

С.А.Еремин, Н.И.Микшис, О.А.Волох, О.М.Кудрявцева, И.А.Шепелев, А.Ю.Гончарова,  
Ю.А.Попов, А.К.Никифоров

## ИЗУЧЕНИЕ БИОКИНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АСПОРОГЕННОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Рекомбинантный штамм *Bacillus anthracis* 55ΔТПА-1Sp<sup>o</sup> при пассировании *in vitro* сохраняет свойство аспорогенности и способность к репликации гибридной плазмиды. Синтез иммуногенного белка генно-инженерным продуцентом не зависит от содержания в атмосфере CO<sub>2</sub>. Определены условия культивирования аспорогенного штамма для увеличения продукции протективного антигена. Использование в технологическом процессе не образующего спор штамма *B. anthracis* позволит обеспечить безопасность и экологичность процедуры получения основного компонента химической сибиреязвенной вакцины.

**Ключевые слова:** культивирование, *Bacillus anthracis*, протективный антиген.

Анализ заболеваемости природно-очаговыми и зооантропонозными инфекциями в 2007 г. показал лишь незначительное уменьшение случаев сибирской язвы у людей по сравнению с предыдущим годом [3]. Возможность заражения человека возбудителем этого особо опасного инфекционного заболевания поддерживается существованием множественных почвенных очагов и периодически возникающими эпизоотиями. Кроме того, *B. anthracis* относится к категории А агентов биотерроризма [12].

Наиболее действенным способом профилактики сибирской язвы является вакцинация людей групп риска и сельскохозяйственных животных. Применяемые в России живые сибиреязвенные вакцины, несмотря на свою эффективность, обладают относительно высокой реактогенностью. Более безопасные химические вакцины состоят главным образом из протективного антигена (ПА), выделенного из аттенуированных штаммов *B. anthracis* [11, 14]. Входящий в состав сибиреязвенного экзотоксина ПА обладает ярко выраженными иммуногенными свойствами, однако две другие его составляющие – отечный и летальный факторы, участвуют в реализации патогенного действия микроорганизма [5, 15]. Существующая технология получения ПА из аттенуированных культур не позволяет добиться полного разделения компонентов токсина, ввиду близких значений их молекулярных масс. С помощью рекомбинантных технологий возможно создание продуцентов ПА, лишенных генов, детерминирующих синтез основных факторов патогенности возбудителя сибирской язвы. В то же время, с позиции биологической безопасности в производстве химических вакцин предпочтительнее использование бактериальных штаммов, не образующих спор.

В РосНИПЧИ «Микроб» сконструирован аспорогенный продуцент ПА сибиреязвенного микроба [2]. Генно-инженерный штамм содержит структурный ген *pag* в составе гибридного репликона pUB110PA-1 и продуцирует около 100 мкг/мл ПА, что в 4–5 раз

больше значений, определенных для *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55. По биологическим характеристикам синтезируемый штаммом ПА претендует на роль основного компонента в усовершенствованной химической вакцине. Целью настоящего исследования было определение условий культивирования рекомбинантного продуцента ПА, обеспечивающих высокий выход белкового продукта.

### Материалы и методы

В работе использован рекомбинантный штамм *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Sp<sup>o</sup>) (KM97, патент РФ № 2321629) [Cap<sup>+</sup>(pXO2<sup>-</sup>), Tox<sup>+</sup>(pXO1<sup>-</sup>), Km<sup>r</sup>(pUB110PA-1), Sp<sup>o</sup>].

Для выращивания использовали бульон Хоттингера, казеиновый бульон, L-бульон, S-бульон [4], содержащий (г/л): триптон – 33,0; дрожжевой экстракт – 20,0; L-гистидин – 2,0; NaCl – 7,4; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 8,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 4,0 (pH 7,4). В готовую среду при необходимости добавляли: глюкозу – 2,0 г/л; канамицин – 25 мкг/мл.

Чистоту культуры *B. anthracis* контролировали бактериоскопически и бактериологически.

Оценку биокинетических показателей роста проводили с использованием морфометрических и биокинетических методов анализа. Физиологическое состояние популяции оценивали по следующим показателям:

1) выход биомассы (Σ)

$$\Sigma = V_{жф} \times X / V_{жф} + V_{тф},$$

где V<sub>жф</sub> – объем жидкой фазы, V<sub>тф</sub> – объем твердой фазы, X – концентрация биомассы.

2) удельная скорость роста клеток (μ)

$$\mu = 2,3 (\log X - \log X_0) / t - t_0,$$

где X<sub>0</sub> и X – начальная и конечная концентрации,

$t_0$  и  $t$  – начальный и конечный момент времени.

3) удельная скорость образования антигена ( $qp$ )

$$qp = P - P_0 / X(t - t_0),$$

где  $P_0$  и  $P$  – начальная и конечная концентрации антигена,  $X$  – концентрация биомассы,  $t_0$  и  $t$  – начальный и конечный момент времени.

Протеолитическую активность штамма *B. anthracis* исследовали на полусинтетической среде следующего состава (г/л): бакто-агар – 15,0; дрожжевой экстракт – 4,0; казеин (альбумин) – 2,0; трис-HCl – 1,21;  $K_2HPO_4$  – 0,5;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  – 0,03;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,4;  $CaCl_2$  – 0,08;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,005;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 0,005;  $(NH_4)_2SO_4$  – 2,0 (pH 7,4). Изолированные колонии суточной агаровой культуры *B. anthracis* наносили на поверхность пластинки агара (не более 16 клонов на чашку), инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 ч. На среде с казеином или альбумином вокруг колоний штамма с высокой активностью протеолитических ферментов на мутном фоне среды образовывались зоны просветления шириной до 10 мм. Через 48 ч инкубации на этой же среде регистрировали синтез желтого диффундирующего пигмента по возникновению вокруг посева желтой радиальной зоны на беловатом общем фоне.

Постановку реакции радиальной диффузионной преципитации осуществляли на казеиновой среде, содержащей кроличьи анти-ПА антитела, переносом уколом изолированных колоний штаммов. Посевы инкубировали в течение 16 ч при температуре 37 °C, а затем в течение 24 ч при комнатной температуре.

Наличие гибридной плазмиды в штамме *B. anthracis* 55ΔТПА-1( $Spo^-$ ) подтверждали данными электрофоретического разделения выделенной ДНК, а наличие клонированного гена *pag* – результатами ПЦР-анализа с олигонуклеотидными праймерами на основе нуклеотидных последовательностей, фланкирующих tandemные повторы ДНК в составе *pag*-гена плазмиды рХО1 *B. anthracis* (РосНИПЧИ «Микроб»). Реакцию проводили с препаратами плазмидных ДНК (концентрация ДНК – 100 нг/мкл), выделенных из рекомбинантных бациллярных штаммов, а также из контрольного штамма *B. anthracis* СТИ-1.

Экспрессию гена *pag* исследовали с помощью комплекса биохимических и иммунохимических методов. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [9] с применением набора реактивов «Bio-Rad DC Protein Assay» (США). Чистоту препаратов ПА контролировали в SDS-PAGE электрофорезе по U.K.Laemmli, а иммуноспецифичность – в иммуноблоте по методу H.Towbin [8, 13]. В иммунохимических реакциях использовали кроличьи поликлональные антитела к ПА. Для определения продукции ПА использовали непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА). В каждом ряду 96-луночного планшета титровали культуральные фильтраты, в последнем ряду – очищенный белок, начиная от уста-

новленной концентрации. Меченные пероксидазой видоспецифические антитела (Sigma, США) использовали в рабочем разведении 1:20000. Хромогенными субстратами служили ортофенилдиамин или ABTS (Sigma, США). Учет результатов проводили при длине волны 492 или 405 нм соответственно.

## Результаты и обсуждение

В качестве продуцента протективного антигена сибиреязвенного микроба использовали аспорогенный рекомбинантный штамм *B. anthracis* 55ΔТПА-1( $Spo^-$ ). Данный штамм, сочетающий высокую продукцию протективного антигена с низкой активностью протеолитических ферментов, получен в результате генетической передачи гибридной плазмиды рUB110PA-1 со встроенным геном *pag* [2] в аспорогенный и протеадефицитный реципиентный штамм *B. anthracis* 55ΔТ [1].

В течение более 30-суточных пассажей штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1( $Spo^-$ ) на питательных средах с добавлением селективного антибиотика случаев элиминации плазмиды рUB110PA-1 не отмечено. Элиминации плазмиды рUB110PA-1 не происходило и при условии непродолжительного выращивания штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1( $Spo^-$ ) в жидкой питательной среде без селективного антибиотика. Однако продление времени культивирования рекомбинантного аспорогенного продуцента ПА в отсутствие канамицина более 3 сут, а также увеличение количества суточных пассажей (более 3), приводило к резкому нарастанию темпов утраты гибридного репликона. Аспорогенность культур подтверждали через каждые 5–7 пересевов. На промежуточных этапах и по окончании всех схем пассирования реверсии к спорообразующему фенотипу не происходило. Кроме того, тестировали протеолитическую активность штамма. При исследовании на среде с казеином у всех тестируемых клонов отсутствовали зоны деградации белкового субстрата вокруг посевов.

По данным белкового электрофореза и иммуноблота, продукция ПА у аспорогенного рекомбинантного штамма была выше, чем у контрольного вакцинного штамма *B. anthracis* 55. Результаты реакции преципитации на среде с анти-ПА антителами подтвердили преимущество *B. anthracis* 55ΔТПА-1( $Spo^-$ ) в способности к синтезу ПА. Зоны радиальной диффузии антигена вокруг посевов клонов аспорогенного рекомбинанта достигали 10 мм, в то время как у вакцинного штамма *B. anthracis* 55 они были не более 2 мм. С использованием ТИФА осуществили количественную оценку уровня продукции ПА рекомбинантным штаммом – около 100 мкг/мл. Продукция ПА вакцинными штаммами *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55 составила 15 и 20 мкг/мл соответственно.

Технология выделения ПА из аттенуированных штаммов *B. anthracis* предполагает выращивание бактериальных культур в атмосфере с повышенным

содержанием  $\text{CO}_2$ . В нашем случае моделирование указанных выше условий секреции ПА оказалось излишним. Продукция ПА рекомбинантным штаммом с pUB110PA-1 весьма эффективно происходила и в обычной атмосфере. Сконструированный штамм с клонированным геном *pag* выгодно отличается от аттенуированных продуцентов, ввиду отсутствия у него области, детерминирующей синтез  $\text{CO}_2$ -зависимого транскрипционного регулятора – AtxA. В штаммах сибиреязвенного микроба область AtxA локализована в составе высокомолекулярного репликона pXO1. Как известно, экспрессия гена *pag* в составе pXO1, находится под строгим контролем  $\text{CO}_2$ -зависимого транскрипционного регулятора – AtxA [7]. Повышение содержания  $\text{CO}_2$  является пусковым моментом для осуществления координированной регуляции синтеза ПА, ОФ, ЛФ, капсулы, белков S-слоя и, возможно, других факторов [6, 7, 10]. В штамме с клонированным геном *pag* область AtxA отсутствует, что объясняет  $\text{CO}_2$ -независимый синтез ПА.

Для определения возможного влияния состава среды на секрецию ПА, культуру штамма *B. anthracis* 55ΔTPA-1(Spo<sup>-</sup>) выращивали на средах, различающихся по содержанию питательных ингредиентов (в порядке убывания): S-бульоне, L-бульоне, бульоне Хоттингера с добавлением триптона (20 мг/мл), бульоне Хоттингера, казеиновой среде. Одинаковое количество микробной взвеси *B. anthracis* 55ΔTPA-1(Spo<sup>-</sup>) засеивали во флаконы с равным объемом перечисленных сред, добавляли канамицин в селективной концентрации и выращивали в течение 18 ч при температуре 37 °C с аэрацией. Протеины, секретируемые в среду культивирования, осаждали сульфатом аммония и разводили равными объемами буфера для электрофореза. После электрофоретического разделения протеинов сравнивали продукцию белка с молекулярной массой 83 кДа. Иммунореактивность

и специфичность данного белка подтверждали результатами реакции иммуноблота, дот-анализа, ТИФА с антителами к ПА. Во всех случаях отмечали образование окрашенных иммунных комплексов. Двукратная иммунизация кроликов дозой 50 мкг ПА приводила к формированию адаптивного иммунитета с высокими значениями титров анти-ПА антител – 1:8000 и 1:16000 (по результатам ТИФА). В случаях иммунизации культурой *B. anthracis* СТИ-1 титры составляли 1:1000 – 1:2000.

Наилучшие условия для роста и секреции ПА обеспечивал S-бульон. При выращивании на казеиновой среде продукция ПА была минимальной. Бульон Хоттингера и казеиновая среда могут быть использованы в технологии получения ПА только после добавления в них триптона.

На следующем этапе тестировали влияние продолжительности выращивания в жидких питательных средах разного состава на секрецию ПА. Уровень продукции ПА и рост биомассы сравнивали в поздней логарифмической или в ранней стационарной фазе роста (через 16, 18 и 24 ч культивирования). Использовали следующие среды: S-бульон, казеиновый бульон (140 мг% амминного азота), бульон Хоттингера (200 мг% аминного азота), а также последние две среды с добавлением триптона (20 мг/мл). Триптон (Difco) вводили в состав среды или непосредственно перед высевом культуры штамма-продуцента, или через 4 (16) часов роста в объемном соотношении 1/10 (2 мл штокового раствора на 20 мл бульона). Культивирование проводили при температуре 37 °C в колбах (250 мл) на термостатируемой качалке RC-ТК (США) с аэрацией (130 об/мин). Объем среды во всех случаях составлял 20 мл. Для создания селективных условий в среды вносили канамицин (25 мкг/мл). Посевной материал готовили из 18-часовой агаровой (LB-agar) культуры *B. anthracis* 55ΔTPA-1(Spo<sup>-</sup>) 4-й

Сравнительный анализ выхода биомассы и продукции ПА штаммом *B. anthracis* 55ΔTPA-1(Spo<sup>-</sup>) на различных средах

Среда	Концентрация, через					
	16 ч		18 ч		24 ч	
	культуры в процессе роста, млрд м.к./мл	ПА, мг/мл	культуры в процессе роста, млрд м.к./мл	ПА, мг/мл	культуры в процессе роста, млрд м.к./мл	ПА, мг/мл
S-бульон	15	5,0	15	4,48	20	2,0
Казеиновый бульон с добавлением триптона перед началом выращивания	20	18,0	22	2,60	20	1,0
Бульон Хоттингера с добавлением триптона перед началом выращивания	20	21,0	20	4,80	25	1,20
Казеиновый бульон с добавлением триптона через 4 ч от начала выращивания	18	0,80	20	0,60	18	0,24
Бульон Хоттингера с добавлением триптона через 4 ч от начала выращивания	20	0,64	20	0,60	28	0,32
Казеиновый бульон с добавлением триптона через 16 ч от начала выращивания	15	0,24	12	0,12	23	0,06
Бульон Хоттингера с добавлением триптона через 16 ч от начала выращивания	17	0,96	18	0,64	27	0,12



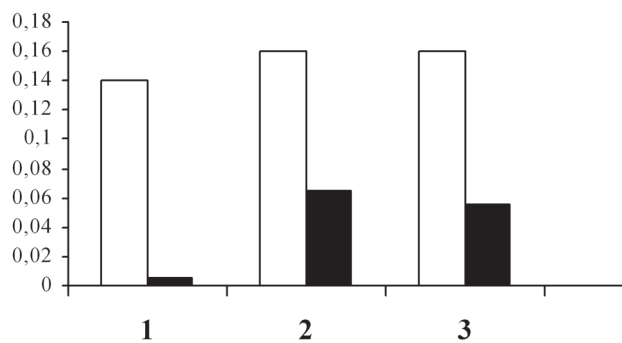


Рис. 1. Зависимость удельной скорости роста ( $\mu$ ) штамма-продуцента *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>) и скорости образования ПА ( $q_p$ ) от среды культивирования на 16 ч от начала выращивания:

1 – S-бульон, 2 – бульон Хоттингера с добавлением триптона перед началом культивирования, 3 – казеиновый бульон с добавлением триптона перед началом культивирования.  
 □ – удельная скорость роста штамма; ■ – удельная скорость образования ПА

генерации. Инокулят добавляли в объеме 0,5 мл до конечной концентрации в питательной среде –  $1,5 \cdot 10^9$  м.к./мл. Концентрацию ПА в культуральных фильтратах рассчитывали с помощью ТИФА. Ростовые качества среды оценивались по концентрации микробных клеток, определяемой по стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

Накопление биомассы наиболее интенсивно происходило на средах с высоким содержанием триптона, постепенно достигая максимума к 24 ч инкубации (таблица).

Содержание ПА в культуральных фильтратах зависело от наличия триптона в составе питательных сред, времени его внесения, продолжительности выращивания. В условиях культивирования на богатых питательных средах способность к синтезу ПА рекомбинантного аспорогенного штамма возрастала во много раз (рис. 1).

По результатам эксперимента к 16 ч от начала культивирования концентрация ПА оказалась самой низкой в культуральном фильтрате штамма

*B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>), выращенного на казеиновой среде. Несколько более высокие показатели отмечались при культивировании на бульоне Хоттингера без добавления триптона и с добавлением триптона через 4 ч от начала выращивания. Концентрация ПА в условиях роста аспорогенного рекомбинантного продуцента в S-бульоне ожидаемо была выше в несколько раз. Самые высокие значения уровня продукции ПА зарегистрированы при росте *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>) в бульоне Хоттингера или казеиновой среде с добавлением триптона перед началом выращивания.

На всех средах максимальные концентрации ПА отмечались к 16 ч (рис. 2). В дальнейшем происходило постепенное снижение содержания ПА в культуральных фильтратах. Минимальные значения оказались через 24 ч выращивания. Особенно четко данная тенденция прослеживалась при использовании бульона Хоттингера или казеиновой среды с добавлением триптона. Вероятно, после 16 ч культивирования синтезируемый ПА начинает постепенно разрушаться под действием активизирующихся протеолитических ферментов штамма-продуцента.

Таким образом, установлено, что продукция ПА рекомбинантным штаммом *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>) не зависит от содержания CO<sub>2</sub> в атмосфере. Для лучшей секреции ПА предпочтительнее выращивание культуры генно-инженерного продуцента на среде с высоким содержанием триптона и дрожжевого экстракта. В качестве альтернативы S-бульону возможно использование бульона Хоттингера или казеиновой среды с добавлением триптона в высокой концентрации. Во избежание возможной протеолитической деградации ПА продолжительность роста культуры штамма-продуцента не должна превышать 16 ч.

Работа выполнена по Государственному контракту № 124-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

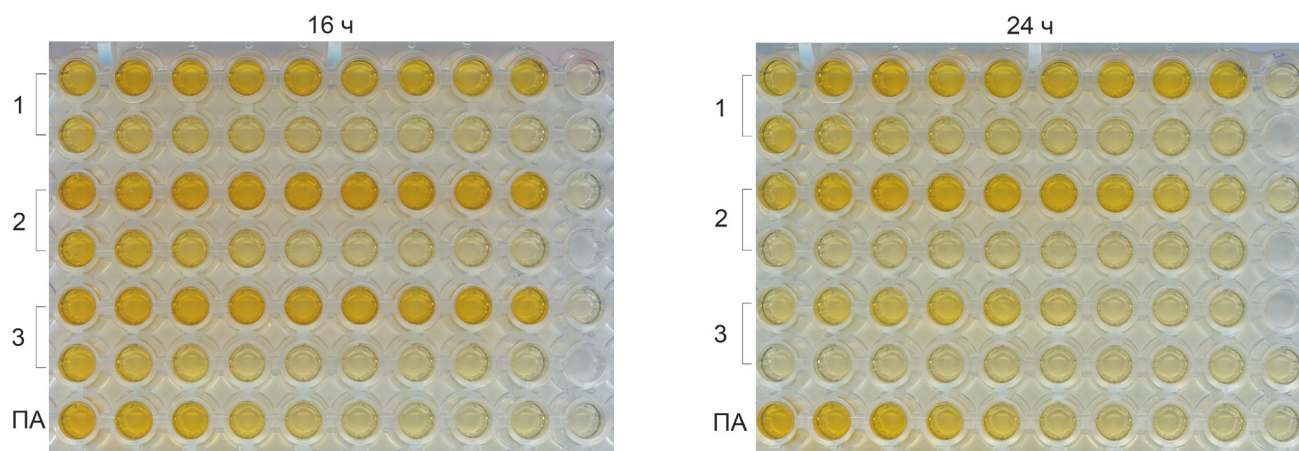


Рис. 2. Результаты ТИФА с антителами к ПА. Цифрами обозначены разведения культуральных фильтратов аспорогенного продуцента *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>), выращенного на:

1 – S-бульоне, 2 – бульоне Хоттингера с добавлением триптона, 3 – казеиновом бульоне с добавлением триптона. В последних рядах 2-кратные разведения очищенного препарата ПА, начиная с концентрации 320 мкг/мл

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микуш Н.И., Болотникова М.Ф., Новикова Л.В. и др. Получение аспорогенных штаммов *Bacillus anthracis*. Биотехнология. 2003; 1:3–11.
2. Микуш Н.И., Кудрявцева О.М., Болотникова М.Ф. и др. Иммуногенность рекомбинантных бациллярных штаммов с клонированным геном синтеза протективного антигена *Bacillus anthracis*. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2007; 3:15–21.
3. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2007 году: Государственный доклад. М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
4. Farchaus J., Ribot W., Downs M., Ezzell J. Purification and characterization of the major surface array protein from the avirulent *Bacillus anthracis* delta Sterne-1. J. Bacteriol. 1995; 177(9):2481–9.
5. Gladstone G. Immunity of anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates. Brit. J. Exp. Pathol. 1946; 27:393–410.
6. Hoffmaster A., Koehler T. The anthrax toxin activator gene *atxA* is associated with CO<sub>2</sub>-enhanced non-toxin gene expression in *Bacillus anthracis*. Infect. Immun. 1997; 65:3091–9.
7. Koehler T., Dai Z., Kaufman-Yarbray M. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO<sub>2</sub> and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. J. Bacteriol. 1994; 176:586–95.
8. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680–5.
9. Lowry O., Risebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193:265.
10. Mignot T., Mock M., Fouet A. A plasmid encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. Mol. Microbiol. 2003; 47:917–27.
11. Pittman P., Kim-Ahn G., Pifat D. et al. Anthrax vaccine: safety and immunogenicity of a dose-reduction, route comparison study in humans. Vaccine. 2002; 20:1412–20.
12. Spencer R., Wilcox M. Agents of biological warfare. Rev. Med. Microbiol. 1993; 4:138–43.
13. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979; 76:4350–4.
14. Turnbull P. Anthrax vaccines: past, present and future.

Vaccine. 1991; 9:533–9.

15. Wright G., Green T., Kanode R. Studies on immunity in anthrax. Immunizing activity of alumprecipitated protective antigen. J. Immunol. 1954; 73(6):387–91.

S.A.Eremin, N.I.Mikshis, O.A.Volokh, O.M.Kudryavtseva, I.A.Shepelev, A.Yu.Goncharova, Yu.A.Popov, A.K.Nikiforov

## Study of Biokinetic Properties and Optimization of the Conditions of Propagation of Recombinant Asporogenic Strain Producing Anthrax Agent Protective Antigen

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Recombinant *Bacillus anthracis* strain 55Δ TPIA-1Sp<sup>o</sup> passed *in vitro* preserved its asporogenic property and ability to replicate recombinant plasmid. Synthesis of immunogenic protein by genetically engineered producer did not depend on CO<sub>2</sub> content in the atmosphere. Determined were the conditions of propagation of asporogenic strain to increase the production of protective antigen. Using *Bacillus anthracis* asporogenic strain in technological process will provide the safe and ecological procedure of obtaining the major component of chemical anthrax vaccine.

Key words: propagation, *Bacillus anthracis*, protective antigen.

### Об авторах:

Еремин С.А., Микуш Н.И., Волох О.А., Кудрявцева О.М., Шепелев И.А., Гончарова А.Ю., Попов Ю.А., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

### Authors:

Eremin S.A., Mikshis N.I., Volokh O.A., Kudryavtseva O.M., Shepelev I.A., Goncharova A.Yu., Popov Yu.A., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 01.10.09.