

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

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

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

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – грамотрицательная бактерия, обладающая многочисленными факторами патогенности и вызывающая до 20 % внутрибольничных инфекционных заболеваний у пациентов с ослабленным иммунитетом. Большинство штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих в клинике, обладают высокой резистентностью по отношению к широкому спектру антибиотиков, что повышает актуальность разработки антисинегнойных вакцин.

В последнее время возрос интерес исследователей к семейству белков флагеллинов, которые являются главным компонентом жгутиков, участвующих в проявлении вирулентности возбудителя и в формировании реакций организма хозяина на внедрение патогена за счет активации факторов врожденного и адаптивного иммунного ответа. Известно, что флагеллин является лигандом для рецептора врожденной иммунной системы TLR5 (toll-like receptor 5). Образование комплекса флагеллин – TLR5 стимулирует развитие защитных реакций организма.

Целью исследования явилось получение рекомбинантной формы консервативного флагеллина-С *P. aeruginosa*, формирующего базальное тело жгутика бактерии. Полноразмерную последовательность гена *FlicC* синтезировали в результате ПЦР на основе матричной ДНК штамма PA¹⁰³ *P. aeruginosa*. Дизайн праймеров осуществляли с использованием полноразмерной последовательности ДНК штамма PA¹⁰³ *P. aeruginosa*, опубликованной в базе данных GenBank. Прямой праймер (5' – GGA TCC GCC TTG ACC GTC AAC ACC AAC ATC G) имел дополнительный сайт рестрикции *Bam*HI, а обратный праймер (5' – AAG CTT AGC GCA GCA GGC TCA GAA CCG AC) – дополнительный сайт рестрикции *Hind*III, что было необходимо для встраивания в бактериальный экспрессирующийся плазмидный вектор QE-30 (Qiagen).

На первом этапе, амплифицированный ген *FlicC* клонировали с помощью коммерческого набора InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas). В результате ген *FlicC* был встроен в плазмиду pTZ57R. После анализа результатов секвенирования отобрали рекомбинантную конструкцию pTZ57R-FlicC, несущую искомую последовательность клонированного гена, не содержащую мутаций, которые могут возникать при ПЦР с ТАQ-полимеразой. Далее клонированный ген *FlicC* встроили по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III в плазмиду pQE-30, предназначенную для регулируемой экспрессии в клетках штамма *Escherichia coli* M15. В результате получили рекомбинантную конструкцию pQE-30-FlicC. Синтез рекомбинантного белка происходил при культивировании клеток *E. coli* M15, трансформированных конструкцией pQE-30-FlicC. Для индукции экспрессии добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

В результате электрофоретического анализа белковых продуктов, полученных после культивирования с экспрессией, в полиакриламидном геле по методу Лэммли идентифицировали рекомбинантный белок с размером около 40 кДа, что соответствовало расчетным данным (40,7 кДа). Синтезированный рекомбинантный белок образовывал тельца-включения, которые после их выделения использовали для аффинной хроматографической очистки целевого рекомбинантного продукта в денатурирующих условиях в колонке с Ni-сефарозой.

Полученный рекомбинантный флагеллин-С будет использован для дальнейшего иммунобиологического тестирования.