

Т.Л.Захарова, С.П.Заднова, Л.Ф.Ливанова, М.Н.Киреев, Н.И.Смирнова

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ НЕСКОЛЬКИХ ОЧИЩЕННЫХ ОСНОВНЫХ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

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

Предложен способ выделения и очистки одновременно трех ключевых факторов патогенности холерного вибриона (холерного токсина, токсин-корегулируемых пилей адгезии, O1-антигена Инаба или Огава), являющихся и основными протективными антигенами, из сконструированных ранее рекомбинантных штаммов *Vibrio cholerae* 2415 серовара Инаба и КМ 206 серовара Огава. Иммунологическая активность препаратов подтверждена поликлональными высокоактивными специфическими антисыворотками, полученными на их основе. Очищенные антигены могут быть использованы для создания и усовершенствования профилактических и диагностических препаратов.

**Ключевые слова:** рекомбинантные штаммы *Vibrio cholerae*, протективные антигены, очистка, антисыворотки, специфичность.

Проблема борьбы с холерой – опасной эпидемической болезнью, причиной смертности людей во многих странах, не перестает быть актуальной. В последнее время эпидемическая обстановка по холере во всем мире усложнилась за счет формирования новых эндемичных очагов в Азии и Африке [4]. В связи с этим, а также с усиленной миграцией населения возрастает возможность проникновения возбудителя этой особо опасной инфекции в Россию. Очевидна необходимость создания более эффективных средств и методов диагностики и профилактики холеры.

В процессе эволюции возбудителя холеры в пределах вида образовалось три эпидемически опасных варианта с разным сочетанием генов патогенности и иммуногенности: холерные вибрионы O1-серогруппы классического биовара сероваров Огава и Инаба, вызвавшие первые шесть пандемий азиатской холеры (с 1817 по 1923 год); холерные вибрионы O1-серогруппы биовара эльтор сероваров Инаба и Огава – возбудителя текущей 7-й пандемии (с 1961 г. по настоящее время) и внезапно появившиеся в 1992 г. высоковирулентные штаммы *Vibrio cholerae* O139 серогруппы [8]. В системе эпидемиологического надзора за холерой важнейшее значение имеет не только своевременное выделение штаммов холерного вибриона, но и оценка их эпидемической значимости, основанная на определении продукции основных факторов патогенности.

К наиболее значимым факторам патогенности холерного вибриона, являющимся и важными протективными антигенами, относятся холерный токсин (ХТ), вызывающий развитие диареи (основного клинического симптома при холере); токсин-корегулируемые пилы адгезии (ТКПА) – основной фактор колонизации холерного вибриона; основной соматический антиген O1 (сероваров Инаба и Огава) и O139 серогрупп [8]. Данные антигены формируют соответственно антитоксический, антиколонизирующий и антибактериальный иммунитет при холере.

В ранее проведенных исследованиях сконструиро-

ваны рекомбинантные штаммы *V. cholerae*, имеющие высокий уровень синтеза основных протективных антигенов – ХТ, ТКПА и O1-антигена [6, 12]. В результате введения в клетки природных токсигенных штаммов *V. cholerae* 569В Инаба и Дакка 35 Огава рекомбинантной плазмиды pCT105 с клонированными генами *ctxAB* продукция ХТ возросла более чем в четыре раза. Присутствие в клетках указанной плазмиды не только обусловило активный синтез ХТ, но и привело к повышению продукции ТКПА за счет увеличения экспрессии глобального регуляторного гена *toxR*. Полученные штаммы обладают также повышенным уровнем экспрессии гена *wbe*, кодирующего синтез O1-антигена. Эти свойства позволяют использовать их в качестве продуцентов всех трех указанных протективных антигенов одновременно. Наличие рекомбинантных штаммов O1-серогруппы сероваров Инаба и Огава дает возможность получать тот или иной серовар O1-антигена в зависимости от выращиваемого штамма.

Разработка эффективной технологии получения протективных антигенов в чистом виде является важнейшей задачей, так как очищенные антигены могут быть использованы для создания и усовершенствования профилактических и диагностических препаратов.

Цель данной работы – выделение и очистка трех основных протективных антигенов (ХТ, ТКПА и O1-антигена) из одного рекомбинантного штамма холерного вибриона при однократном выращивании.

### Материалы и методы

В работе использованы следующие сконструированные ранее рекомбинантные штаммы *V. cholerae*: 2415, классический биовар, O1-серогруппа серовара Инаба, содержащий рекомбинантную плазмиду pCT105::mini-kan (Km<sup>R</sup>, Tc<sup>R</sup>) с клонированными структурными генами *ctxAB*, кодирующими ХТ [12]; КМ 206 (2416), классический биовар, O1-серогруппа

серовара Огава, полученный в результате элиминации плазмиды pCT105::mini-kan из плазмидного клона Дакка 35 (pCT105::mini-kan).

Штаммы имеют повышенную экспрессию резидентных генов *ctxAB*, *tcpA-F* и *wbe*, кодирующих соответственно ХТ, ТКПА и О1-антиген [6]. Штаммы депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб».

Выращивание штаммов проводили в бульоне LB (рН 6,8) при температуре 30 °С методом глубинного культивирования с аэрацией в ферментере «New Brunswick» (США) в течение 10 ч.

Источником ХТ и О1-антигена служил обработанный формалином центрифугат жидкой культуры указанных штаммов. Для выделения ТКПА использовали бактериальную массу. Технология выделения ХТ состояла из осаждения белка с помощью модифицированной процедуры, описанной в [11], и последующей очистки методом ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе [10].

Препараты О-антигена О1 серогруппы сероваров Инаба и Огава получали с помощью поэтапного выделения растворенного в культуральной среде антигена. Культуральную жидкость подвергали мембранной ультрафильтрации и проводили разделительную хроматографию на TSK-геле HW-60 (Toyo Soda MFG, Co LTD, Япония) [1].

Выделение белка пилей (ТКПА) проводили по разработанной ранее методике [2]. Содержание белка в пробах контролировали методом Лоури, количество полисахарида определяли с помощью тимолового реактива. Специфическую активность очищенных антигенов определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) [3]. Изучение белкового состава выделенных и очищенных протективных антигенов проводили, используя электрофорез в полиакриламидном геле [9].

Кроличьи антисыворотки к выделенным и очищенным препаратам протективных антигенов (ХТ, ТКПА, О1-антигену сероваров Инаба и Огава) получали с помощью модифицированных нами методов иммунизации [5, 7, 13]. Каждым препаратом иммунизировали группу из пяти кроликов породы шиншилла массой 2,5 кг. Антисыворотки к ХТ получали двукратной иммунизацией животных с интервалом в один месяц путем введения 200 мкг очищенного препарата. Антисыворотку к О1-антигену сероваров Инаба и Огава получали путем 3-кратной иммунизации кроликов с интервалами в 4 дня нарастающими дозами антигена (50, 100, 150 мкг). Через 7 дней проводилась повторная 3-кратная иммунизация большими дозами препарата (400–500 мкг) с интервалами в 1 день. Антисыворотку к ТКПА получали 4-кратной внутривенной иммунизацией возрастающими дозами антигена (100, 150, 200 и 250 мкг) с интервалом в 7 дней. Антигенную активность полученных сывороток определяли в РИД с соответствующими очищенными препаратами антигенов.

## Результаты и обсуждение

На первом этапе работы были подобраны оптимальные условия культивирования, обеспечивающие эффективную продукцию штаммами *V. cholerae* KM 206 и 2415 всех трех основных протективных антигенов (ХТ, ТКПА, О1-антигена) в производственных условиях, что позволило получить достаточное количество бактериальной массы и супернатанта.

Штамм *V. cholerae* KM 206 (2416) использовали для выделения ХТ, ТКПА и О1 антигена серовара Огава. О1 антиген серовара Инаба получали из культуры штамма *V. cholerae* 2415, который также является продуцентом и ХТ, и ТКПА.

Получение очищенных антигенов начинали с выделения ХТ. Для этого белковые фракции из фильтрата бульонной культуры, предварительно обработанного формалином (0,25 %), осаждали в присутствии 0,25 % гексаметафосфата натрия при рН 4,0, перемешивая в течение 2 ч при комнатной температуре. Осадок собирали центрифугированием, растворяли и диализовали против 0,01 М фосфатного буфера, рН 7,0. Очистка препарата методом ионообменной хроматографии основана на способности ХТ связываться с фосфоцеллюлозой при рН 7,0. Для этого препарат наносили на предварительно подготовленную колонку с обработанной и уравновешенной тем же буфером фосфоцеллюлозой P11 (Whatman). Адсорбированный на колонке ХТ элюировали 0,2 М фосфатным буфером, рН 7,4. Профиль элюции имел два пика: пик 1 появлялся в уравновешивающем 0,01 М буфере при рН 7,0, а пик 2 элюировался после изменения молярности и рН буфера. ХТ содержался во 2-м пике, что подтверждалось положительным результатом РИД с антитоксической сывороткой. Фракции 2-го пика объединяли и диализовали против 0,9 % раствора хлорида натрия с 0,02 % азидом натрия в качестве консерванта. Выход очищенного токсина от общего количества белка в исходном препарате составил 12 %.

Специфическую активность полученного ХТ определяли в РИД с моноспецифической антитоксической сывороткой. Полученный токсин образовывал одну линию преципитата, титр реакции составлял 1:64 (3 мкг/мл). Чистоту и гомогенность препарата контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Результаты показали, что в очищенном нами препарате обнаруживались две белковые полосы, идентичные по расположению А- (27,2 кДа) и В-субъединице (58 кДа) коммерческого препарата ХТ (Sigma, США) (рис. 1).

Для получения препаратов О1-антигена Огава и О1-антигена Инаба применяли способ поэтапного выделения растворенного в культуральной среде антигена, позволяющий сохранить антиген на всех этапах очистки в нативном растворенном виде, избегая изменения его фазового состояния, которое происходит при общепринятых методах выделения

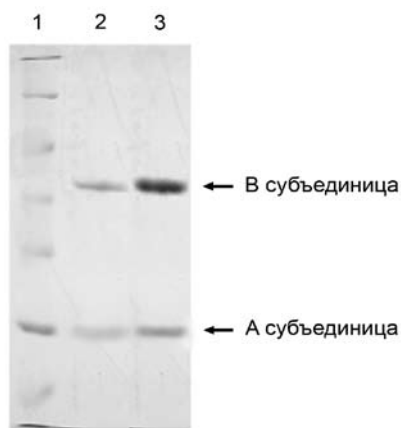


Рис. 1. Электрофореграмма очищенного препарата холерного токсина

1 – маркеры молекулярной массы (150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 кДа);  
2 – очищенный препарат холерного токсина; 3 – холерный токсин (фирма Sigma, США), содержащий B- субъединицу 58 кДа и А – 27,2 кДа

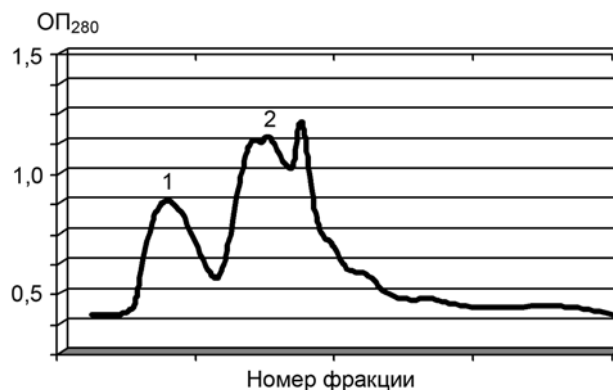


Рис. 2. Гель-фильтрация препарата О1 антигена из штамма *V. cholerae* KM 2415 на колонке TSK-геля HW-60. О1-антиген *V. cholerae* содержится в пике 1  
По оси ординат – элюция препарата при  $\lambda$  280 нм

О-антигена (например, при фракционировании сульфатом аммония).

Фильтрат бульонной культуры штаммов после осаждения белковых фракций (из которых был выделен ХТ) выдерживали 30 сут при температуре 8–10 °С для снижения токсичности. Затем использовали ультрафильтрационную установку АУФ-01 (Россия) с полыми волокнами, осуществляющую частичную очистку центрифугата мембранной ультрафильтрацией (с удалением частиц молекулярной массы менее 100 кДа) и его одновременное концентрирование в 5–10 раз. Полученный концентрат анализировали на содержание О-антигена и очищали на колонке с TSK-гелем HW-60 при pH 7,2. О-антиген обнаруживался в первом пике (рис. 2).

Очищенные препараты О-антигена содержали от 14 до 16 мкг/мл полисахаридов, специфическая активность в РИД с соответствующими О-сыворотками составляла 1:64.

Чистоту полученных препаратов О-антигена проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Выделенные препараты содержали только полисахариды О антигена без примесей белков.

Пили отделяли от клеток с помощью встряхивателя (Vortex) со скоростью 2500 об/мин. Для освобождения от балластных белков препарат, содержащий ТКПА, растворяли в 125 мМ этанолаmine (pH 10,5) при 4 °С и диализовали против 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,4). Выход продукта составлял в среднем 6,3 %.

По данным белкового электрофореза (рис. 3), выделенный препарат кроме ТКПА содержал белок внешней мембраны OmpU, который также обладает адгезивными свойствами. Методом иммуноблоттинга с коммерческой сывороткой к основной субъединице токсин-корегулируемых пилей адгезии – TsrA было подтверждено присутствие в препарате иммунологически активной полосы, соответствующей субъединице пилей TsrA с молекулярной массой 20,5 кДа.

Иммунологическую активность выделенных очищенных препаратов протективных антигенов (ХТ, ТКПА, О1-антигена сероваров Инаба и Огава) подтверждали получением кроличьих антисывороток. Животных иммунизировали по разработанным ранее схемам, описанным в разделе «Материалы и методы».

Антигенную активность приготовленных антисывороток определяли в РИД с соответствующими очищенными препаратами протективных антигенов. Было установлено, что антитоксическая сыворотка образовывала линию преципитации в разведениях 1:64 – 1:128, сыворотка против ТКПА – 1:32, сыворотки против О1-антигена Инаба и Огава – 1:16–1:32. Эти данные указывают на способность выделенных протективных антигенов образовывать специфические антитела в достаточно высоких титрах.

Поскольку полученные нами антисыворотки к О1-антигену серовара Инаба (АС) и Огава (АВ),

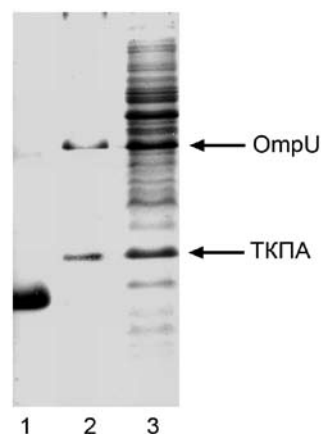


Рис. 3. Электрофореграммы лизата клеток штамма – продуцента протективных антигенов и выделенного из него белкового препарата, содержащего токсин-корегулируемые пили адгезии  
1 – маркер молекулярной массы – 17,8 кДа; 2 – белковый препарат из *V. cholerae* KM206; 3 – общая белковая фракция штамма *V. cholerae* KM206

помимо специфических антител к антигенам С или В, содержали антитела к общему антигену А, то на следующем этапе была проведена работа по их удалению. Для этого сыворотки Инаба адсорбировали клетками штаммов *V. cholerae* М41 и R3122 серовара Огава, а сыворотки Огава – клетками штамма *V. cholerae* 569В серовара Инаба. После проверки полученных антисывороток в развернутой реакции агглютинации установлено, что антисыворотки Инаба агглютинировали только клетки штаммов *V. cholerae* серовара Инаба в диагностическом титре 1:400, а антисыворотки Огава реагировали лишь с клетками штамма *V. cholerae* серовара Огава (диагностический титр 1:800).

Результатом этого этапа работы явилось получение поликлональных антисывороток, содержащих в высоком титре специфические антитела к антигенам – ХТ, ТКПА, О1 антигену сероваров Инаба и Огава.

Таким образом, использование сконструированных ранее рекомбинантных штаммов *V. cholerae* позволило за один цикл выращивания выделить и очистить модифицированными нами эффективными способами три основных протективных антигена – ХТ, ТКПА и О1-антиген, а также получить на их основе поликлональные высокоактивные специфические антисыворотки. Наличие рекомбинантных штаммов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава О1 серогруппы с повышенной продукцией основных протективных антигенов дает возможность получать тот или иной серовар О1-антигена в зависимости от используемого штамма.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А. и др. Новый способ получения О-антигена холерного очищенного с целью создания холерных диагностических антисывороток. Биотехнология. 2002; 2:42–6.
2. Заднова С.П., Топорков А.В., Новикова О.В., Смирнова Н.И. Получение и использование антител на токсин-корегулируемые пили адгезии холерного вибриона. Биотехнология. 2003; 1:79–84.
3. Иммунологические методы. Под ред. Г.Фримеля. М.: Медицина; 1987. 471 с.
4. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А. и др. Холера в начале XXI века, прогноз. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 3:44–8.
5. Смирнов В.В., Чаплинский В.Я., Андреева З.М.,

Богоявленская Л.Б. Научные основы производства диагностических препаратов. Киев: Наукова думка; 1980. 195 с.

6. Топорков А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Штамм бактерий *Vibrio cholerae* KM 206 классического биовара серовара Огава – продуцент протективных антигенов. Патент РФ 2222594, C12N 1/21 A61 K39/106/(C12N 1/21 C12R 1:63), 2004.

7. Шагинян И.А., Маракуша В.И. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термоллабильных энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1983; 2:92–6.

8. Kaper J.B., Morris J.G., Levin M.M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8(1):48–89.

9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the head of the bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(15):680–5.

10. Mekalanos J.J., Collier R.J., Romig W.R. Purification of cholera toxin and its subunits: new methods of preparation and the use of hypotoxinogenic mutants. Infect. Immun. 1978; 20:552–9.

11. Rappoport R.S., Bonde G., McCann T. et al. Development of a purified cholera toxoid. Infect. Immun. 1974; 9:304–17.

12. Smirnova N., Zadnova S.P., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. Construction of strains producing the main protective antigens of *Vibrio cholerae* based on altered expression of the global regulatory gene *toxR*. In: New Research on Biotechnology and Medicine. A.M.Egorov, G.E.Zaikov, editors. New York; 2006. P. 177–88.

13. Sun D., Mekalanos J.J., Taylor R.K. Antibodies directed against the toxin-coregulated pilus isolated from *Vibrio cholerae* provide protection in the infant mouse experimental cholera model. J. Infect. Dis. 1990; 161:1231–6.

#### Об авторах:

Захарова Т.Л., Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Киреев М.Н., Смирнова Н.И. Российской научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, Университетская, 46. Тел.: (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

T.L.Zakharova, S.P.Zadnova, L.F.Livanova, M.N.Kireev, N.I.Smirnova

#### Recombinant Strains Application for Simultaneous Preparation of Several Purified Cholera *Vibrio* Antigens

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Proposed is the method for simultaneous isolation and purification of three cholera vibrio key pathogenicity factors (cholera toxin, toxin-co-regulated adhesion pili, O1 antigen Ogawa or Inaba), which are main protective antigens, from previously constructed recombinant *Vibrio cholerae* strains 2415 Inaba and KM 206 Ogawa. Immunologic activity of the preparations was confirmed using polyclonal high-active specific antisera. Purified antigens can be used for creation and improvement of prophylactic and diagnostic preparations.

**Key words:** recombinant *Vibrio cholerae* strains, protective antigens, purification, antisera, specificity.

#### Authors:

Zakharova T.L., Zadnova S.P., Livanova L.F., Kireev M.N., Smirnova N.I. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 11.11.08.