

Литература

1. Hu Y., Anes J., Devineau S., Fanning S. Emerging trends in antimicrobial resistance patterns of *Salmonella*: a five-year retrospective analysis // *Foodborne Pathogens and Disease*. 2021. Vol. 18. № 2. P. 63–84.
2. Li J., Li Y., Song N., Chen Y. Molecular epidemiology and risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in Eastern China // *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020. Vol. 21. P. 306–313.
3. Paczosa M.K., Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016. Vol. 80. № 3. P. 629–661.
4. Whitfield C., Trent M.S. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides // *Annual Review of Biochemistry*. 2014. Vol. 83. P. 99–128.
5. Zhang X., Li C., Wang Y. et al. PhoE as a potential vaccine candidate against *Klebsiella pneumoniae* infections // *Vaccine*. 2022. Vol. 40. № 12. P. 1785–1793.

УДК 543.544

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-2-30-32>**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО
СЛИТОГО ПОЛИПЕПТИДА ИЗ КАПСИДНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ДЕНГЕ****В.С. Лемешева, Д.Н. Поляков, Н.С. Савельев, Ю.В. Плетюхина, С.О. Рабдано***ФГБУ СПбНИИВС ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия*

Капсидный белок вируса денге (С-белок) представляет собой высокоосновный нуклеопротеин, образующий гомо-олигомеры, способные к неспецифичному связыванию ДНК и РНК. В жизненном цикле вируса С-белок ответственен за упаковку и сохранность геномной РНК и формирование нуклеокапсида [1]. Благодаря своим структурным и антигенным свойствам он рассматривается как перспективный объект для создания вакцин и фундаментальных исследований [2]. Экспрессия рекомбинантных белков в *Escherichia coli* является доступной и эффективной системой получения субъединичных вакцинных антигенов, однако склонность капсидных белков к комплексообразованию и связыванию нуклеиновых кислот (НК) существенно усложняет процесс очистки [2-5]. В связи с этим актуальной задачей является разработка оптимизированной технологии выделения и очистки высокоосновных белков. Для создания тетравалентной вакцины против всех четырех серотипов денге в качестве одного из белков-кандидатов была сконструирована химера, содержащая последовательности четырех белков капсида, и последовательность из шести гистидинов на С-конце (His-ter). Получившийся белок обладает положительным зарядом, высоким сродством к обоим типам НК и имеет тенденцию к самосборке. Целью данного исследования является разработка технологии выделения и очистки созданного рекомбинантного слитого полипептида из капсидных белков вируса денге. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи.

1. Оценка расчетных характеристик белка по его аминокислотной последовательности.
2. Подбор условий разрушения биомассы *E. coli*, содержащей целевой белок.
3. Оптимизация условий осаждения сульфатом аммония.
4. Тестирование доступных хроматографических подходов (SEC, IEX, IMAC, HIC).
5. Оценка вклад добавок/солей/нуклеаз, а также типа и параметров хроматографирования.

Разработка технологии выделения и очистки производилась с использованием биомассы клеток *E. coli*, содержащих целевой белок, наработанной при помощи биореактора. Разрушение биомассы осуществляли при помощи дезинтегратора под давлением Lab Homogenizer Panda Plus 1000 GEA.

Расчетные характеристики полипротеина, полученные при помощи ресурсов ProtParam (<https://protparam.net/>) и ProtPI (<https://www.protpi.ch/>) показали большое количество основных и гидрофобных групп. При этом, отрицательное значение индекса GRAVY (Grand Average of Hydropathicity) указывает на высокую гидрофильность белка. Расчетная масса белка составила 46,7 кДа, pI 13, а заряд при pH 7,4 равен +90,5.

Подбор условий разрушения биомассы показал, что белок имеет растворимую форму и преимущественно находится в надосадочной жидкости после осаждения клеточного дебриса. Тестировались буферы на основе Tris-HCl и фосфатно-солевые. Высокое содержание NaCl (до 1 M) в составе буфера для разрушения не улучшает растворимость, а добавление MgCl₂ (до 8 mM) и/или EDTA (до 5 mM) не влияет на поведение нуклеопротеинового комплекса в растворе, например, при осаждении сульфатом аммония и при хроматографировании. Наиболее удачным, с точки зрения последующих этапов очистки, оказался буфер, содержащий Tris-HCl 50 mM, pH 8.

Осаждение полипептида проводили ступенчато, с насыщением от 10 до 60% сульфата аммония. При этом, фракции целевого белка с высоким уровнем чистоты были получены при 20% насыщения. При 30% насыщения сульфатом аммония так же наблюдали высокое содержание целевого белка, но уже с значительным количеством интерферирующих белков. Фракции 40%, 50% и 60% не содержали целевой белок. Далее полученные осадки ресуспендировали в буфере 20 мМ Tris-HCl, pH 8, фильтровали и подвергали хроматографической очистке.

Наличие His-тага в конструкции полипептида предполагало очистку при помощи аффинной Ni-NTA смолы. Однако, связывания с сорбентом не происходило, как при нативных, так и при денатурирующих условиях (8М мочевины).

Далее был протестирован протокол гельфильтрации (SEC). Для этого использовалась колонка XK16, заполненная 105 мл сорбента Superose™ 6 prep grade подключенная к системе AKTA Pure 25M FPLC. Хроматографию проводили без замены буфера, с использованием 20 мМ Tris-HCl, pH 8. Нанесение образца в объеме 5 мл производили при помощи петли для нанесения образца Superloop™ 1-10 мл. Были собраны фракции объемом 1,5-2 мл. Наличие целевого белка оценивали на белковом геле-электрофорезе. Фракции, содержащие целевой белок элюировались в диапазоне времен удержания от 40 до 50 минут (Рис. 1). Объем целевых фракций составлял 1:10 от объема сорбента. Отношение A260/280 у полученной фракции белок-нуклеинового комплекса составляло 2:1. Разделение белков с помощью SEC показало, что мы имеем дело с высокомолекулярными комплексами: целевой белок, имеющий электрофоретическую подвижность в районе 40 кДа элюируется в первых 0,4 объема колонки, что свидетельствует о высокой молекулярной массе.

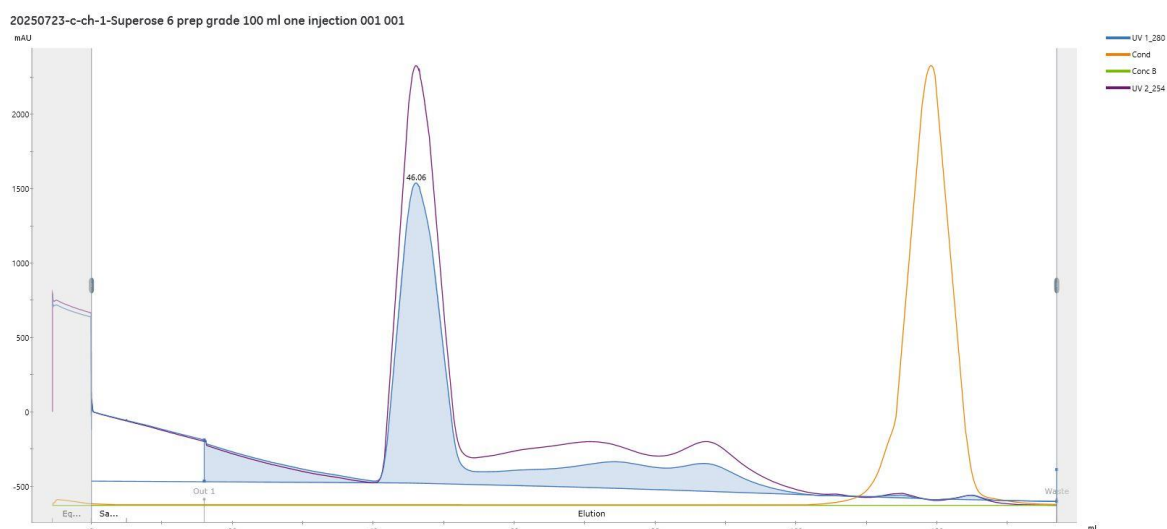


Рисунок 1 Хроматограмма, полученная методом гельфильтрации, используя фракцию белка, осажденную при 20% сульфата аммония.

Исследование смол ИЕХ и НИС: отсутствовало связывание с катионообменными (сильными и слабыми) и гидрофобными сорбентами. Для улучшения эффективности хроматографирования нуклеопротеиновых комплексов были испробованы дополнительные соединения: различные концентрации аргинина (от 0,1 до 0,4 М) и Triton X-100 (до 0,1%). Однако добиться существенных изменений не удалось. Связывание комплекса с анионитом через нуклеиновый компонент и градиентная элюция позволили получить фракцию с существенно сниженным содержанием нуклеиновых кислот.

Для уменьшения количества НК были протестированы условия осаждения хлоридом лития 2 М, но и этот протокол не дал положительных результатов, как и насыщение раствора до 4 М NaCl. Полученный супернатант после дезинтеграции дополнительно обрабатывался бензоназой (37°C, 1 ч). Отсутствие разрушения НК свидетельствует о том, что целевой полипептид защищает связанные НК от ферментативного разрушения посредством нуклеаз.

На основании полученных экспериментальных данных выдвинута гипотеза, что связывание полипептида с нуклеиновыми кислотами происходит уже внутри клетки в процессе синтеза. В результате

объектом очистки становятся не отдельные молекулы белка, а устойчивые нуклеопротеиновые комплексы, обладающие собственными зарядовыми и структурными характеристиками. Вероятно, сохранённая способность капсидных белков к димеризации и сильные электростатические взаимодействия обуславливают формирование сложных комплексов с нуклеиновыми кислотами.

Испытанные протоколы очистки показали, что традиционные подходы, основанные на теоретических характеристиках белка (Ni-NTA, катионообменная и гидрофобная хроматография), оказываются малоэффективными. Наиболее перспективным методом оказалось использование анионообменной хроматографии, где комплекс связывается с сорбентом через нуклеиновый компонент. Градиентная элюция позволила получить фракции целевого белка со значительно сниженным содержанием нуклеиновых кислот. Перспективными направлениями дальнейшей оптимизации остаются применение мультимодальной и гепарин-аффинной хроматографии, а также использование осаждения нуклеиновых кислот с полиэтиленимином (ПЭИ). Дополнительно показано, что стабильность нуклеопротеиновых комплексов зависит от концентрации NaCl в буфере: повышение ионной силы снижает их растворимость. Таким образом, доказано, что рекомбинантный химерный С-белок формирует прочные нуклеопротеиновые комплексы, и эффективная очистка требует использования подходов, нацеленных именно на разделение белка и нуклеиновых кислот.

Литература

1. Byk L.A., Gamarnik A.V. Properties and functions of the dengue virus capsid protein // Annual Review of Virology. 2016. Vol. 3. № 1. P. 263–281.
2. Gil L., Cobas K., Lazo L. et al. A tetravalent formulation based on recombinant nucleocapsid-like particles from dengue viruses induces a functional immune response in mice and monkeys // Journal of Immunology. 2016. Vol. 197. № 9. P. 3597–3606.
3. Jonsson C.B., Gallegos J., Fero P. et al. Purification and characterization of the Sin Nombre virus nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli* // Protein Expression and Purification. 2001. Vol. 23. № 1. P. 134–141.
4. Brudenell E.L., Pohare M.B., Zafred D. et al. Efficient overexpression and purification of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 nucleocapsid proteins in *Escherichia coli* // Biochemical Journal. 2024. Vol. 481. № 11. P. 669–682.
5. Chen C., Zhang Z., Zheng Q. et al. Purification and inhibitor screening of the full-length SARS-CoV-2 nucleocapsid protein // Journal of Immunology. 2025. Vol. 202. № 1. P. 1–10. doi: 10.4049/jimmunol.1600927

УДК 579.61+615.322

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-2-32-33>

СИНЕРГИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЛАВОНОИДОВ КВЕРЦЕТИНА И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА В СОЧЕТАНИИ С ПОЛИМИКСИНОМ В НА БИОПЛЕНКИ БАКТЕРИИ *METHYLOPHILUS QUAYLEI*

В.В. Покоева, А.Б. Пшеничникова

ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия

Способность бактерий проявлять резистентность или толерантность к антибиотикам – важнейшие механизмы эволюции, противостоять которым в контексте антибиотикотерапии можно только с привлечением вспомогательных веществ – адьювантов антибиотиков. Главной особенностью адьювантов является не столько антибиотическая активность, сколько способность нарушать системы антибиотикорезистентности или биопленкообразования. Растительный флавоноид кверцетин является адьювантом нескольких групп антибиотиков, среди которых – резервный антибиотик полимиксин В, обладающий высокой антибактериальной активностью, но в эффективных концентрациях высоко токсичный. Поскольку действующие концентрации возрастают для бактерий в составе биопленок целью настоящей работы явилась разработка антибиопленочного комплекса антибиотика полимиксина В и флавоноидов кверцетина или дигидрокверцетина.