

И.А.Баркова, В.В.Алексеев, А.В.Липницкий, А.М.Барков, Л.В.Буханцова

**ПРОДУКЦИЯ БЕЛКОВ S-СЛОЯ РАЗНЫМИ ШТАММАМИ *BACILLUS ANTHRACIS***

*ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»*

Цель исследования – антигенный анализ и определение принадлежности к S-слою идентичных по молекулярной массе белков, выделенных из культуральных фильтратов *B. anthracis*. Изучены антигенные свойства белков, продуцируемых штаммами *B. anthracis* СТИ (рХО1<sup>+</sup>, рХО2<sup>-</sup>), Davies (рХО1<sup>-</sup>, рХО2<sup>+</sup>), 81/1TR (рХО1<sup>-</sup>, рХО2<sup>-</sup>), которые элюировались в свободном объеме (фракция 1) при разделении культуральных фильтратов на сверхтонком сефакриле S-300. Показано, что сыворотки к фракциям 1 КФ штаммов *B. anthracis* СТИ, а также *B. anthracis* 81/1TR и Davies содержали антитела к неидентичным антигенам. Белки, идентифицированные с помощью сывороток, отнесены к антигенам S-слоя *B. anthracis* на основании м.м. 94 кДа, характерной для белков S-слоя, локализации на поверхностных структурах вегетативных клеток, а также независимости продукции от плазмид вирулентности.

*Ключевые слова:* *B. anthracis*, плазмиды вирулентности, культуральные фильтраты, гель-хроматография, белки S-слоя.

Штаммы *Bacillus anthracis* при культивировании в жидких питательных средах продуцируют большое количество белков, многие из которых кодируются хромосомой [7, 11].

К белкам, кодируемым хромосомой, относятся белки S-слоя – Sap (surface array protein) и EA1 (extractable antigen). Синтез белков S-слоя детерминирован хромосомными генами *sap* и *eag* и зависит от AtxA и PagR регулонов, расположенных на плазмиде рХО1. Поэтому рХО1<sup>+</sup> и рХО1<sup>-</sup> штаммы различаются по продукции белков S-слоя [13]. Белки Sap и EA1 последовательно присутствуют на клеточной поверхности *B. anthracis*. Совместное сосуществование обоих белков на клеточной поверхности возможно в момент начала синтеза EA1 и замещения Sap на EA1. В течение стационарной фазы роста замещение белков заканчивается выделением Sap в супернатант [12]. В культуральных супернатантах определяются оба белка, в отличие от EA1 белок Sap присутствует в значительном количестве [7, 11, 12].

В предыдущих работах мы сообщали о выделении белков, которые элюировались в свободном объеме (фракция 1) при разделении культуральных фильтратов (КФ) *B. anthracis* СТИ и 81/1TR на сверхтонком сефакриле S-300 [2, 3]. Сыворотка к белку фракции 1 (ФР1) КФ *B. anthracis* СТИ оказалась пригодной для дифференциации штаммов *B. anthracis* от спорообразующих бацилл [1, 3]. Принадлежность выделенных белков к антигенам S-слоя не изучалась.

Цель настоящей работы – антигенный анализ и определение принадлежности к S-слою идентичных по молекулярной массе белков, выделенных из культуральных фильтратов штаммов *B. anthracis*.

**Материалы и методы**

В качестве штаммов-продуцентов белков S-слоя

изучены: *B. anthracis* СТИ (рХО1<sup>+</sup>, рХО2<sup>-</sup>) – одноплазмидный токсинпродуцирующий штамм; *B. anthracis* Davies (рХО1<sup>-</sup>, рХО2<sup>+</sup>) – одноплазмидный капсулообразующий штамм (коллекция патогенных бактерий Волгоград НИПЧИ); *B. anthracis* 81/1 TR (рХО1<sup>-</sup>, рХО2<sup>-</sup>) – бесплазмидный штамм, полученный температурной элиминацией плазмид [10]. Для определения независимости синтеза белков S-слоя от плазмид вирулентности использованы варианты типичного вирулентного штамма *B. anthracis* 81/1 – *B. anthracis* 81/1R (рХО1<sup>+</sup>, рХО2<sup>-</sup>), *B. anthracis* 81/1TR (рХО1<sup>-</sup>, рХО2<sup>-</sup>).

Бесклеточные КФ получали на R-среде, рН 8,0–8,3 [14] и R-среде, обогащенной казаминовыми кислотами («Difco», США) из расчета 4 г на 1 л питательной среды. Получение бесклеточных КФ и выделение из них белков гель-хроматографией на сверхтонком сефакриле S-300 при λ=280 нм [2]. Белки КФ осаждали ацетоном. Для этого соединяли равные объемы (по 0,3 мл) охлажденного ацетона и КФ, выдерживали 16 ч при 2 °С, центрифугировали при 12000 об/мин, 5 мин (центрифуга «Sigma 202M»). К осадку добавляли экстрагирующий буфер, состоящий из 5 мМ трис-гидрохлорида, 5 мМ 2-меркаптоэтанола, 1 % SDS (рН 9,8), из расчета 10 мкл на 1 мг осадка, прогревали 30 мин при 70 °С, хранили в замороженном состоянии до использования.

Концентрацию белка в КФ и его фракциях, в сыворотках и выделенных из них иммуноглобулинах определяли на спектрофотометре «Perkin-Elmer 550» при λ=280 нм.

Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН и иммуноблоттинг проводили по методике, изложенной в руководстве «Hoefler Scientific Instruments 1988–1989». San Francisco, California.

Электрофореграммы белков окрашивали Ку-масси R-250 («Serva»). Для определения молекуляр-

ной массы белков применяли маркеры фирмы «Хеликон», Россия (м.м. 14,4–97 кДа). Молекулярную массу белков определяли по электрофоретической подвижности с использованием компьютерной программы «LabImage». Иммуноблоты инкубировали с антикродичьими пероксидазными конъюгатами («Медгамал», Россия), визуализировали О-диаминобензидином («Serva»). Электрофореграммы и иммуноблоты сканировали или фотографировали цифровой камерой «Dimage 323 Konica» (Китай).

Сыворотки к фракциям получали иммунизацией кроликов и изучали в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) и в реакции иммунодиффузии с антигенами растущих культур (РИД РК) [3].

Иммуноглобулины сывороток выделяли полиэтиленгликолем, метили флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), использовали в методе флуоресцирующих антител (МФА) [6].

### Результаты и обсуждение

Жидкая питательная R-среда была выбрана для получения внеклеточных антигенов в связи с тем, что она обеспечивает не только внутриклеточный синтез белка, но и выделение его во внеклеточное пространство. Кроме того, высокий показатель рН 8,2–8,4 снижает действие протеаз [14]. Однако такая среда оказалась малопродуктивной для выделения белка S-слоя, который продуцировался в значительно большем количестве при выращивании токсинпродуцирующего и бесплазмидного штам-

мов *B. anthracis* Sterne в богатой питательной среде, включающей дрожжевой экстракт и триптон [9]. Обогащение дрожжевым экстрактом R-среды обуславливало более высокую продукцию белков *B. anthracis*, однако при фракционировании культуральных фильтратов исключалась регистрация отдельных компонентов в связи с элюцией пигмента в объемах выхода всех фракций. Поэтому для выделения протективного антигена мы использовали R-среду, а для выделения белков S-слоя – R-среду, обогащенную казаминовыми кислотами. Концентрированные на ультрафильтрах HLP10 и PM10 КФ оказались пригодными для фракционирования.

При фракционировании КФ штаммов *B. anthracis* СТИ, 81/1TR, Davies на сверхтонком сефакириле S-300 обращало внимание наличие сходных по м.м. белков, которые элюировались в свободном объеме – фракция 1. Профиль хроматограмм трех культуральных фильтратов обусловлен межштаммовыми различиями *B. anthracis*, одним из которых может быть содержание в штамме плазмид вирулентности (рис. 1).

Для КФ бесплазмидного штамма *B. anthracis* 81/1TR белок ФР1 был доминирующим. Белки других фракций содержались в незначительном количестве и выявлялись непостоянно. При разделении 15 мл этого КФ с концентрацией белка 10,9 мг/мл получена фракция 1 объемом 11 мл с концентрацией белка 1,2 мг/мл. Для КФ капсулообразующего штамма *B. anthracis* Davies доминирующими также были белки ФР1, которые элюировались в виде трех не разделившихся пиков. Кроме белков ФР1, в КФ *B. anthracis* Davies содержались белки меньшей м.м., которые в отличие от КФ *B. anthracis* 81/1TR постоянно регистрировались в виде фракций 2, 3, 4, 6. При разделении 15 мл КФ *B. anthracis* Davies с концентрацией белка 12,8 мг/мл получали 10,5 мл ФР1 с концентрацией белка 1,2 мг/мл. Выход белков ФР1 КФ *B. anthracis* СТИ был значительно ниже, чем фракций 1 КФ *B. anthracis* Davies и *B. anthracis* 81/1TR. С увеличением посевной дозы до  $1 \cdot 10^4$  –  $1 \cdot 10^5$  м.к./мл выход белка ФР1 КФ *B. anthracis* СТИ увеличивался более чем в 2 раза. Из 15 мл КФ *B. anthracis* СТИ с концентрацией белка 10,5 мг/мл (посевная доза  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл) и 12,5 мг/мл (посевная доза  $2 \cdot 10^4$  м.к./мл) получали по 10 мл ФР1 с концентрацией белка соответственно 0,110 и 0,280 мг/мл. Фракция 3 КФ *B. anthracis* СТИ элюировалась в объеме ферритина (м.м. 440 кДа) [9]. Концентрация белка во ФР3 КФ *B. anthracis* СТИ существенно не зависела от посевной дозы и составила, соответственно, 0,750 мг/мл и 0,780 мг/мл.

Особенностью КФ токсинпродуцирующего штамма *B. anthracis* СТИ было наличие в нем доминирующего белка, который элюировался как ФР5. По объему выхода маркерных белков и биологическим свойствам ФР5 охарактеризована как протективный антиген [2]. Выход белков ФР5 существенно не зависел от посевной дозы. Концентрация белка в исходном КФ составила 1,5 мг/мл при посевной дозе  $1 \cdot 10^3$  и 1,7 мг/мл при посевной дозе  $2 \cdot 10^4$  м.к./мл. По-

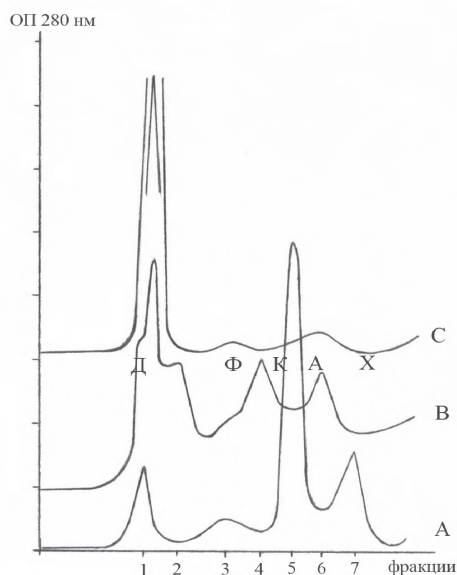


Рис. 1. Хроматограммы культуральных фильтратов штаммов *B. anthracis*:

А – культуральный фильтрат *B. anthracis* СТИ; В – культуральный фильтрат *B. anthracis* Davies; С – культуральный фильтрат *B. anthracis* 81/1 TR. Объем геля  $2 \times 72$  см; объемы культуральных фильтратов, наносимых на гель, 2,5 мл; скорость элюирования 25 мл/ч, объем одной пробирки 1 мл. Элюирование маркеров: Д – декстран голубой (81 проб.), Ф – ферритин (114 проб.), К – каталаза (128 проб.), А – альбумин бычий (141 проб.), Х – химотрипсिन (165 проб.).

лученные результаты подтвердили целесообразность использования для выделения ПА посевной дозы  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл, которая обуславливала преимущественное содержание его в КФ относительно других белков, продуцируемых *B. anthracis* СТИ.

Для получения сывороток использованы фракции 1, поскольку сыворотка к фракции 1 КФ *B. anthracis* СТИ характеризовалась видоспецифичностью и позволяла идентифицировать штаммы *B. anthracis* в РИДРК [2].

При изучении специфичности сывороток в РИДРК установлено, что сыворотка к ФР1 КФ *B. anthracis* СТИ реагировала с антигеном, не идентичным антигену, выявляемому сыворотками к ФР1 КФ *B. anthracis* 81/1TR и Davies, а также сывороткой к ФР3 КФ *B. anthracis* СТИ (рис. 2). Это свидетельствовало о наличии в КФ белков с одинаковой молекулярной массой, но с различными антигенными свойствами, а также белков с различной молекулярной массой, но с одинаковыми антигенными свойствами [11].

Электрофоретический анализ показал, что культуральные фильтраты *B. anthracis*, 81/1TR, Davies и экстракт клеток *B. anthracis* СТИ содержали преимущественно белки с м.м. 94 кДа, характерной для белков S-слоя. Культуральный фильтрат *B. anthracis* СТИ содержал преимущественно белок с м.м. 84 кДа, характерной для протективного антигена, а также белки м.м. 51, 41, 22 кДа, которые, возможно, являются фрагментами протективного антигена, образовавшимися в результате действия собственных протеаз микроорганизма (рис. 3) [5].

В иммуноблоттинге сыворотки к белкам фракций 1 культуральных фильтратов бесплазмидного и токсинпродуцирующего штаммов выявляли белки м.м. 94 кДа, характерной для белков S-слоя, которые выделены из культуральных фильтратов (белок Sap) [4, 9] и экстрагированы из клеток (белок EA1) [8]. Следовательно, культуральные фильтраты и экстрак-

ты клеток содержали оба белка S-слоя.

Это позволяет предположить, что основным белком фракции 1 КФ штамма *B. anthracis* 81/1TR является белок Sap, а *B. anthracis* СТИ – EA1, так как в рХО1<sup>-</sup> штаммах белок EA1 является основным антигеном S-слоя, так как ген *atxA* плазмиды рХО1 репрессировывает ген *sap*. В рХО1<sup>-</sup> и бесплазмидных штаммах репрессия гена *sap* исключается, что приводит к резкому увеличению продукции белка Sap [13].

Сыворотка к фракции 5 токсинпродуцирующего штамма выявляла белок м.м. 84 кДа, отсутствовавший в экстрактах клеток штаммов *B. anthracis* СТИ, 81/1TR, а также белки м.м. 94 кДа, которые при электрофорезе в культуральном фильтрате *B. anthracis* СТИ практически не определялись. Это свидетельствовало о содержании в сыворотке антител к ПА и к белкам S-слоя (рис. 3).

В РИДРК с изогенными штаммами *B. anthracis* сыворотки к белкам фракций 1 культуральных фильтратов бесплазмидного и токсинпродуцирующего штаммов выявляли сибиреязвенные антигены, продукция которых не зависела от плазмид вирулентности. Синтез белков S-слоя детерминирован хромосомными генами, что не исключало принадлежность белков фракций 1 к антигенам S-слоя [13].

Меченные ФИТЦ иммуноглобулины сывороток к фракциям 1 КФ *B. anthracis* 81/1TR, СТИ, Davies в разведении 1:16 – 1:32 окрашивали вегетативные клетки и споры *B. anthracis* 81/1. Специфическое окрашивание вегетативных клеток и спор подтверждало принадлежность выявляемых антигенов к поверхностным структурам, одной из которых может быть белок EA1. Хотя белок EA1 не является антигеном спор, он может присутствовать в препаратах

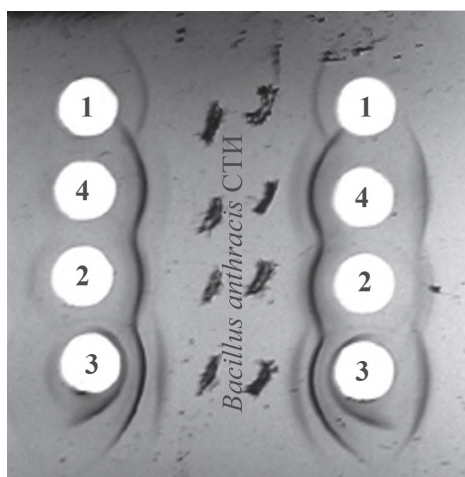


Рис. 2. РИДРК антигенов *B. anthracis* СТИ с сыворотками к фракциям культуральных фильтратов штаммов *B. anthracis*:

1, 2, 3 – соответственно сыворотки к фракциям 1 культуральных фильтратов *B. anthracis* СТИ, 81/1TR, Davies; 4 – сыворотка к фракции 3 культурального фильтрата *B. anthracis* СТИ

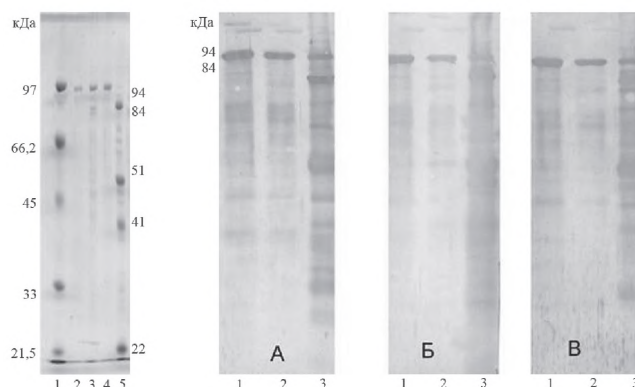


Рис. 3. Электрофорез и иммуноблоттинг белков культуральных фильтратов:

Электрофорез: 1 – маркеры (97 кДа – фосфоорилаза В; 66,2 кДа – бычий сывороточный альбумин; 45 кДа – овалбумин; 33 кДа – карбоангидраза; 21,5 кДа – ингибитор трипсина); 2 – экстракт клеток *B. anthracis* СТИ. Белки культуральных фильтратов штаммов: 3 – *B. anthracis* Davies; 4 – *B. anthracis* 81/1TR; 5 – *B. anthracis* СТИ. Иммуноблоттинг: А – с сывороткой к фракции 5 культурального фильтрата *B. anthracis* СТИ; Б – с сывороткой к фракции 1 культурального фильтрата *B. anthracis* 81/1 TR; В – с сывороткой к фракции 1 культурального фильтрата *B. anthracis* СТИ. 1 – экстракт клеток *B. anthracis* 81/1 TR; 2 – экстракт клеток *B. anthracis* СТИ; 3 – белки культурального фильтрата *B. anthracis* СТИ

спор как постоянный контаминант [15].

Таким образом, штаммы *B. anthracis* с разным содержанием плазмид вирулентности при выращивании в питательной R-среде, обогащенной казаминовыми кислотами, продуцировали идентичные по молекулярной массе белки, которые при фракционировании культуральных фильтратов на сефакиле S-300 элюировались в свободном объеме. Сыворотки к этим белкам содержали антитела к антигенам, продукция которых не зависела от плазмид вирулентности, реагировали с поверхностными структурами вегетативных клеток, с белками с м.м. 94 кДа культуральных фильтратов и клеточных экстрактов, что явилось основанием считать выделенные белки антигенами S-слоя.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барков А.М., Липницкий А.В., Евтеева Е.В. Способ получения сыворотки для идентификации возбудителя сибирской язвы. Патент на изобретение № 2191603 от 27.10.2002 г.
2. Баркова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М., Евтеева Е.В. Использование иммуноглобулинов к отдельным внеклеточным антигенам *Bacillus anthracis* СТИ для идентификации сибиреязвенного микроба. Биотехнология. 2005; 2:91–5.
3. Ермакова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М., Евтеева Е.В. Способ выделения высокомолекулярного соматического сибиреязвенного антигена. Патент на изобретение № 2230570 от 20.06.2004 г.
4. Микшиц Н.И., Корсакова А.Ю., Болотникова М.Ф. и др. Продукция белков S-слоя штаммами *Bacillus anthracis*. Биотехнология. 2004; 5:22–3.
5. Носков А.Н., Кравченко Т.Б., Носкова В.П. Выявление функционально-активных доменов в молекулах протективного антигена и летального фактора сибиреязвенного экзотоксина. Вестник РАМН. 1997; 6:20–4.
6. Шаханова К.Л. Приготовление люминисцирующих антител. Иммунология в медицине. Под ред. Левиной Е.Н. М.: Медицина; 1977. 237 с.
7. Chittlaru T., Gat O. Differential proteomic analysis of the *Bacillus anthracis* secretome: distinct and chromosome CO<sub>2</sub>-dependent cross talk mechanisms modulate extracellular proteolytic activities. J. Bacteriol. 2006; 188(10):3551–71.
8. Ezzel J., Abshire T. Immunological analysis of cell associated antigens of *Bacillus anthracis*. Infect. Immun. 1988; 56:349–56.
9. Farchaus J.B., Ribot W.J., Downs M., Ezzel J.W. Purification

and Characterization of the major surface array protein from the avirulent *Bacillus anthracis* Delta Sterne-1. J. Bacteriol. 1995; 177(9):2481–9.

10. Green B.D., Laurie Battisti, Kochler T.M. et al. Demonstration of capsule in *B. anthracis*. Infect. Immun. 1985; 49(2):291–7.
11. Lamonica J.M., Wagner M.A., Echenbrenner M. Comparative secretome analyses of the *Bacillus anthracis* strains with variant plasmid contents. Infect. Immun. 2005; 73(6):3646–58.
12. Mignot T., Mesnage S., Counture-Tosi E. et al. Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. Mol. Microbiol. 2002; 43:1615–28.
13. Mignot T., Mock M., Fouet A. A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxin and surface structures in *Bacillus anthracis*. Mol. Microbiol. 2003; 47(4):917–27.
14. Ristroph J.D., Ivins B. Elaboration of *Bacillus anthracis* antigens in new, defined culture medium. Infect. Immun. 1989; 59(1):483–6.
15. Williams D., Turnbough C. Surface layer protein EA1 is not a component of *Bacillus anthracis* spores but is a persistent contaminant in spore preparations. J. Bacteriol. 2004; 186(2):566–9.

I.A. Barkova, V.V. Alexeev, A.V. Lipnitsky, A.M. Barkov, L.V. Bukhantsova

#### Production of S-layer proteins by Different *Bacillus anthracis* Strains

Volgograd Research Anti-Plague Institute

Investigated were antigenic properties of proteins produced by *B. anthracis* strains STI (pXO1<sup>+</sup>, pXO2<sup>-</sup>), Davies (pXO1<sup>-</sup>, pXO2<sup>+</sup>), 81/1TR (pXO1<sup>-</sup>, pXO2<sup>-</sup>), eluted in void volume (fraction 1) at division of cultural filtrates (CF) on superfine sefacyl S-300. Sera to fractions 1 of *B. anthracis* STI, 81/1TR and Davies CF were shown to contain antibodies to different antigens. The proteins identified with the help of sera were referred to antigens of *B. anthracis* S-layer relating on м.м. 94 kDa, characteristic for S-layer proteins, localization on superficial cell structure, and independence of their production from virulence plasmids.

*Key words:* *B. anthracis*, virulence plasmids, cultural filtrates, gel chromatography, S-layer proteins.

#### Об авторах:

Баркова И.А. (н.с.), Алексеев В.В. (директор), Липницкий А.В. (зам. директора), Барков А.М. (с.н.с.), Буханцова Л.В. (н.с.). Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, д. 7. Тел.: (844-2) 37-33-65. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 10.07.08.