

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО СТАФИЛОКОККОВОГО АНАТОКСИНА

А.А. Калошин, О.Ю. Вергасов, Н.А. Михайлова

ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Staphylococcus aureus (золотистый стафилококк) является одним из основных возбудителей внутрибольничных инфекций, вызывая осложнения после операций и других медицинских манипуляций. При этом значительная доля здорового населения является носителями патогена. К концу 20-го века произошло снижение эффективности антибиотикотерапии стафилококковой инфекции вследствие широкого распространения штаммов *S. aureus*, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (в частности метициллинрезистентные штаммы). Поэтому разработки антистафилококковых вакцин и иммуноглобулинов продолжает оставаться актуальными.

Бактерии *S. aureus* продуцируют ряд экзотоксинов, среди которых наиболее опасным и хорошо изученным является альфа-гемолизин, проявляющий токсичность по отношению к большинству эукариотических клеток, в том числе и к эритроцитам. В практике здравоохранения широкое распространение получили химически детоксигированные препараты стафилококковых экзотоксинов, называемые анатоксинами. В настоящем исследовании была поставлена цель получения атотоксической формы альфа-гемолизина (анатоксина) *S. aureus* с использованием генно-инженерных технологий.

На первом этапе, с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК *S. aureus* 209-Р, амплифицировали последовательность гена *hla*, кодирующего белок альфа-гемолизин. Прямой праймер соответствовал начальным нуклеотидам гена *hla* и включал дополнительный сайт рестрикции *Bam*HI, а обратный праймер был комплементарен последним нуклеотидам гена *hla* и включал дополнительный сайт рестрикции *Hind*III. Амплифицированный ген *hla* встроили в плазмиду pQE-30 (Qiagen) по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III, в результате чего получили рекомбинантную конструкцию pQE-30-*hla*. Далее с помощью ПЦР провели делецию в рекомбинантной конструкции pQE-30-*hla* последних триплетов гена *hla*, участвующих в формировании цитотоксической области, что было необходимо для получения анатоксина. Контроль клонированных последовательностей осуществляли секвенированием.

В результате экспрессии в клетках *Escherichia coli* штамма M15 (Qiagen) происходил синтез двух вариантов рекомбинантных белков (полной и делеционной). Рекомбинантные белки имели на N-конце дополнительную шестигистициновую последовательность, необходимую для их хроматографической очистки в колонках с никель-сефарозой.

Оценку активности очищенных рекомбинантных белков осуществляли по их способности взаимодействовать с эритроцитами кролика. В результате выявили, что рекомбинантный альфа-гемолизин лизировал эритроциты. В тоже время его делеционная форма проявляла нейтральное действие по отношению к эритроцитам, что свидетельствовало об отсутствии токсичности и позволило называть ее анатоксином. С целью получения специфических сывороток, провели трехкратную внутрибрюшинную иммунизацию мышей препаратами сорбированных на гидроокиси алюминия рекомбинантных белков. В течение семи дней после первого введения рекомбинантного альфа-гемолизина наблюдали симптомы интоксикации (вялость, обширные язвы на коже и диарея). По окончании курса иммунизации у животных отобрали сыворотки крови и протестировали в ИФА, выявив наличие высоких титров специфических антител. Эти сыворотки исследованы на способность нейтрализовать альфа-гемолизин. Для этого к рекомбинантному альфа-гемолину добавляли полученные сыворотки, инкубировали 15 минут и тестировали цитотоксичность на эритроцитах. Оказалось, что антисыворотки, как к полноразмерному альфа-гемолину, так и анатоксину предотвращали лизис эритроцитов.

Таким образом получены рекомбинантные альфа-гемолизин и анатоксин *S. aureus*, которые в перспективе могут быть использованы для разработки профилактических и лечебных иммунобиологических препаратов.