

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ ФЛАГЕЛЛИНА С *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

А.П. Жеребцов, А.А. Калошин, Н.А. Михайлова

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Флагеллины представляют собой группу белков, являющихся основным структурным компонентом бактериальных жгутиков, которые отвечают за обеспечение подвижности и инвазивности *Pseudomonas aeruginosa*. Особый интерес для использования флагеллинов в вакцинах является их способность проявлять адьювантные свойства и активировать систему врожденного иммунитета благодаря образованию комплексов с рецептором TLR-5, расположенного на клетках иммунной системы. Целью нашего исследования явилось получение, очистка и изучение свойств рекомбинантной формы флагеллина-С *P. aeruginosa*.

Последовательность гена *flicC* была встроена в плазмидный вектор pQE-30 под контроль регуляторных участков для экспрессии в клетках *Escherichia coli* штамма M15 (Qiagen). В результате культивирования штамма-продуцента с экспрессией гена *flicC*, индукция которой осуществлялась добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом, происходил синтез рекомбинантного белка FlicC с молекулярной массой 40,7 кДа.

Первый этап очистки рекомбинантного белка FlicC представлял собой выделение телец включения. Оказалось, что рекомбинантный белок FlicC обладал выраженными гидрофобными свойствами и полностью не растворялся в 8 М растворе мочевины, что затрудняло его хроматографическую очистку. Поэтому это свойство использовали для разработки оригинального метода очистки. С этой целью тельца включения ресуспендировали в 4 М буферном растворе мочевины в течение часа, а затем осаждали центрифугированием нерастворимую фракцию, содержащую рекомбинантный белок FlicC и удаляли супернатант. Далее проводили растворение рекомбинантного белка FlicC в 6 М буферном растворе гуанидин гидрохлорида, с последующим центрифугированием и удалением нерастворимых компонентов. В нативные условия рекомбинантный белок FlicC переводили диализом против 50 мМ Tris-HCl, pH 9,0.

Очищенный рекомбинантный белок FlicC использовали для иммунизации мышей линии *Balb/c*, вводя препарат внутрибрюшинно двукратно с двухнедельным интервалом в дозе 50 мкг на одно животное. При этом исследовали рекомбинантный белок FlicC в чистом виде и с адьювантом гидроокисью алюминия в соотношении белок: адьювант 1:1 и 1:3. При исследовании иммунных сывороток в ИФА обнаружены высокие титры специфических антител и не установлено усиливающего действия гидроокиси алюминия на иммунизирующую дозу.

Полученные иммунные мышинные сыворотки исследовали для подавления подвижности бактерий. Сыворотки с различным разведением (1:100, 1:300, 1:1000 по отношению к среде), добавляли в агаризованную LB-среду (0,3 % полужидкий агар) и разливали в 12 луночные планшеты с радиусом лунки 22,6 мм и рабочим объемом 2,0 мл. Культуру *P. aeruginosa* штамма PA-103 разводили до оптической плотности 0,2 при OD₆₀₀ и добавляли в центр каждой лунки планшета в объеме 0,2 мл. В качестве контроля использовали фосфатно-солевой буфер. Далее проводили инкубацию при температуре 37° С в течение 18 часов. В результате эксперимента выявлено, что культура *P. aeruginosa* в полужидком агаре разрасталась по всей поверхности контрольных лунок. В лунках с добавлением иммунных сывороток радиус зоны роста ограничивался 3–5 мм, что свидетельствовало об ингибировании передвижения бактерий.

Таким образом, в ходе проведенных исследований разработали метод очистки рекомбинантного белка FlicC *P. aeruginosa* и получены иммунные сыворотки, содержащие специфические антитела, которые подавляли подвижность синегнойной палочки.