

Получение деполимеразы бактериофага vB_KrnP_KpV766 и проверка ее специфичности

Научный руководитель – Шабалина Анна Вячеславовна

Оснач Вероника Андреевна

Студент (магистр)

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

E-mail: Osnach.Veronika@yandex.ru

Бактериофаги *Klebsiella pneumoniae* имеют в своём составе деполимеразы, которые способны разрушать полисахаридную капсулу бактерий и делать их более восприимчивыми к воздействию различных внешних факторов, например, таких, как противомикробные препараты. Большинство деполимераз отличается высокой специфичностью и направленностью только на один капсульный тип, что сильно сужает круг бактерий-хозяев бактериофага. Но при этом встречаются деполимеразы, которые способны расщеплять несколько капсульных типов *K. pneumoniae*.

В данной работе была проверена ферментативная активность деполимеразы Kp766, которая, предположительно, разрушает три разных капсульных типа: K1, K2 и K57. Последовательность гена деполимеразы Kp766 была взята из аннотированного генома бактериофага vB_KrnP_KpV766 (NC_047773.1). Нуклеотидная последовательность гена деполимеразы была собрана *de novo* методом ПЦР в два шага. Полученный ген клонировали в экспрессионный вектор pGD, после чего трансформировали компетентные клетки *E. coli* T7 express. Индукцию проводили 18 часов при 20°C с добавлением 0.1мМ ИПТГ. Лизис клеток осуществляли методом замораживания-оттаивания с добавлением лизоцима. Очистку белка проводили с помощью набора His-Spin Protein Miniprep (Zymo Research). Ферментативную активность деполимеразы проверяли методом спот-теста и методом ингибирования формирования биопленок в 3 повторностях с последующим статистическим анализом. Специфичность действия деполимеразы Kp766 проверяли на коллекции штаммов *K. pneumoniae*.

В результате проделанной работы, была получена очищенная рекомбинантная деполимераза бактериофага vB_KrnP_KpV766. Проведение спот-теста с деполимеразой Kp766 на штаммах *K. pneumoniae* не было эффективным, поскольку зоны лизиса не выделялись. По результатам проверки эффективности ингибирования формирования биопленок полученной деполимеразой было показано, что образование биопленок уменьшалось в 2-4 раза по сравнению с контрольными образцами. Специфичность действия деполимеразы была проверена на 46 штаммах *K. pneumoniae* с тремя капсульными типами. Деполимераза Kp766 проявила ферментативную активность на 8/8 (100%) штаммах *K. pneumoniae* с капсульным типом K1, на 22/28 (78%) штаммах с капсульным типом K2 и на 8/10 (80%) штаммах с капсульным типом K57.

Таким образом, полученная рекомбинантная деполимераза Kp766 способна разрушать полисахаридные капсулы *K. pneumoniae*, относящихся к капсульным типам K1, K2 и K57. Кроме того, данная деполимераза в равной степени эффективно снижает рост клеток *K. pneumoniae* всех трех капсульных типов.