

Получение рекомбинантных форм цитолитических ферментов gp10 и gp11 бактериофага *Curtobacterium Аука*

Научный руководитель – Левашов Павел Андреевич

Якимов Андрей Юрьевич

Аспирант

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, Кафедра химической энзимологии, Москва, Россия

E-mail: andrey.yackimow@yandex.ru

В последние 10 лет наблюдается значительный рост производства и потребления бобовых культур в Российской Федерации. Одним из способов повышения урожайности бобовых в России является снижение потерь из-за фитопатогенов. За последние 20 лет в Европейской части России одним из наиболее распространенных бактериальных патогенов бобовых стали бактерии *Curtobacterium flaccumfaciens* (прежде эндемичные для Северной и Южной Америки); они поражают сосудистую систему растений и приводят к гнилям на листе и стеблях растений, их увяданию и гибели, а также заражению семян. Из-за малой эффективности, сложности регуляции и сертификации, а также стоимости использование химических бактерицидных реагентов для защиты растений затруднено.

В нашей лаборатории было обнаружено, что литический бактериофаг *Аука* поражает штаммы *C. flaccumfaciens*, циркулирующие на территории России. Однако из-за малой резистентности фаговых частиц к экстремальным условиям внешней среды (в частности, к УФ-излучению) становится перспективным использование в качестве компонентов потенциальных препаратов для защиты растений и семян бобовых не самих бактериофагов, а их цитолитических ферментов.

В рамках этой работы были получены рекомбинантные формы пептидогликангидролазы *gp11* и ацетилглюкозаминидазы *gp10*. Белок *gp11* синтезировали на основе вектора pEE3 с добавлением на N-конце белка дополнительного 6xHis-tag для аффинной очистки. Белок *gp10* был получен на основе вектора pTSL в форме гибридного белка, с отщепляемым TEV-протеазой шаперонным доменом SlyD на N-конце для улучшения фолдинга, а также добавлением N-концевого дополнительного 6xHis-tag для аффинной очистки. Экспрессия этих генетических конструкций проводилась в штаммах *E. coli* BL21(DE3) (для *gp11*) и B834(DE3) (для *gp10*), в которых наблюдалось интенсивное накопление белковых продуктов ожидаемого размера в биомассе продуцирующих клеток. После разрушения биомассы с помощью ультразвука, лизаты наносили на металлохелатный сорбент Workbeads Ni-IDA для аффинной очистки. Элюаты, обогащенные исследуемыми белками, были использованы для дальнейшего изучения их свойств.

Исследование свойств препаратов белка *gp11* показало, что он обладает выраженной цитолитической активностью по отношению к штаммам *C. flaccumfaciens*. Его цитолитическая активность проявлялась как на чашках с растущими культурами бактерий (зоны лизиса в месте нанесения фермента), так и в клеточной суспензии (падение оптической плотности после добавления фермента). Также было обнаружено, что добавление белка *gp10* препятствует инфекции бактерий *Curtobacterium* фагом *Аука*. Данное свойство белка *gp10* пропадало после его термической денатурации. Установленные свойства белка *gp10* могут свидетельствовать о выполнении им преимущественно рецепторной функции в процессе развития фаговой инфекции клеток.