.*

**Литература**

1. Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K. V., Begunova A. V., Rozhkova I. V., Fedorova T. V. Exoproteome Analysis of Antagonistic Interactions between the Probiotic Bacteria Limosilactobacillus reuteri LR1 and Lacticaseibacillus rhamnosus F and Multidrug Resistant Strain of Klebsiella pneumonia // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, 10999. Р. 1-18.