

### Библиографический список

1. Aquascaping: concept and development of underwater ecosystems Brazil [Электронный ресурс]. - Режим доступа: [http://www.uaiasi.ro/revista\\_horti/files/Nr2\\_2013/Vol%20-%2056-%202%20\\_%202013\(36\).pdf](http://www.uaiasi.ro/revista_horti/files/Nr2_2013/Vol%20-%2056-%202%20_%202013(36).pdf)
2. Echinodorus grandiflorus: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691517301205>.
3. Heteranthera zosterifolia [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://www.aquasabi.com/Heteranthera-zosterifolia>.
4. Make your aquarium a success [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://tropica.com/en/>.
5. Marsilea Hirsuta Care Guide – Planting, Growing, and Propagation [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://aquariumbreeder.com/marsilea-hirsuta-care-guide-planting-growing-and-propagation/>
6. Морфогенетический потенциал *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze (*Lamiaceae* mart.) *in vitro* [Электронный ресурс]. - Режим доступа: [https://www.elibrary.ru/download/elibrary\\_32730232\\_81795327.pdf](https://www.elibrary.ru/download/elibrary_32730232_81795327.pdf).

УДК 576.851.252.616

### ПОДГОТОВКА РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЬФА-ГЕМОЛИЗИНА ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА

**Жамгочян Хамесд**, аспирант, кафедры микробиологии и иммунологии  
Российский государственный аграрный университет МСХА им. К. А.  
Тимирязева, Москва, Россия, e-mail: [hamesdja22@gmail.com](mailto:hamesdja22@gmail.com)

**Киракосян Рима Нориковна**, к.б.н., доцент, кафедры биотехнологии,  
Российский государственный аграрный университет МСХА им. К. А.  
Тимирязева, Москва, Россия, e-mail: [r.kirakosyan@rgau-msha.ru](mailto:r.kirakosyan@rgau-msha.ru)

Научный руководитель: **Селицкая Ольга Валентиновна**, к.б.н., доцент,  
кафедры микробиологии и иммунологии Российский государственный аграрный  
университет МСХА им. К. А. Тимирязева, Москва, Россия, e-mail:  
[selitskayaolga@gmail.com](mailto:selitskayaolga@gmail.com)

**Аннотация.** Данная работа посвящена разработке способов получения рекомбинантного альфа-гемоллизина *Staphylococcus aureus*. В соответствии с выбранной темой был проведен анализ литературы как отечественных, так и зарубежных источников. В обзоре литературы представлены подробное описание и механизм действия альфа-гемоллизина, его роль в патогенезе заболеваний, ассоциированных с *S. aureus*, подходы к разработке вакцин на основе альфа-гемоллизина. Обзор включает в себя рисунки и диаграммы, что делает представленные материалы более информативными. Экспериментальная часть включает в себя использование современных высокотехнологичных методов, таких как генно-инженерные (получение

векторов для экспрессии целевого продукта), микробиологические (культивирование штаммов *E. coli* M15), биохимические (выделение и очистка белка альфа-гемолизина). Специфическую активность рекомбинантного альфа-гемолизина оценивали методами *in vitro* (на эритроцитах кролика) и *in vivo* (на лабораторных мышах). Результаты включают разделы, посвященные отдельным исследовательским задачам, получению плазмидной конструкции гена *hla*, экспрессии рекомбинантной конструкции *pTZ57R-hla*, получению, очистке и изучению специфичности рекомбинантного белка альфа-гемолизина.

**Ключевые слова.** *Staphylococcus aureus*, альфа-гемолизин, ген *hla*, *pTZ57R*, клонирование, плаزمида *pQE-30*, рекомбинантный белок, мыши.

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 [1-7].

*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 является 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* FDA 209-P (ATCC 6538-P). Для проведения ПЦР использовали следующие праймеры: 5`-GGA TCC GCA GAT TCT GAT ATT AAT ATT AAA ACC G и 5`-AAG CTT AAT TTG TCA TTT CTT CTT TTT CCC AAT C. Прямой праймер соответствовал началу гена *hla* и включал дополнительный сайт рестрикции *Bam*HI, а обратный праймер был комплементарен нуклеотидам, фланкирующих конец гена *hla* и включал дополнительный 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 рестрикционным анализом и секвенированием. Далее клонированный ген *hla* встроили в плазмиду *pQE-30* по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III. Экспрессию рекомбинантного гена проводили с использованием ИПТГ в штамме *E. coli* M15. Белки анализировали 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* на белых беспородных мышах массой 14-16 г, вводя препарат внутривнутрибрюшинно.

**Результаты.** В результате рестрикционного анализа и секвенирования рекомбинантных конструкций подтвердили клонирование гена *hla*, а его последовательность оказалась идентичной четырем из двенадцати референс-последовательностям 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 в полиакриламидном геле показано, что его размер составлял около 35 кДа, что 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 50 мкл цельной крови. Рекомбинантный альфа-гемолизин вводили внутривнутрибрюшинно мышам. После введения препарата в первую неделю наблюдали угнетение жизнедеятельности животных с проявлением взъерошенности, вялости, обширных язв на коже идиареи.

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

#### Библиографический список

1. Bhakdi S., Trantum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus* // Microbiol. Rev. 1991. 55. 4. 733-751.
2. Essmann F., Bantel H., Totzke G., et al. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation // Cell Death Differ. – 2003. 10. 11. 1260 -1272.
3. Onogawa T. Staphylococcal alpha-toxin synergistically enhances inflammation caused by bacterial components // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2002. 33. 1. 15-21.
4. Gray, G. S., and M. Kehoe. 1984. Primary sequence of the  $\alpha$ -toxin gene from *Staphylococcus aureus* Wood 46. Infect. Immun. 46:615–618.
5. O'Reilly, M., B. N. Kreiswirth, and T. J. Foster. 1990. Molecular analysis of a nonexpressed  $\alpha$ -toxin gene (*hla*) of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, p. 439–443. In R. P. Novick (ed.), Molecular biology of the staphylococci. VCH Publishers Inc, New York, N.Y.
6. Bernheimer, A. W., and L. L. Schwartz. 1963. Isolation and composition of staphylococcal alpha toxin. J. Gen. Microbiol. 30:455.
7. Harshman, S., N. Sugg, and P. Cassidy. 1988. Preparation and purification of staphylococcal alpha toxin. Methods Enzymol. 165:3–7.