

УДК 602

### ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАЦИИ ШТАММА *E. COLI* BL21(DE3) С ПЛАЗМИДОЙ pET32A ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ СИНТЕЗА ЦЕЛЕВОГО БЕЛКА

К.В. Кувакин<sup>1,2</sup>, Е.В. Демьянова<sup>1</sup>, В.И. Лисицкая<sup>1</sup>, О.Б. Иванченко<sup>2</sup>

1. ФГУП «Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

2. Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Пероральная вакцина против холеры находится на первом месте в списке приоритетных вакцин ВОЗ. В настоящее время для профилактики холеры используются пероральные субъединичные вакцины, основанные на инактивированных («убитых») штаммах *V.cholerae*. При применении инактивированных вакцин сохраняется вероятность развития аутоиммунных и токсических осложнений, а для обеспечения полной защиты от заболевания требуется несколько процедур вакцинации с соблюдением необходимого интервала между ними. Таким образом, становится актуальной задача разработки кандидатных вакцин против холеры нового поколения.

Разработка поливалентной вакцины на основе фьюжн-белка, содержащего высокоиммуногенные эпитопы патогенных штаммов холеры: субъединицу холерного токсина В (rBS), белок холерных пилей А (TcpA), лиганд к Fc-рецепторам в стенке желудка (FcL), является перспективным подходом к созданию эффективной вакцины. Производство рекомбинантных вакцин не требует работы с патогенными микроорганизмами, полученный препарат поддается четкой стандартизации и контролю физико-химических параметров. В ответ на введение рекомбинантного белка активируется не только гуморальное, но и клеточное звено приобретенного иммунитета, что обуславливает высокую протективность вакцины. Использование лиганда к Fc обеспечивает проникновение рекомбинантного белка через стенку желудка, что позволяет применять вакцину пероральным способом.

Принципиальным отличием разрабатываемой вакцины против холеры от лицензированных коммерческих вакцин является то, что кандидатная вакцина основана на рекомбинантном белке, созданном с помощью методов геной инженерии и получаемом в клетках *Escherichia coli*, без культивирования патогенных микроорганизмов. Структура химерного фьюжн-белка искусственно сконструирована таким образом, что выбраны высокоиммуногенные эпитопы поверхностных белков штаммов патогена. Такие белки невозможно получить при традиционном подходе, культивируя патогены. Вакцинные препараты, получаемые с помощью такой технологии, обладают большей фармацевтической чистотой и не содержат консервантов (формальдегид, мертиолят).

Целью данной работы является исследование возможности масштабирования процесса получения фьюжн-белка и моделирования условий стандартного процесса выращивания штамма.

Задачей экспериментов являлся поиск клонов с повышенной способностью синтезировать фьюжн-белок и оптимизация условий ферментации штамма-продуцента для повышения уровня синтеза целевого белка.

Все эксперименты были проведены на культуре продуцента фьюжн-белка *E.coli* BL21(DE3) с плазмидой pET32a/Fc-TcpA-native с использованием микроскопа МБИ-15у4.1, спектрофотометра UVmini-1240 Shimadzu, термостатированной качалки Gerhardt и ферментера Bioflo 110 с общим объемом реактора 14 литров (рабочий – 10 литров) фирмы New Brunswick, снабженного системами термостатирования, рН-статирования, автоматического поддержания уровня аэрации и подачи титрантов или добавок.

Для отбора клонов при приготовлении рабочей культуры штамма и наработки посевного материала использовали L-агар и L-бульон. Для поиска клонов с повышенной способностью синтезировать фьюжн-белок из образца культуры штамма выделяли на L-агаре отдельные колонии (15 штук), помещали каждый клон в L-бульон с ампициллином (100 мкг/мл). Далее культуры исследуемых клонов помещали в термостатированную качалку и, по достижении оптической плотности 1.0–1.1 ед. при длине волны 540 нм, вводили индуктор (лактоза) до конечной концентрации 0.68 %. Длительность индукции 5 часов. Продуктивность клонов оценивали с помощью микроскопии в режиме фазового контраста по величине, зрелости и количеству телец включения в клетках культур клонов. По результатам микроскопического исследования были отобраны 3 клон из 15, на основе культур которых была наработана и заморожена при  $-70^{\circ}\text{C}$  рабочая культура штамма оптической плотностью 11 ед. при длине волны 540 нм.

Культивирование штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3) / pET32a/Fc-TcpA-native в ферментере Bioflo 110. Для оптимизации условий культивирования штамма применяли метод периодического глубинного культивирования с использованием в качестве индукторов экспрессии гена фьюжн-белка IPTG в конечной концентрации 0,5 мМ, а также лактозу 0.68 %. Культивирование проводили при pH 7.4–6.9 и поддержании аэрации на уровне 50 % от насыщения при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Подачу индуктора осуществляли в середине логарифмической фазы роста культуры, при ориентировочной оптической плотности 8.0–10.0 ед. при длине волны 540 нм, после чего отбирали пробы для анализа методом электрофореза в ПААГ с ДДС-Na.

Для определения наилучшей схемы индукции целевого белка, соответствующей как максимальному выходу биомассы, так и количеству фьюжн-белка на клетку, были применены следующие варианты ферментации:

- 1) Индукцию синтеза целевого белка производили введением IPTG.
- 2) Индукцию синтеза целевого белка производили введением лактозы.
- 3) Индукцию синтеза целевого белка производили введением лактозы с введением добавки во время индукции.

В 3 варианте культивирования добавка включала в себя кислотный гидролизат казеина, дрожжевой экстракт и глюкозу. Добавку вводили в ферментер через 15 минут после введения лактозы.

Анализ трех представленных схем ферментации позволяет сказать, что третий вариант культивирования по выходу биомассы и соответственно целевого белка является предпочтительным, кроме того дает возможность не использовать IPTG в качестве индуктора.