

6. Rasaei A., Honarmand, S.J., Saeidi M., Ghobadi M.-E., Khanizadeh, S. Effects of Selected Plant Growth Regulators on Bread Wheat Spike Development // Sustainable Agriculture Research; Vol. 6, No. 2; 2017.

УДК 579.61

СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ В ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Жамгочян Хамесд, аспирант кафедры микробиологии и иммунологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, hamesdja22@gmail.com

Гончаренко Анна Владимировна, к.б.н., с.н.с. группы редактирования геномов микроорганизмов, ФИЦ Биотехнологии РАН, pylaevanna@gmail.com

Шумков Михаил Сергеевич, к.б.н., с.н.с. группы редактирования геномов микроорганизмов, ФИЦ Биотехнологии РАН, shumkovm@gmail.com

Киракосян Рима Нориковна, к.б.н., доцент, кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, r.kirakosyan@rgau-msha.ru

Холера относится к особо опасным инфекциям. Ежегодно в мире регистрируется 1,3-4,0 млн. случаев заболевания, до 140 000 из которых заканчиваются смертью инфицированного [1]. В условиях локальных конфликтов, стихийных бедствий или недостаточной реализации гигиенических мероприятий профилактика холеры приобретает дополнительную актуальность. Разумным профилактическим подходом является превентивная вакцинация жителей потенциально опасных регионов. При этом наиболее перспективным видится использование вакцины на основе генетически модифицированного нетоксигенного штамма *V. cholerae*, дополненного рекомбинантным белком СtxВ. СtxВ – субъединица β холерного токсина – вызывает выраженный иммунный ответ, но в отсутствие субъединицы α (СtxА) (второго компонента токсина) не оказывает токсического действия.

Целью настоящей работы стало создание генетических конструкций для наработки β-субъединицы холерного токсина, определение оптимальных условий его индукции и предпочтительного способа выделения из бактериальной культуры.

С использованием стандартных молекулярно-биологических методов получена линейка плазмид, позволяющих произвольно запускать экспрессию *ctxB* в клетках *E. coli*. Сконструированные векторы различаются по кодируемой ими сигнальной последовательности, слитой с геном целевого белка. При активации экспрессии синтезируется химерная полипептидная молекула, содержащая СtxВ и фрагмент белка OmpA *E. coli* либо белка PelB *Erwinia carotovora* [2]. Эти последовательности обеспечивают выход нарабатываемого токсина в среду культивирования и позволяют упростить процесс его очистки.

По итогам анализа эффективности наработки CtxB при использовании различных созданных плазмид был выбран наиболее перспективный вариант конструкции. Установлено, что оптимальный выход продукта в среду культивирования наблюдается при выращивании штамма-продуцента в среде M9 с глицерином и активации экспрессии при 20°C. В этих условиях CtxB выводится из клетки и практически не задерживается в периплазме.

Особенности β -субъединицы холерного токсина дают возможность применять для его очистки метод металло-хелатной хроматографии даже в отсутствие полигистидиновых последовательностей [3]. Это позволило произвести очистку рекомбинантного CtxB из супернатанта культуры *E. coli* с использованием в качестве носителя Ni-NTA-агарозы.

По результатам подбора условий методом металл-хелатной хроматографии произведена пробная очистка рекомбинантного CtxB из культуральной жидкости (супернатанта) культуры *E. coli*, выращенной на среде M9 с глицерином; через 48 часов после индукции концентрация целевого продукта в среде может достигать значений 50 мг/л β -субъединицы холерного токсина с чистотой около 96%, при этом белок отличается стабильностью и сохраняет пентамерную структуру, что позволяет рассматривать созданную систему как перспективный инструмент промышленного синтеза рекомбинантного CtxB в медицинских и исследовательских целях.

Таким образом, нами создана генетическая система для наработки рекомбинантного CtxB в клетках *E. coli* и отработана методика его очистки. Полученный задел может быть использован как основа для разработки промышленных подходов к получению CtxB, в том числе, в качестве компонента противохолерной вакцины.

Библиографический список:

1. Ali M, Nelson AR, Lopez AL, Sack D. PLoS Negl Trop Dis, 2015, vol. 9(6): e0003832.
2. Choi L.H., Lee S.Y. Appl. Microbiol Biotechnol, 2004, vol. 64, p. 625-635.
3. Hamorsky K., Matoba N. Vaccine Design: Methods and Protocols, Vol. 2: Vaccines for Veterinary Diseases, Methods in Molecular Biology, vol. 1404.

УДК 631.461.52

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВЫХ ШТАММОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ РАСТЕНИЙ ЛЮЦЕРНЫ И ДОННИКА НА ЛЮЦЕРНЕ ИЗМЕНЧИВОЙ

Ионов Алексей Алексеевич, младший научный сотрудник, лаборатория селекции люцерны, ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», ionov-aleksei18@mail.ru