

Получение рекомбинантного альфа-гемолизина *Staphylococcus aureus*

Научный руководитель – Калошин Алексей Алексеевич

Жамгочян Хамесд Ховсен

Студент (магистр)

МИРЭА - Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий, Кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Москва, Россия

E-mail: hamesdja9@gmail.com

Введение. В структуре заболеваний, вызываемых условно патогенными бактериями, *Staphylococcus aureus* занимает около 50 %. Стафилококковая инфекция является одной из причин эндокардитов, перитонитов, пневмоний, маститов, кератитов и сепсиса. Введение в практику здравоохранения антибиотиков привело к временному снижению заболеваемости. Однако возникновение множественной лекарственной устойчивости с образованием так называемых метициллинрезистентных штаммов вернуло этот показатель к прежнему уровню, что обуславливает целесообразность разработки антистафилококковых вакцин и иммуноглобулинов. Альфа-гемолизин является одним из основных факторов патогенности *S. aureus* и обладает высокой иммуногенной активностью. Поэтому его используют для развития протективного иммунитета и получения специфических иммуноглобулинов. Наиболее эффективным методом для получения данного антигена это создание его рекомбинантной формы с использованием бактериального продуцента на основе *Escherichia coli*.

Цель работы. Клонирование гена, кодирующего альфа-гемолизин *S. aureus* и получение соответствующего рекомбинантного белка.

Материалы и методы. Ген *hla*, кодирующий белок альфа-гемолизин, был получен методом ПЦР при использовании в качестве матрицы геномной ДНК *S. aureus* (штамм 209). Для проведения ПЦР использовали следующие праймеры: 5'-ATC ACA GGA AGC TTG CGA TGC ACC TGA TAC CCC ATT GGA и 5'-TTG TGG TTG AAT TCA TAT TCG ATT GGG CTG GCA TCA G. Прямой праймер соответствовал началу гена альфа-гемолизина *hla* и включал сайт рестрикции *Bam*HI, а обратный праймер был комплементарен нуклеотидам, фланкирующих конец гена альфа-гемолизина и имел сайт рестрикции *Hind*III. Амплифицированный ген *hla* клонировали с помощью InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas). В результате чего он был встроен в плазмиду pTZ57R. Отбор рекомбинантных клонов проводили с рестрикции анализа и секвенированием. Далее клонированный ген *hla* встроили в плазмиду pQE-30 по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III. Экспрессию рекомбинантного гена проводили с помощью ИПТГ в штамме *E. coli* M15. Анализ белков проводили в 12 % полиакриламидном геле по методу Лэммли. Очистку рекомбинантного белка осуществляли в колонке с Ni-сефарозой в 8 М буферном растворе мочевины. Для диализа использовали 50 мМ раствор Tris-HCl pH 9,0. Активность рекомбинантного альфа-гемолизина оценивали *in vitro* на эритроцитах кролика и *in vivo* белых беспородных мышях массой 14-16 г, вводя препарат внутривенно.

Результаты. В результате рестрикционного анализа и секвенирования рекомбинантных конструкций подтвердили клонирование гена *hla* и его последовательность оказалась идентичной четырем из двенадцати референс-последовательностей из базы данных GenBank (CP020741, NBSI01000003, CP019563, MTFQ01000004), которые использовали для подбора праймеров. В результате экспрессии гена *hla*, встроенного в плазмидный вектор pQE-30, под контроль модифицированного прокариотического промотора T5, синтезирован рекомбинантный белок. При электрофорезе полиакриламидном геле показано, что его размер

составлял около 35 кДа и это соответствовало расчетным данным - 34,7 кДа. Этот рекомбинантный белок был успешно хроматографически очищен и использован для оценки его функциональной активности. Показано, что рекомбинантный белок в количестве 0,88 мкг эффективно разрушал эритроциты кролика, полученные из 100 мкл цельной крови. Рекомбинантный альфа-гемолизин вводили внутривенно мышам. После введения препарата в первую неделю наблюдали угнетение жизнедеятельности животных с проявлением взъерошенности, вялости, обширных язв на коже и диареи.

Заключение. В результате проведенного исследования получен функционально активный рекомбинантный альфа-гемолизин, который в дальнейшем может быть использован при разработке стафилококкового анатоксина.