

УДК 615.371:616-022.7

А.А. КАЛОШИН*, Е.В. ГАТЫПОВА, Н.А. МИХАЙЛОВА

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, 105064

e-mail: alex-k-1973@yandex.ru

Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств

Получены две рекомбинантные формы белка F наружной мембраны (OprF) *Pseudomonas aeruginosa* (полноразмерная и С-концевая область, включающая 192—342 аминокислотные остатки). Эти рекомбинантные белки в результате двукратной иммунизации защищали мышей от экспериментальной внутрибрюшинной инфекции *P. aeruginosa*. Наилучший защитный эффект выявлен при использовании дозы 25 мкг для OprF и 50 мкг для укороченного варианта OprF (индекс эффективности — 3,3 и 2,8, соответственно). Иммуные кроличьи сыворотки к рекомбинантным белкам также способствовали защите мышей от экспериментальной синегнойной инфекции. Индекс эффективности их защитных свойств составлял 6,4 для сывороток к полноразмерному белку OprF и 6,0 для сывороток к С-концевой области OprF; эти величины примерно в два раза выше, чем в случае введения сывороток крови интактных животных (3,2).

Ключевые слова: белок F наружной мембраны (OprF), иммунизация, рекомбинантный белок, *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) является одним из основных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний человека, в частности вызывает внутрибольничные инфекции. Широкое распространение синегнойная инфекция получила благодаря неприхотливости в отношении питательных веществ и условий внешней среды, а также высокой резистентности к химиотерапевтическим средствам и антибиотикам [1—3]. Синегнойная инфекция может локализоваться в очаге поражения, распространяться в смежные и глубоколежащие ткани, а также проникать в кровотоки, приводя к возникновению сепси-

са, который в большинстве случаев заканчивается смертью. Эта инфекция часто становится причиной серьезных осложнений всех видов хирургических операций, ранений и ожогов. Наиболее подверженными инфекции со стороны *P. aeruginosa* являются больные с иммунодефицитом, вызванным различными факторами: ВИЧ, наследственные патологии, онкологические заболевания, химиотерапия, лучевые поражения, травмы, экологическое неблагополучие и др. [1].

Патогенез синегнойной инфекции сложен и обуславливается множественностью факторов вирулентности возбудителя. Во время инфицирова-

Калошин Алексей Алексеевич, Гатыпова Екатерина Викторовна, Михайлова Наталья Александровна.

Список сокращений: ИПТГ — изопропил-β-D-тиогалактопиранозид; ИФА — иммуноферментный анализ; ИЭ — индекс эффективности; КББ — карбонатно-бикарбонатный буфер; КОЕ — колониеобразующая единица; ЛД₅₀ — доза, вызывающая гибель 50% животных; м.к. — микробные клетки; ОП — оптическая плотность; ПААГ — полиакриламидный гель; ПЦР — полимеразная цепная реакция; dNTP — дезоксинуклеозидтрифосфат(ы).

* Автор для переписки.

ния, когда происходит проникновение возбудителя в ткани макроорганизма, первичные иммунные реакции формируются в основном в ответ на поверхностные антигены бактериальной клетки (компоненты мембраны и клеточной стенки). Наибольшей иммуногенностью обладают некоторые белки наружной мембраны (outer proteins — Opr) *P. aeruginosa*, которые отвечают за межклеточный транспорт и сохранение структуры бактериальной мембраны [4—6]. Эти данные обусловили исследования по разработке вакцины на основе очищенных мембранных белков [7]. Однако получение таких препаратов является проблематичным, поскольку содержание белков наружной мембраны незначительно по отношению к суммарным белкам бактериальной клетки. Поэтому более широкие перспективы открываются при использовании соответствующих рекомбинантных белков.

Наиболее тщательно иммунологически исследован мажорный порообразующий белок F наружной мембраны с молекулярной массой 37,6 кДа, обладающий высокой иммуногенностью [8]. Предполагается, что наиболее активные эпитопы OprF расположены в его С-концевой области, поскольку именно эта часть белка локализуется на поверхности бактериальной клетки [9]. Данная последовательность использована при создании вакцинного препарата, который успешно испытан на способность защищать людей от синегнойной инфекции [10].

Целью настоящих исследований было сравнительное изучение иммуногенных свойств двух вариантов рекомбинантного белка OprF — полного и укороченного, состоящего из 192—342 аминокислотных остатков С-концевой области.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Нуклеотидные последовательности для клонирования, кодирующие два варианта белка, амплифицированы с помощью ПЦР; в качестве матрицы использовали геномную ДНК *P. aeruginosa* (штамм PA170015, коллекция лаборатории протективных антигенов НИИ ВС), которую получали обработкой бактериальной биомассы протеиназой К (Fermentas, Литва) с последующим спиртовым осаждением [11]. Для проведения ПЦР использовали следующие праймеры: F-1 — (5'-AAGGATCCATGAAACTGAAGAACACCTTAG), соответствующий начальным нуклеотидам гена *oprF*; R — (5'-AAAAGCTTTTACTTTGGCTTCA-GCTTCTAC), комплементарный последним нуклеотидам гена *oprF*, и F-2 — (5'-AAGGATCCTTCTTC-

GCCAAGGCCAGCC), соответствующий 451—469 нуклеотидам последовательности гена *oprF* («Синтол», Россия). Для амплификации полноразмерного гена использована пара праймеров F-1 и R, а для последовательности, кодирующей 192—342 аминокислотные остатки OprF (OprF_(192—342)), — пара праймеров F-2 и R. Реакции проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК Технология», Россия). Процесс амплификации полноразмерного гена *oprF* состоял из следующих стадий: прогревание при 94° — 3 мин; 30 циклов ПЦР (94° — 1 мин (денатурация), 65° — 1 мин (отжиг праймеров), 72° — 1 мин (элонгация)) и инкубация при 72° в течение 2 мин. При амплификации более короткого фрагмента ДНК использовалась аналогичная программа, за исключением одного параметра — время элонгации составляло 40 с. Для ПЦР использованы реактивы (*Tag*-ДНК-полимераза, буфер и dNTP) производства Fermentas (Литва). Прямые праймеры содержали на 5'-концах сайт рестрикции *Vam*HI, а обратный — сайт рестрикции *Hind*III, по которым амплифицированные последовательности были встроены в плазмиду pQE-30 (QIAGEN, Германия). При рестрикции использованы ферменты и буферы производства Fermentas. Далее полученными конструкциями были трансформированы клетки штамма *E. coli* M15 (согласно инструкции QIAGEN). Идентичность встроенных последовательностей проверяли с помощью секвенирования.

Синтез рекомбинантных белков с использованием созданных продуцентов проводили путем индукции экспрессии с помощью изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) (Amresco, США) [12]. Белковые продукты анализировали путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли [цит. по 13].

Для проведения электрофореза биомассу, осажденную из 1 мл культуральной среды, ресуспендировали в 100 мкл воды и добавляли равный объем следующего буфера: 100 мМ трис-НСl, рН 6,8, 200 мМ 2-меркаптоэтанол, 20 % глицерина, 0,2 % бромфенолового синего. Смесь кипятили в течение 5 мин, а затем центрифугировали (при 16000 g и комнатной температуре в течение 10 мин) с целью избавления от нерастворившихся компонентов клеток. На гель для электрофореза наносили 10—20 мкл полученного лизата.

Продуценты культивировали в среде LB с ампициллином и канамицином в концентрации 100 и 50 мкг/мл, соответственно, в термостатированном шейкере Ecotron (Infors, Новая Зеландия) при частоте вращения 250 об/мин и температуре 37° до достижения значений ОП 0,6 ед при длине

волны 600 нм. Затем вносили ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и продолжали инкубацию в прежних условиях в течение 4 ч, после чего осаждали полученную биомассу.

Очистку рекомбинантных белков осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы (GE Healthcare, Швеция) в 8 М буферном растворе мочевины (Amresco). Биомассу, содержащую рекомбинантный белок, денатурировали в растворе следующего состава: 8 М мочевины, 0,1 М NaH_2PO_4 , 0,01 М трис, pH 8,0. Этот процесс осуществляли в течение ночи при комнатной температуре на шейкере (EcoTron) с частотой вращения 120—160 об/мин. Затем с целью избавления от нерастворившихся компонентов клеток полученный лизат дважды центрифугировали (16000 g) при комнатной температуре в течение 20—30 мин. Супернатант переносили в колбу, добавляли к нему суспензию Ni-сефарозы (1 мл суспензии на 25 мл лизата) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре в шейкере с легким покачиванием (40 об/мин). Полученную суспензию пропускали через колонку с использованием хроматографической системы Biologic LP (Bio-Rad, Германия). Сорбент со связавшимся белком промывали тем же буфером, который применяли для денатурации биомассы, но при pH 6,3, а затем pH 5,9. Элюцию проводили с использованием аналогичного буферного раствора, pH 4,5. Препараты очищенных рекомбинантных белков растворяли в 50 мМ буферном растворе трис-HCl (pH 9,0) с помощью ступенчатого диализа против нескольких перемен буферного раствора (50 мМ трис-HCl, pH 9,0), содержащих 6 М, 4, 2 или 1 М мочевины, а затем против буферного раствора, не содержащего мочевины. Диализ проводили при температуре 4°. Содержание белков определяли спектрофотометрически (Genesys 6, ThermoScientific, США) при длине волны 280 нм. При расчете концентрации рекомбинантных белков использовали следующие коэффициенты экстинкции: 0,7 для OrgF и 0,6 для OrgF_(192—342), рассчитанные в программе OMIGA 2,0.

Для постановки ИФА белки разводили 10 мМ карбонатно-бикарбонатном буфером (КББ), pH 9,4, до концентрации 5 мкг/мл и выдерживали в течение суток при температуре 4° в 96-луночных планшетах. Иммуноблоттинг проводили по общепринятой методике, используя для анализа специфичности сыворотку крови кролика, иммунизированного цельноклеточной инактивированной культурой *P. aeruginosa* (шт. PA170015). Для предотвращения неспецифического взаимодействия поликлональной сыворотки крови с бел-

ками *E. coli* сыворотку обрабатывали бактериальным лизатом [12].

При исследовании протективной и антигенной активности очищенных белков использовали самок белых беспородных мышей массой 16—18 г и кроликов породы «шиншилла» массой 2—2,5 кг. Мыши были получены из филиала «Андреевка», а кролики из филиала «Электрогорский» Учреждения Российской академии медицинских наук, Научного центра биомедицинских технологий РАМН (НЦБМТ РАМН).

Для иммунизации животных белковые препараты разводили в фосфатно-солевом буфере (Amresco) с добавлением гидроксида алюминия (Sigma, США, из расчета 3 мг $\text{Al}(\text{OH})_3$ на 1 мг белка) и проводили сорбцию в течение 12 ч при температуре 4°. Препараты вводили мышам внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл.

С целью исследования антигенности полученные рекомбинантные белки трехкратно в разных дозах (100 мкг, 50, 25, 12,5 и 6,25 мкг на одно животное) внутрибрюшинно вводили пяти группам мышей. Интервал между процедурами иммунизации составлял две недели. Через две недели после каждого введения пять мышей из каждой группы использовали для получения сыворотки крови. Сыворотку получали у мышей путем вскрытия сонных артерий. Чистую пробирку с кровью животных помещали в термостат при температуре 37° на 30 мин. Образовавшийся сгусток отделяли от стенок пробирки и оставляли в холодильнике при температуре 4° в течение 18—20 ч. Затем пробирку с сывороткой центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. Сыворотки хранили при температуре минус 20°. Контролем служили сыворотки, полученные от интактных мышей этой же партии.

С целью исследования протективной активности рекомбинантных белков проводили двукратную иммунизацию мышей препаратами в дозах: 50 мкг, 25, 12,5 и 6,25 мкг. Через две недели после последней иммунизации животных заражали различными дозами живой вирулентной культуры *P. aeruginosa*. Контрольной группе (интактные мыши той же партии) вводили от 25 до 400 млн. микробных клеток (м.к.), а опытным мышам от 50 до 800 млн. м.к.

Антибактериальную активность сывороток крови лабораторных животных проверяли *in vitro* на модели торможения роста культуры *P. aeruginosa*, используя микробиологический анализатор (планшетный фотометр «Multiscan Ascent» (ThermoLabsystem, Финляндия)), компьютер и программу «ВАСТ». В 96-луночный планшет вносили по

150 мкл инокулированной жидкой питательной среды, содержащей 10^3 – 10^8 КОЕ/мл *P. aeruginosa* (штамм PA-170015) и добавляли по 50 мкл исследуемых сывороток (или 50 мкл питательной среды для контроля роста культуры). О накоплении бактериальной массы свидетельствовало увеличение ОП₂₈₀. Измерение кинетики роста культуры осуществляли в течение 18 ч, а процент его подавления рассчитывали в сравнении с ростом бактерий в контрольных лунках.

При индукции экспериментальной инфекции мышей заражали внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл различными дозами живой вирулентной культуры *P. aeruginosa* (штамм PA-170015), выращенной на агаризованной среде Хоттингера. Подсчет погибших и выживших животных проводили в течение пяти дней с последующим определением ЛД₅₀, которую вычисляли по формуле Кербера в модификации Ашмарина—Воробьева, исходя из которой $ЛД_{50} = \text{обратному логарифму} (LgA - Lg2 \cdot (B_1/C_1 + \dots + B_n/C_n) - 0,5)$, где А — максимальная инфекционная доза в опыте, В — количество животных, павших в группе, С — первоначальное количество животных в группе, n — количество групп.

Для получения иммунных сывороток с целью исследования их превентивных свойств кроликов иммунизировали препаратами рекомбинантных белков по схеме, включающей пять подкожных инъекций (300 мкг белка на 1 инъекцию), производимых с 2-недельным интервалом. Сыворотку получали путем забора крови у кроликов из краевой ушной вены.

Статистические расчеты проводили с помощью программы «Statistica 6.0». Достоверность полученных результатов определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Решение о наличии существенных различий принимали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ПЦР получены специфичные продукты, размер которых составил: 1 т.п.н. для полного гена *oprF* и 0,6 т.п.н. для участка, кодирующего С-концевую область белка OprF (OprF_(192–342)). Поскольку прямые праймеры содержали на 5'-концах сайт рестрикции *Bam*HI (GGATCC), а обратный праймер — сайт рестрикции *Hind*III (AAGCTT), то амплифицированные последовательности были встроены в полилинкер плазмиды pQE-30, которая несла в своем составе регуляторные участки для экспрессии в клетках *E. coli* штамма M15. В результате последовательности, кодирующие OprF и OprF_(192–342), оказались под контролем прокариотического промотора бактериофага T5.

При анализе экстракта биомассы (рис. 1, а), полученной после индукции экспрессии рекомбинантных генов (дорожки 2 и 5), выявлено наличие специфических продуктов, которые отсутствовали в клетках тех же продуцентов, выращенных без добавления ИПТГ (дорожки 1 и 4). Молекулярная масса синтезированных рекомбинантных продуктов составила около 40 кДа для полного белка OprF и около 25 кДа для OprF_(192–342). Расчетная масса

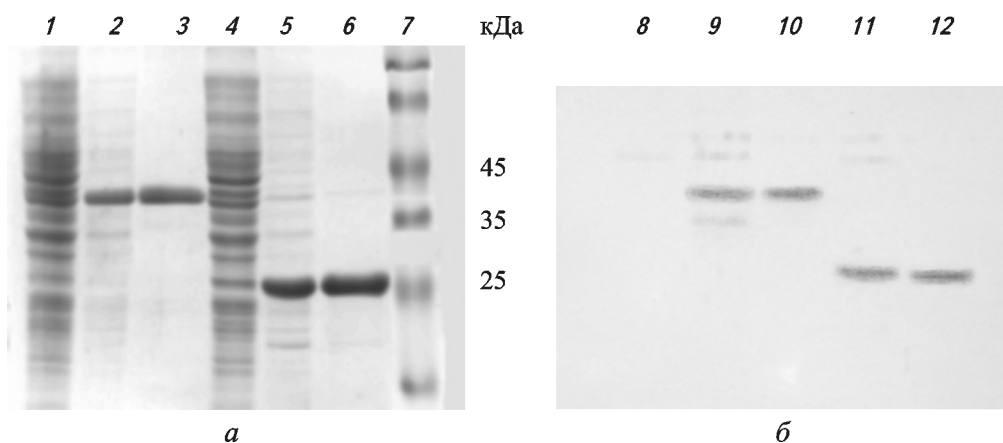


Рис. 1. Электрофорез белковых продуктов, полученных в результате экспрессии последовательностей гена *oprF*, встроженных в плазмиду pQE-30 в клетках *E. coli* M15: а — ПСАГ, окрашивание Кумасси R-250; б — нитроцеллюлозная мембрана после иммуноблоттинга; дорожка 1 — белки продуцента OprF при выращивании биомассы без индукции; 4 — белки продуцента OprF_(192–342) при выращивании биомассы без индукции; 8 — белки биомассы исходных нетрансформированных клеток штамма M15 (*E. coli*); дорожки 2 и 9 — белковые продукты индуцированного продуцента OprF; 5 и 11 — белковые продукты индуцированного продуцента OprF_(192–342); 3 и 10 — очищенный рекомбинантный белок OprF; 6 и 12 — очищенный рекомбинантный белок OprF_(192–342); 7 — маркеры молекулярной массы SM0431 фирмы Fermentas

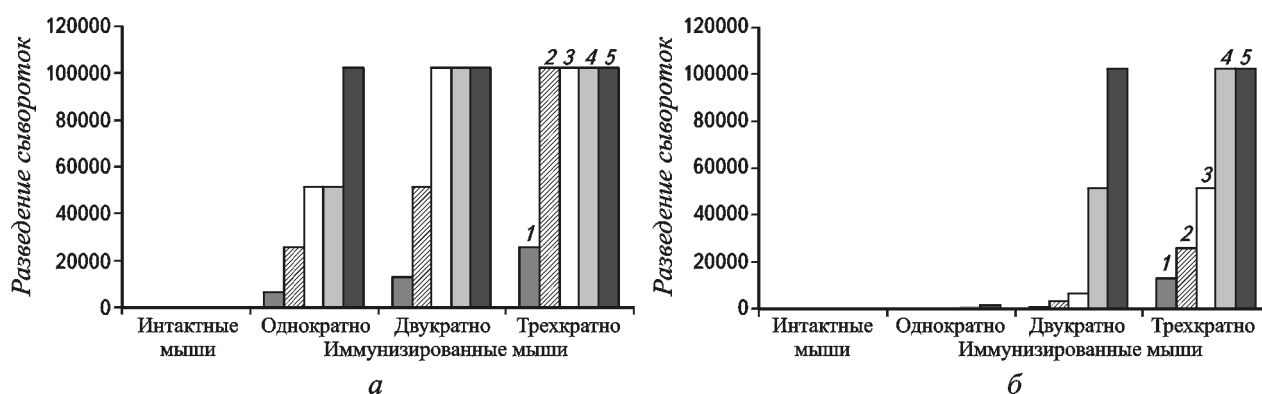


Рис. 2. Титрование сывороток для установления уровня антител, в организме мышей, иммунизированных рекомбинантными белками OrpF (а) и OrpF_(192–342) (б). Гистограммы данных по ИФА сывороток крови иммунизированных мышей при различных дозах очищенных рекомбинантных белков, мкг белка/животное: 1 — 6,25; 2 — 12,5; 3 — 25; 4 — 50; 5 — 100. По оси ординат отложены цифры, характеризующие разведения, при которых ОП при ИФА более чем вдвое превышала фоновый уровень.

для полного белка OrpF соответствовала 38,9 кДа, а для укороченного варианта белка OrpF — 22,6 кДа. По результатам электрофореза установлено, что количество рекомбинантных белков составляло не менее одной трети всех клеточных белков.

Рекомбинантные белки проявляли высокую специфичность при взаимодействии с поликлональной иммунной кроличьей сывороткой к *P. aeruginosa* (см. рис. 1, б, дорожки 9, 11). При этом белки исходных нетрансформированных клеток штамма M15 не реагировали с той же сывороткой (см. рис. 1, б, дорожка 8).

Полученные рекомбинантные белки имели на N-конце следующую дополнительную аминокислотную последовательность (Arg-Gly-Ser-His-His-His-His-His-Gly-Ser), закодированную в последовательности полилинкера. Это позволило провести очистку синтезированных продуктов с помощью аффинной хроматографии, которую осуществляли на колонках с Ni-сефарозой (см. рис. 1, а, дорожки 3, б). Очищенные рекомбинантные белки также были высокоспецифичны в иммуноблоттинге (см. рис. 1, б, дорожки 10, 12).

При анализе в ИФА групповых пулов сывороток, полученных при испытании антигенности рекомбинантных белков (рис. 2) установлено, что рекомбинантные белки способны стимулировать в организме животных синтез специфических антител, при этом наблюдалась зависимость их накопления от доз и кратности процедур иммунизации. Отмечено, что укороченный белок обладал более низкой антигенностью. После первой иммунизации этим белком в испытанных дозах не происходило существенного накопления антител (см. рис. 2, б). В то же время, уже первая иммунизация полным белком в дозе 100 мкг стимулировала значи-

тельное накопление антител в организме мышей. После второй иммунизации полным белком максимальное разведение сыворотки, при котором значения ОП при ИФА более чем в 2 раза превышали фоновый уровень, наблюдали дополнительно и в сыворотке крови группы мышей, получавших дозу 25 мкг, а после третьей — 12,5 мкг. Доза 6,25 мкг белка оказалась малоэффективной. При использовании укороченного белка максимальный титр антител был выявлен при введении 100 мкг после второй иммунизации и 50 мкг после третьей иммунизации.

Для определения протективной активности очищенных рекомбинантных белков иммунизированных мышей заражали живой вирулентной культурой *P. aeruginosa*. Данные учета погибших животных, приведенные в табл. 1 и 2, свидетельствовали о способности препарата защищать мышей от синегнойной инфекции. Индексы эффективности (ИЭ) (отношение ЛД₅₀ для иммунизированных мышей к ЛД₅₀ в контрольной группе) полного белка OrpF составляли от 1,6 до 3,3 (см. табл. 1), а для белка OrpF_(192–342) — от 1,6 до 2,8 (см. табл. 2). При использовании схемы двукратной иммунизации полная форма рекомбинантного белка OrpF проявляла наилучший защитный эффект в дозе 25 мкг препарата на одно животное, в то время как для укороченного белка требовалась большая иммунизирующая доза.

По десять животных из групп, иммунизированных дозами 50 мкг, были использованы для получения пула сывороток крови с целью анализа их антибактериальных свойств. Эти сыворотки протестированы *in vitro* на моделях торможения роста культуры *P. aeruginosa* (рис. 3). При использовании сывороток крови мышей, иммунизированных

Таблица 1

Протективная активность рекомбинантного белка OprF после двукратной иммунизации мышей

Доза иммунизации, мкг/мышь	Доза заражения, млн. м.к.	Количество мышей павших/выживших	ЛД ₅₀ , млн. м.к.	ИЭ (см. текст)
50	800	9/1	162,5±32,5 (p < 0,03)*	2,5
	400	8/2		
	200	6/4		
	100	3/7		
	50	2/8		
25	800	9/1	214,4±43,9 (p < 0,01)	3,3
	400	7/3		
	200	5/5		
	100	2/8		
	50	1/9		
12,5	800	10/0	141,4±28,2 (p < 0,04)	2,1
	400	9/1		
	200	6/4		
	100	4/6		
	50	1/9		
6,25	800	10/0	107,2±21,4	1,6
	400	10/0		
	200	8/2		
	100	4/6		
	50	2/8		
Контроль (интактные мыши)	400	10/0	66±13,2	–
	200	9/1		
	100	6/4		
	50	4/6		
	25	2/8		

* При сравнении значений опытных и контрольных групп.

Протективная активность рекомбинантного белка OrpF(192—342) после двукратной иммунизации мышей

Доза иммунизации, мкг/мышь	Доза заражения, млн. м.к.	Количество мышей павших/выживших	ЛД ₅₀ , млн. м.к.	ИЭ
50	800	9/1	200±40 (p < 0,02)*	2,8
	400	9/1		
	200	5/5		
	100	2/8		
	50	0/10		
25	800	10/0	162,5±32,5 (p < 0,01)	2,3
	400	8/2		
	200	6/4		
	100	3/7		
	50	1/9		
12,5	800	10/0	151,6±30,3 (p < 0,03)	2,1
	400	9/1		
	200	6/4		
	100	3/7		
	50	1/9		
6,25	800	10/0	114,9±23	1,6
	400	10/0		
	200	7/3		
	100	4/6		
	50	2/8		
Контроль (интактные мыши)	400	10/0	70,7±14,1	—
	200	9/1		
	100	6/4		
	50	4/6		
	25	1/9		

* При сравнении значений опытных и контрольных групп.

полным белком OrgF, значения среднего подавления роста культуры (к 18 ч после посева) *P. aeruginosa* составили 77% при дозе 10^5 КОЕ, 80% при дозе 10^4 КОЕ и 81% при дозе 10^3 КОЕ (сравни кривые 3 и 1, а, б, в, соответственно). В случае добавления сывороток к OrgF_(192–342) подавление роста культуры при тех же дозах и к тому же времени составило: 61%, 77% и 72% (сравни кривые 4 и 1, а, б, в, соответственно). Пул сывороток крови десяти intactных мышей той же партии не обладал существенной антибактериальной активностью (6%, 15% и 21% торможения роста, при тех же дозах культуры *P. aeruginosa*) (кривые 1 и 2, а, б, в, соответственно). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о специфичности защитных свойств рекомбинантных белков.

Для дальнейшего исследования их иммуногенности были получены иммунные сыворотки крови кроликов (от четырех животных, иммунизированных полным белком OrgF и пяти, иммунизированных OrgF_(192–342)). Общая доза антигена на особь составила 1,5 мг (300 мкг в одной инъекции). Выбранная схема иммунизации кроликов обеспечила получение сывороток с высоким титром специфических антител к исследуемым рекомбинантным белкам (рис. 4). Об этом же свидетельствовали результаты изучения их антибактериальной активности. Средние значения подавления роста культуры *P. aeruginosa* в дозе 10^5 КОЕ составили: 61–82% для гипериммунных сывороток к OrgF и 59,5–72% в случае гипериммунных сывороток к OrgF_(192–342) (табл. 3). Сыворотка крови intactного кролика при том же разведении культуры не обладала существенной антибактериальной активностью (7% торможения роста). При использовании посевной дозы 10^4 КОЕ значения подавления роста составляли 65–79% и 53–76% для гипериммунных сывороток и 5,5% для сыворотки intactного животного (см. табл. 3).

На основании полученных данных представляло интерес оценить превентивную активность гипериммунных сывороток в сравнении с intactными образцами (табл. 4). Групповые пулы сывороток кроликов внутрибрюшинно вводили мышам за 2 ч до заражения различными дозами живой вирулентной культуры *P. aeruginosa* (от 12,5 до 1600 млн. м.к.). ЛД₅₀ в контрольной группе (intactные мыши той же партии) соответствовала 46,7 млн. м.к. При введении мышам сыворотки intactных кроликов наблюдались, как и следовало ожидать, неспецифические защитные эффекты против инфекции, вызываемой *P. aeruginosa*, при этом ИЭ оказался равным 3,2. В группах мышей, получивших

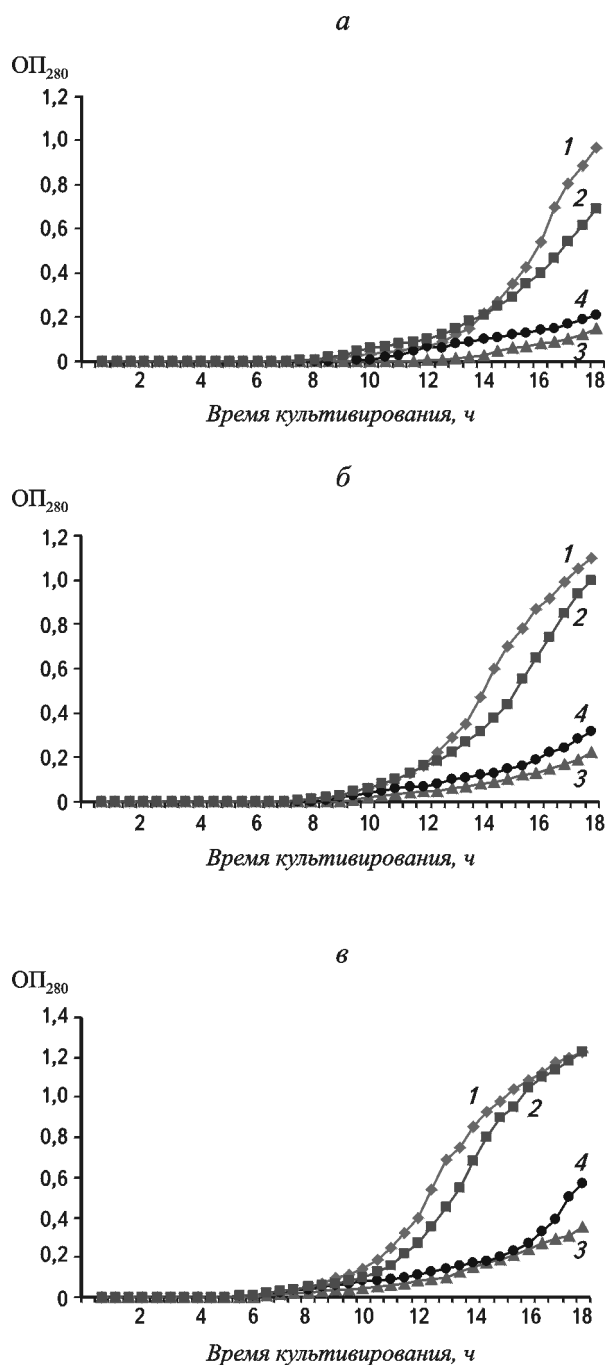


Рис. 3. Антибактериальные свойства мышинных сывороток к рекомбинантным белками OrgF и OrgF_(192–342) в тесте по угнетению роста культуры *P. aeruginosa* при различных посевных дозах: а — 10^3 КОЕ; б — 10^4 КОЕ; в — 10^5 КОЕ; 1 — контрольная культура; 2 — intactные сыворотки; 3 — сыворотки к OrgF; 4 — сыворотки к OrgF_(192–342)

до заражения иммунные сыворотки, значения ЛД₅₀ составили 303,1 млн. м.к. и 282,8 млн. м.к. для OrgF и OrgF_(192–342), соответственно. Значения индекса эффективности сывороток, полученных от иммунизированных животных, были рав-

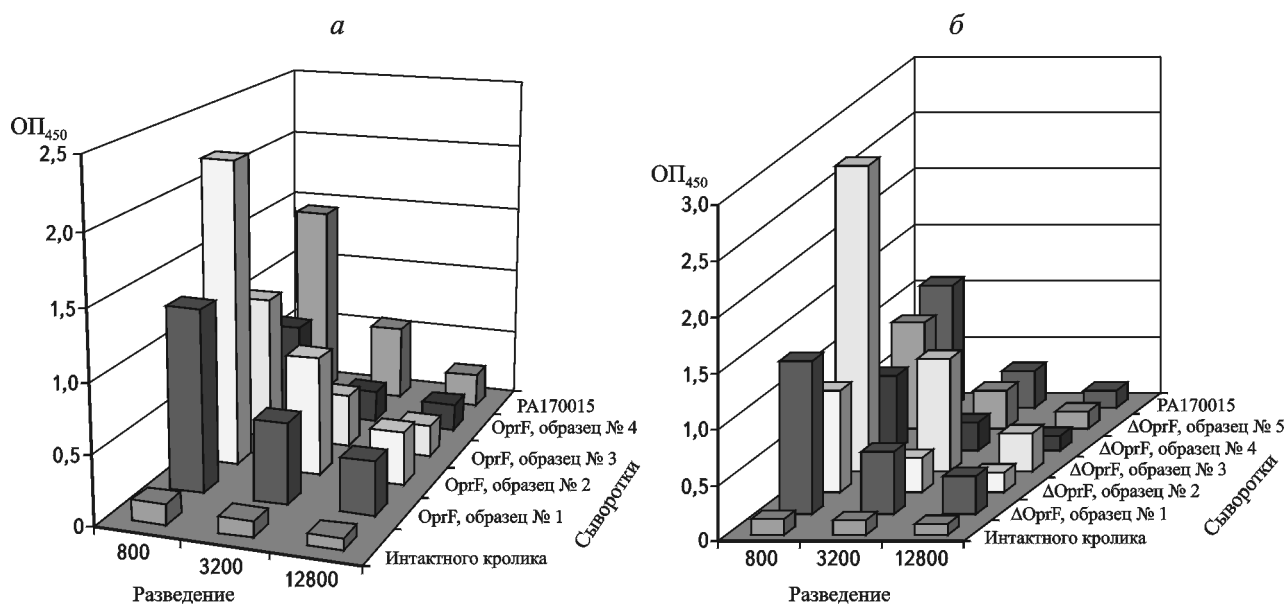


Рис. 4. Анализ в ИФА иммунных сывороток кролика к рекомбинантным белкам OprF (а) и OprF_(192–345) (б); PA 170015 — культура *P. aeruginosa*, 10⁵ КОЕ; ΔOprF = OprF_(192–345)

ны 6,5 для OprF и 6,1 для OprF_(192–342) и оказались почти в два раза выше, чем при введении сывороток интактных кроликов (3,2).

Таким образом, в результате наших исследований получены две рекомбинантные формы белка OprF, которые обладали защитными свойства-

ми от синегнойной инфекции. При этом цельный белок обладал более выраженными иммуногенными свойствами. Более низкая иммуногенность белка OprF_(192–342) может обуславливаться некорректным процессом его сборки при ренатурации, а также меньшей молекулярной массой. Получен-

Таблица 3

Антибактериальные свойства гипериммунных сывороток крови кроликов в тесте по подавлению роста культуры *P. aeruginosa*

Сыворотка кролика, иммунизированного	Подавление роста культуры <i>P. aeruginosa</i> , %	
	при посевной дозе 10 ⁴ КОЕ	при посевной дозе 10 ⁵ КОЕ
OprF, образец №1	65	61
OprF, образец №2	79	82
OprF, образец №3	79	81
OprF, образец №4	74	75
OprF _(192–342) , образец №1	64,5	72
OprF _(192–342) , образец №2	53	64,5
OprF _(192–342) , образец №3	76	68,5
OprF _(192–342) , образец №4	63	66
OprF _(192–342) , образец №5	62,5	59,5
Интактного кролика (контроль)	5,5	7

Защитные свойства сыворотки кроликов при введении мышам за 2 ч до экспериментальной инфекции, вызываемой *P. aeruginosa*

Сыворотка	Доза заражения, млн. м.к.	Количество мышей павших/выживших	ЛД ₅₀ , млн. м.к.	ИЭ
Кроликов, иммунизированных ОргF	1600	10/0	303,1±60,6 (p < 0,05)*	6,5
	800	9/1		
	400	7/3		
	200	2/8		
	100	0/10		
	50	1/9		
	25	0/10		
	12,5	0/10		
Кроликов, иммунизированных ОргF _(192–342)	1600	10/0	282,8±56,6 (p < 0,07)	6,1
	800	9/1		
	400	5/5		
	200	4/6		
	100	2/8		
	50	0/10		
	25	0/10		
	12,5	0/10		
Интактных кроликов (контроль)	1600	10/0	151,4±30,4	3,2
	800	10/0		
	400	7/3		
	200	4/6		
	100	3/7		
	50	3/7		
	25	1/9		
	12,5	1/9		
Интактных мышей (контроль)	400	10/0	46,7±9,3	–
	200	10/0		
	100	8/2		
	50	3/7		
	25	4/6		
	12,5	1/9		

* При сравнении значений с эффектом сыворотки интактных кроликов.

ные данные открывают перспективу для дальнейших исследований рекомбинантного белка OprF с целью создания вакцины против инфекций, вызываемых синегнойной палочкой.

Получено 4.08.10

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков В.Д., Рятис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонозы. — М.: Медицина, 1990.
2. Страчунский Л.С. Сравнительная активность антисинегнойных антибиотиков в отношении нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в отделениях реанимации и интенсивной терапии России / Л.С. Страчунский, Г.К. Решедько, О.У. Стецюк, А.С. Андреева, А.Г. Щербников // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2003. — № 5. — С. 35—46.
3. Руднов В.А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa* // Русский медицинский журнал. — 2005. — Т. 13. — № 7. — С. 485—490.
4. Mutharia, L.M. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains / L.M. Mutharia, T.I. Nicas, R.E.W. Hancock // J. Infect. Dis. — 1982. — N. 146. — P. 770—779.
5. Rawling, E.G. Epitope Mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* Major Outer Membrane Porin Protein OprF / E.G. Rawling, N.L. Martin, R.E. Hancock // Infect. Immun. — 1995. — V. 63(1). — P. 38—42.
6. Макаренко Т.А. Иммунологическое изучение белков клеточной стенки *Pseudomonas aeruginosa* / Т.А. Макаренко, Е.С. Станиславский // Ж. микробиол. — 1996. — № 2. — С. 7—9.
7. Lee, N.-G. Immunization of burn-patients with a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy / N.-G. Lee, S.B. Jung, B.Y. Ahn, Y.H. Kim, J.-J. Kim, D.-K. Kim, I.-S. Kim, S.M. Yoon, S.W. Nam, H.-S. Kim, W.J. Park // Vaccine. — 2000. — V. 18. — P. 1952—1961.
8. Gilleland, H.E.Jr. Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice / H.E.Jr. Gilleland, M.G. Parker, G.M. Matthews, R.D. Berg // Infect. Immun. — 1984. — N. 44. — P. 49—54.
9. Hedstrom, R.C. Antibody response of infected mice to outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* / R.C. Hedstrom, O.R. Pavlovskis, D.R. Galloway // Infect. Immun. — 1984. — N. 43. — P. 49—53.
10. Mansouri, E. Clinical study to assess the immunogenicity and safety of a recombinant *Pseudomonas aeruginosa* OprF-OprI vaccine in burn patients / E. Mansouri, S. Blome-Eberwein, J. Gabelsberger, G. Germann, B.U. von Specht // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2003. — N. 37. — P. 161—166.
11. Маниатис Т., Френч Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.
12. Sambrook, J.F., Russell, D.W. Molecular Cloning. — Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
13. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). — М.: Наука, 1981.

A.A. KALOSHIN*, E.V. GATYROVA
and N.A. MIKHAILOVA

The Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russ. Acad. Med. Sci., 105064, Moscow Russia

e-mail: alex-k-1973@yandex.ru

Obtaining of Recombinant Forms of Outer Membrane Protein F from *Pseudomonas aeruginosa* and Assessment of their Immunogenic Properties

Two recombinant forms of an outer membrane protein F (OprF) from *Pseudomonas aeruginosa* have been obtained, the full-length protein OprF and the C-terminal part of OprF protein (aa 192—342). As a result of double immunizations, these recombinant proteins provided mice with a resistance to experimental intraperitoneal challenge with *P. aeruginosa*. The best protective effects were observed when a dose of 25 µg for OprF and 50 µg for the OprF C-terminal part with indices of efficiency of 3,3 and 2,8, respectively, were used. Rabbit antisera to the recombinant proteins were also able to protect mice from the experimental infection with *P. aeruginosa*. Indices of efficiency were 6,4 for OprF and 6,0 for the OprF C-terminal part; the values are approximately two times as high as the effect of sera from intact test animals (3,2).

Key words: immunization, outer membrane protein F (OprF), *Pseudomonas aeruginosa*, recombinant protein.

* Author for correspondence.