

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ PSEUDOMONAS AERUGINOSA: ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

А.А. Калошин, Е.М. Зими́на, Н.А. Михайлова

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

Известно, что в формировании защиты от бактериальных инфекций важную роль играют поверхностные белки. У *Pseudomonas aeruginosa* такими свойствами обладают белки F, L и I наружной мембраны (OprF, OprL и OprI). Особую роль в генерализации инфекции и повреждающем действии оппортунистических бактерий играют экзотоксины. Наиболее опасным фактором патогенности *P. aeruginosa* является экзотоксин А, ингибирующий белковый синтез. Поэтому в качестве объектов исследований нами выбраны поверхностные белки OprF, OprL и OprI, а также экзотоксин А.

Последовательности целевых генов амплифицировали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК *P. aeruginosa* PA-103. В результате амплифицированы последовательности генов мембранных белков oprF, oprL и oprI, которые встроили в плазмиду pQE-30 (QIAGEN). В результате экспрессии в клетках *Escherichia coli* штамма M15 (QIAGEN) синтезированы рекомбинантные продукты со следующими молекулярными массами: 38,9 кДа (OprF), 19,2 кДа (OprL) и 10,1 кДа (OprI). При клонировании экзотоксиновой последовательности амплифицированный ген *toxA* встроили в плазмиду pET-28b(+) (Novagen). Экспрессию проводили в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). Таким образом, синтезировали высокотоксичный для мышей и культуры эукариотических клеток рекомбинантный белок (экзотоксин А) с молекулярной 73,8 кДа. Далее с помощью специфических рестриктаз, вырезали из гена *toxA* фрагмент размером 1,6 kb, который встроили в плазмиду pET-28b(+). В результате экспрессии последней конструкции получили рекомбинантную атоксическую форму (анатоксин) с молекулярной массой 65,8 кДа, у которой был нарушен третий домен, отвечающий за цитотоксическую функцию. Синтез рекомбинантных белков, с использованием созданных продуцентов, проводили путем индукции экспрессии с помощью ИПТГ. Очистку рекомбинантных белков осуществляли методом хелатной хроматографии с использованием Ni-сефарозы. Белковые продукты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли и в иммуноблоттинге.

Протективные свойства препаратов, сорбированных на геле гидроокиси алюминия, оценивали на мышах, которых иммунизировали внутрибрюшинно. Через две недели после последнего введения препаратов животным внутрибрюшинно инъецировали патогенный материал. Наиболее эффективной оказалась схема двукратного введения с двухнедельным интервалом. В экспериментах с мембранными белками использовали нетоксигенный штамм PA-170015, характеризующейся отсутствием синтеза экзотоксинов, а при исследовании протективных свойств анатоксина использовали рекомбинантный экзотоксин А и штамм PA-103, обладающий основными факторами патогенности. Наиболее выраженные протективные свойства проявляли рекомбинантные белки OprF, OprL и анатоксин. Рекомбинантный белок OprI обладал низкой иммуногенностью, что вероятно связано с его малым молекулярным весом. При введении комплексов рекомбинантных белков наблюдали аддитивный эффект, с наилучшим результатом у смеси рекомбинантных OprF и анатоксина.

Используя результаты исследования отдельных рекомбинантных антигенов, создали различные варианты слитых рекомбинантных белков: OprF-OprI, ΔOprF-OprI, OprF-ΔOprI, ΔOprF-ΔOprI, OprF-aTox, OprF-aTox-ΔOprI, штаммы-продуценты которых были получены в результате слияния генов oprF, oprI и *atoxA* (ген анатоксина) в одном векторе для экспрессии. Установлено что слитые рекомбинантные белки обладали более выраженными иммуногенными свойствами по сравнению с моноантигенами. Среди слитых вариантов наиболее эффективными оказались OprF-ΔOprI и OprF-aTox-ΔOprI.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены рекомбинантные белки, обладающие защитными свойствами от экспериментальной инфекции *P. aeruginosa* и отобран комплекс двух рекомбинантных белков (OprF и анатоксина), а также слитые рекомбинантные белки, которые могут быть использованы для разработки антисинегнойных вакцин.