

Т.Л.Захарова, Е.А.Михеева, Н.А.Осина

**НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННОЙ В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К НЕЙ***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Представлен эффективный способ получения В-субъединицы холерного токсина, преимуществом которого является относительная простота и экономичность, а также максимальный выход очищенной В-субъединицы, полностью лишенной примеси токсичной субъединицы А. Это достигается использованием рекомбинантного штамма холерного вибриона, продуцирующего вместо холерного токсина только его В-субъединицу, благодаря чему выделяемый препарат не обладает остаточной токсичностью. В данной работе мы использовали метод колоночной гельпроникающей хроматографии, который обеспечивает сохранение стабильного нативного состояния и максимальный выход антигена. Предлагаемый способ был отработан опытным путем, в процессе которого после каждого этапа колоночной гель-хроматографии на TSK-геле HW-60 чистоту образца анализировали с помощью диск-электрофореза, в результате чего выяснили, что трех ступеней очистки достаточно для получения лишенного примесей препарата В-субъединицы холерного токсина. Иммунологическая активность очищенной В-субъединицы подтверждена получением моноклональных антител. Полученный препарат В-субъединицы холерного токсина и моноклональные антитела к ней могут служить основой конструирования различных вариантов иммунодиагностических тест-систем.

*Ключевые слова:* В-субъединица холерного токсина, гель-хроматография, *Vibrio cholerae*.

T.L.Zakharova, E.A.Mikheeva, N.A.Osina

**New Advantageous Method for the Production of Purified Cholera Toxin B-Subunit and Monoclonal Antibodies to It***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Put forward is an efficient method for manufacturing cholera toxin B-subunit. Its advantages are relative simplicity and economy feasibility, as well as maximum output of the purified B-subunit, absolutely free from toxic A-subunit contaminant. All this is due to the deployment of cholera vibrio recombinant strain producing only cholera toxin B-subunit instead of cholera toxin as it is, which results in lack of residual preparation toxicity. Applied has been gel-penetration column chromatography, providing for stable native state and maximum antigen output. The method under discussion is verified experimentally. Sample purity has been analyzed after each phase of chromatographic investigation on TSK gel HW-60, using disc electrophoresis. It is established that three steps of purification are ample for the obtainment of cholera toxin B-subunit preparation free from admixtures. Immunological activity of the purified B-subunit is validated by monoclonal antibody obtainment. Designed preparation of cholera toxin B-subunit and monoclonal antibodies to it can serve as a basis for the development of various immune-diagnostic test-systems alternatives.

*Key words:* cholera toxin B-subunit, gel-penetration column chromatography, *Vibrio cholerae*.

Исследования, направленные на получение эффективных средств диагностики и профилактики холеры, в настоящее время являются весьма актуальными в связи с заметным ухудшением эпидемической ситуации и угрозой распространения этой инфекции в мире. Одним из наиболее сильнодействующих иммуногенов является холерный энтеротоксин [13], имеющий субъединичную структуру. Его молекула состоит из пяти идентичных В-субъединиц с молекулярной массой 11,6 кДа и одной А-субъединицы с молекулярной массой 27,2 кДа [14]. Известно, что основным фактором иммуногенности, обеспечивающим формирование антитоксического иммунитета при холере, является В-субъединица холерного токсина, что позволяет использовать ее в качестве иммунизирующего агента при создании эффективных профилактических и диагностических препаратов [5, 6]. Не обладая токсической активностью, она способна специфически адсорбироваться на поверхности тонкого кишечника и стимулировать локальный иммун-

ный ответ [5]. При иммунизации холерным токсинотоксиннейтрализующие антитела образуются преимущественно к В-субъединице [6, 9]. Поэтому живые холерные вакцины конструируют на основе штаммов, содержащих лишь структурный ген *ctxB*, контролирующей синтез В-субъединицы холерного токсина, а к убитым вакцинам добавляют очищенную В-субъединицу [16]. Очищенная В-субъединица используется для получения антитоксических сывороток, высокоспецифических иммуноглобулинов и диагностических тест-систем. Современная тенденция развития вакцинопрофилактики характеризуется получением вакцин с химически определенным составом и регулируемой иммуногенностью, новыми повышенными требованиями к безвредности и чистоте антигенных препаратов.

Новые требования к качеству антигенных препаратов предполагают поиск наиболее совершенных технологических методов их выделения. В связи с этим очевидна необходимость разработки

эффективных способов получения В-субъединицы холерного токсина – важнейшего холерного протективного антигена.

Традиционный способ получения В-субъединицы основан на выделении ее из очищенного холерного токсина с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75 [12]. При этом разделение токсина на субъединицы происходит в кислой среде (рН 3,2) в присутствии мочевины в высокой концентрации, что приводит к денатурации белка и требует последующего ренатурации и диализа, в результате чего происходит частичная утрата нативных иммуногенных свойств В-субъединицы. Известен также распространенный способ очистки В-субъединицы из холерного токсина с помощью аффинной хроматографии с использованием колонки лизо-GM<sub>1</sub>-ганглиозида [8]. Упомянутые способы являются трудоемкими и многоэтапными процессами, требующими наличия дорогостоящих хроматографических сорбентов, реактивов и оборудования. Кроме того, препараты В-субъединицы обладают остаточной токсичностью из-за присутствия в них примесей субъединицы А. Следует отметить также, что эти способы подразумевают предварительное получение очищенного холерного токсина. Это не требуется при предлагаемом нами использовании рекомбинантного штамма, продуцирующего вместо холерного токсина только его В-субъединицу, благодаря чему выделяемый препарат не обладает остаточной токсичностью, так как в нем полностью отсутствует примесь субъединицы А.

Ранее нами было описано получение очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма, лишенного продукции субъединицы А, при котором основная стадия очистки осуществляется с помощью ионообменной хроматографии на колонке с фосфоцеллюлозой [2]. Недостатком метода является то, что только небольшая часть от исходной концентрации В-субъединицы связывается с катионообменником в процессе хроматографии, а большее количество антигена утрачивается.

Целью нашего исследования являлась разработка экономичного и эффективного способа получения высокоочищенной нативной иммуногенной В-субъединицы холерного токсина и моноклональных антител к ней.

### Материалы и методы

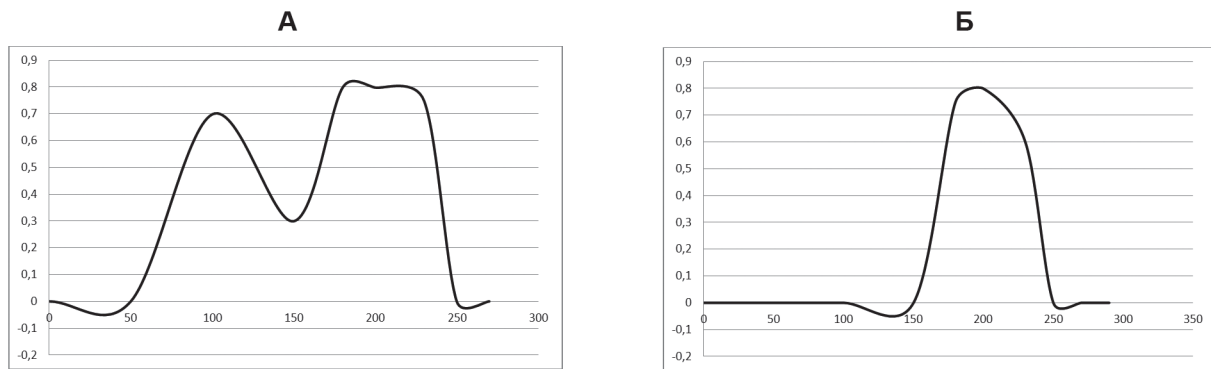
В работе использован штамм не O1 серогруппы *V. cholerae* KM93 (депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб»), содержащий гибридную плазмиду pIEM3 с клонированными генами *vctB*, детерминирующими синтез В-субъединицы холерного токсина [4]. Источником В-субъединицы служил фильтрат бульонной культуры указанного штамма, выращенного в реакторе методом глубинного культивирования в условиях аэрации.

Белковые фракции из фильтрата осаждали в

присутствии 0,25 % гексаметафосфата натрия при рН 4,0, перемешивая в течение 2 ч при комнатной температуре. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0). Препарат диализовали против 50 объемов 0,007 М фосфатного буфера (рН 7,0) в течение 24 ч, нерастворимые примеси удаляли центрифугированием. Полученный образец подвергали гельпроникающей хроматографии на колонке с TSK HW-60 в три степени, элюцию осуществляли фосфатным буфером (0,007 М) при рН 7,0. Собранные фракции спектрофотометрировали при 280 нм и анализировали в реакции иммунодиффузии (РИД) [15] с антисывороткой к В-субъединице холерного токсина. Фракции, содержащие В-субъединицу, объединяли, концентрировали, вновь наносили на колонку и повторяли процедуру до полной очистки В-субъединицы. Для этого потребовалось три этапа очистки на TSK-геле HW-60. Полученный препарат диализовали в течение 48 ч против 50 объемов 0,9 % хлорида натрия, разливали по 1 мл в ампулы и лиофильно высушивали. Содержание белка определяли методом Лоури. Специфическую активность оценивали по титру реакции иммунодиффузии в геле с антитоксической сывороткой методом O. Ouchterlony [15] в его количественной модификации. Чистоту препарата В-субъединицы анализировали в сравнении с коммерческой В-субъединицей холерного токсина («Serva») в диск-электрофорезе в полиакриламидном геле по методу U.K. Laemmli [11]. Остаточную токсичность определяли в каждой пробе Крейга [7]. Моноклональные антитела к полученной В-субъединице получали с помощью гибридомной технологии [10].

### Результаты и обсуждение

В данной работе мы предлагаем использовать метод колоночной гельпроникающей хроматографии, который обладает высокой механической стабильностью и обеспечивает высокоскоростное выделение антигена при минимальном разведении образца. Таким образом, достигается максимальный выход очищенной В-субъединицы из общей белковой фракции. Преимуществом метода гельпроникающей хроматографии по сравнению с ионообменной, предлагаемой нами ранее [2], является также относительная простота исполнения и сохранение стабильного нативного состояния антигена. Предлагаемый способ отработан опытным путем, в процессе которого после каждого этапа колоночной гель-хроматографии на TSK HW-60 чистоту образца анализировали с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле, в результате чего выяснили, что трех ступеней очистки достаточно для получения лишенного примесей препарата В-субъединицы холерного токсина. На первом этапе очистки В-субъединица обнаруживалась в начальной половине второго пика профиля элюции (рисунок, А). Фракции, содержащие



Очистка В-субъединицы холерного токсина на колонке TSK HW-60:

**А** – первый этап очистки, **Б** – третий этап очистки. По оси ординат – оптическая плотность при 280 нм, по оси абсцисс – объем элюата в мл

В-субъединицу, объединяли, концентрировали и вновь наносили на колонку. Процедуру повторяли до тех пор, пока В-субъединица не сходила с колонки одним самостоятельным пиком (рисунок, Б). Для этого потребовалось три этапа очистки на TSK-геле HW-60. По разработанному способу получен патент на изобретение [1].

Выход очищенной В-субъединицы от общего количества белка в исходном препарате составил 25 %. В препарате содержится 200 мкг/мл белка (по методу Лоури). По данным диск-электрофореза, в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в конечном препарате обнаруживается одна белковая полоса, идентичная по расположению полосе коммерческой В-субъединицы холерного токсина с молекулярной массой 58 кДа, отсутствуют другие примеси, что является свидетельством гомогенности и чистоты. По титру специфической активности, оцениваемой в реакции иммунодиффузии по Оухтерлони [15], полученный препарат также не отличается от коммерческой В-субъединицы и от В-субъединицы, выделенной нами ранее из целого токсина методом С.У.Лаи [12]. В кожной пробе Крейга на остаточную токсичность очищенная предлагаемым способом В-субъединица не вызывала образование инфильтрата, что указывает на полное отсутствие в ней фактора кожной проницаемости – субъединицы А.

Иммунологическая активность очищенной В-субъединицы подтверждена получением моноклональных антител. Для этого с помощью гибридной технологии [10] получены и отобраны диагностически значимые гибридомы-продуценты моноклональных антител к В-субъединице ХТ. При культивировании клонов *in vivo* асцитобразование происходило в одни и те же сроки (на 9–10-й день). Независимо от числа пассажей в мышах BALB/c титры моноклональных антител в иммуноферментном анализе находились на одном уровне – от (2432±405) до (2688±944). В среднем объем иммуноасцитической жидкости от одной мыши составил 6,5–7,0 мл при концентрации клеток 7–8·10<sup>6</sup> м.к./мл. Стабильность антителопродукции после длительной криоконсервации гибридом не снижалась.

Эти данные свидетельствуют о возможности использования полученных клонов, продуцирующих моноклональные антитела к В-субъединице холерного токсина, для конструирования различных вариантов иммунодиагностических тест-систем на их основе, для детекции токсигенных штаммов холерного вибриона.

Впоследствии была проведена комплексная иммунобиологическая оценка действия препаратов В-субъединицы ХТ, полученных различными способами. Показано, что препараты не токсичны для биомоделей, не оказывают на их органы и ткани патологического действия, не вызывают изменений в состоянии иммунокомпетентных клеток на различных стадиях клеточного цикла, инициируют синтез антител к В-субъединице ХТ. Установлено, что наибольшей протективной активностью обладает препарат, полученный описанным способом [3].

Таким образом, основным результатом работы является получение простым и экономичным способом очищенного гомогенного препарата В-субъединицы холерного токсина с сохранением нативных свойств, не обладающего остаточной токсичностью, и пригодное на его основе моноклональных антител.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захарова Т.Л., Киреев М.Н., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Способ получения очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма *Vibrio cholerae*. Патент 2456996 РФ, опубл. 27.07.2012. Бюл. № 21.
2. Захарова Т.Л., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Получение очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма *Vibrio cholera*. *Биотехнология*. 2003; 5:53–6.
3. Клюева С.Н., Щуковская Т.Н., Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Захарова Т.Л., Белякова Н.И., Еремин С.А., Никифоров А.К. Иммунобиологическая характеристика В-субъединицы холерного токсина. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 3(113):67–70.
4. Смирнова Н.И., Крепостнова И.М., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Еремин С.А., Ильина Т.С. Авирулентный штамм *Vibrio cholera* – продуцент В-субъединицы холерного токсина: получение и молекулярно-генетический анализ. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2007; 4:7–13.
5. Янишевский Н.В., Гиндбург А.Л., Вертиев Ю.В., Демме Ю.М., Каратаев Г.И., Смирнов Г.Б. Конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих биосинтез В-субъединицы холерного токсина. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 1987; 4:26–32.

6. Black R.E., Levine M.M., Clements M.L. Protective efficacy in humans of killed whole-vibrio oral cholera vaccine with and without the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun.* 1987; 5:1116–20.

7. Craig J.P. Cholera toxins. In: Microbial toxins. New York: Academic Press; 1971. Vol. 2A. P. 189–254.

8. Dertzbaugh M.T., Macrina F.L. Cholera toxin B-subunit gene fusion: Structure and functional analysis of the chimeric protein. *Infect. Immun.* 1990; 58(1):70–9.

9. Finkelstein R.A. The cholera enterotoxins and the cholera toxin-related enterotoxins : from the beginning to the present. Bacterial Protein Toxins. *Zbl. Bakt. Suppl.* 1992; 23:161–71.

10. Galfré G. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature.* 1977; 266:550–2.

11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680–5.

12. Lai C.Y., Mendez E., Chang D. Chemistry of cholera toxin: the subunit structure. *J. Infect. Dis.* 1976; 133:23–30.

13. Lycke N., Holmgren J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune response to orally presented antibodies. *Immunology.* 1986; 59:301–8.

14. Nursin S., Khan Y.K., Bhuiyan N.A. Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholerae is endemic in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(12):5854–6.

15. Ouchterlony O. Antigens antibody reactions on gels. *Act. Pathol. Microbiol. Scand.* 1949; 26:207–12.

16. Taylor D.N., Cardenas V., Sanchez J.L. Two year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit cholerae vaccine in Peru. *J. Infect. Dis.* 2000; 181:667–73.

#### References

1. Zakharova T.L., Kireev M.N., Livanova L.F., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Method for the production of purified cholera toxin B-subunit from recombinant *Vibrio cholerae* strain]. RF Patent 2456996, 27.07.2012.

2. Zakharova T.L., Livanova L.F., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Obtainment of purified cholera toxin B-subunit from recombinant *Vibrio cholerae* strain]. *Biotekhnologia.* 2003; 5:53–6.

3. Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Shmel'kova T.P., Kravtsov A.L., Zakharova T.L., Belyakova N.I., Eremin S.A., Nikiforov A.K. [Immunobiological characteristics of cholera toxin B-subunit]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 3(113):67–70.

4. Smirnova N.I., Krepostnova I.M., Livanova L.F., Zadnova S.P., Eremin S.A., Il'ina T.S. [Avirulent *Vibrio cholerae* strain – producer of cholera toxin B-subunit: construction and molecular-genetic analysis]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2007; 4:7–13.

5. Yanishevsky N.V., Gintsburg A.L., Vertiev Yu.V., Demme Yu.M., Karataev G.I., Smirnov G.B. [Constructing of recombinant plasmids, encoding cholera toxin B-subunit biosynthesis]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 1987; 4:26–32.

6. Black R.E., Levine M.M., Clements M.L. Protective efficacy in humans of killed whole-vibrio oral cholera vaccine with and without the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun.* 1987; 5:1116–20.

7. Craig J.P. Cholera toxins. In: Microbial toxins. New York: Academic Press; 1971. Vol. 2A. P. 189–254.

8. Dertzbaugh M.T., Macrina F.L. Cholera toxin B-subunit gene fusion: Structure and functional analysis of the chimeric protein. *Infect. Immun.* 1990; 58(1):70–9.

9. Finkelstein R.A. The cholera enterotoxins and the cholera toxin-related enterotoxins : from the beginning to the present. Bacterial Protein Toxins. *Zbl. Bakt. Suppl.* 1992; 23:161–71.

10. Galfré G. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature.* 1977; 266:550–2.

11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680–5.

12. Lai C.Y., Mendez E., Chang D. Chemistry of cholera toxin: the subunit structure. *J. Infect. Dis.* 1976; 133:23–30.

13. Lycke N., Holmgren J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune response to orally presented antibodies. *Immunology.* 1986; 59:301–8.

14. Nursin S., Khan Y.K., Bhuiyan N.A. Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholerae is endemic in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(12):5854–6.

15. Ouchterlony O. Antigens antibody reactions on gels. *Act. Pathol. Microbiol. Scand.* 1949; 26:207–12.

16. Taylor D.N., Cardenas V., Sanchez J.L. Two year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit cholerae vaccine in Peru. *J. Infect. Dis.* 2000; 181:667–73.

#### Authors:

Zakharova T.L., Mikheeva E.A., Osina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Захарова Т.Л., Михеева Е.А., Осина Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 29.08.14.