

На правах рукописи



**Жеребцов Антон Павлович**

**Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его  
иммунобиологических свойств**

1.5.11. Микробиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Михайлова Наталья Александровна**

**Официальные оппоненты:**

**Суворов Александр Николаевич** – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», отдел молекулярной микробиологии имени академика РАН А.А. Тоголяна, заведующий отделом

**Царев Виктор Николаевич** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ПМБ).

Защита состоится «30» июня 2026 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.34 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1) и на сайте организации: <https://sechenov.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Калужин Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

*Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) условно-патогенная грамотрицательная подвижная неспорообразующая бактерия, имеющая ряд факторов вирулентности, играющих роль в развитии инфекции [Колесова Т.И. и соавт., 2017; Лазарева А.В. и соавт., 2015]. Важной особенностью *P. aeruginosa*, является наличие механизмов формирования лекарственной устойчивости за счет низкой проницаемости цитоплазматической мембраны, ограничивающей проникновение антибиотиков; активных эффлюкс-насосов, выводящих широкий спектр антимикробных препаратов (например, фторхинолоны,  $\beta$ -лактамы) из клетки; выработки инактивирующих ферментов, таких как  $\beta$ -лактамазы и карбапенемазы, которые расщепляют молекулы антибиотиков, а также мутации хромосомных генов [Чеботарь И.В. и соавт., 2017; Pang Z et al, 2019; Horcajada JP et al, 2019; Qin S et al, 2023]. Вышеупомянутые обстоятельства обуславливают актуальность разработки препаратов для иммунопрофилактики и иммунотерапии заболеваний, вызываемых данным микроорганизмом.

С учетом того, что *P. aeruginosa* обладает многочисленными факторами патогенности, не изучив вклад каждого в формировании иммунного ответа, невозможно создание эффективной вакцины, обеспечивающей полноценный специфический иммунитет [Moustafa DA et al, 2023]. Исследования по созданию противосинегнойной вакцины активно проводятся с середины XX века [Склеенова Е.Ю. и соавт., 2018]. По литературным данным известно, что в основе таких препаратов могут быть живые аттенуированные клетки *P. aeruginosa*, липополисахариды, поверхностные полисахариды, полисахарид - белковые конъюгаты, белки жгутика, белки наружной мембраны, пили, экстракты белков клеточной стенки, слитые белки и синтетические пептиды, несущие протективные эпитопы [Killough M et al, 2022].

При разработке вакцинных препаратов важным аспектом является правильный подбор адьюванта, увеличивающего эффективность иммунизации [Coffman RL et al, 2010; Zhao T et al, 2023]. С этой целью могут использоваться иммуностимуляторы различного происхождения, такие как: минеральные соли (например, гидроксид алюминия), эмульсии на основе сквалена, липосомы, флагеллин, аналоги монофосфориллипида А, CpG-олигодезоксинуклеотиды, сапонины, а также комбинированные адьювантные системы, нацеленные на активацию различных звеньев врожденного иммунитета [Филиппенко А.В. и соавт., 2023]. В настоящее время в качестве перспективного адьюванта рассматривают флагеллин (FlC). Он является основным структурным компонентом жгутика бактерии и агонистом TLR5 врожденной иммунной системы [Lin YJ et al, 2023]. В ряде экспериментов показано, что использование высококонсервативных доменов флагеллина *Salmonella typhimurium*, в качестве молекулярного адьюванта в составе вакцины повышает экспрессию молекул CD80, CD83, CD86 и MHCII на

поверхности дендритных клеток, приводит к увеличению секреции ИФН- $\gamma$  и  $\alpha$ -дефенсинов дендритными и НК-клетками; Т-клеточную пролиферацию и активацию антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, а также повышенную индукцию антиген-специфических IgG и IgA антител [Cui B et al, 2018; Mizel SB et al, 2010]. Данные эффекты продемонстрированы в исследованиях экспериментальных вакцин против *Y. pestis* [Frey SE et al, 2017; Honko AN et al, 2006] и вируса Западного Нила [McDonald WF et al, 2007]. Преимуществом флагеллина является возможность его применения в виде гибридных белков в составе фьюжн-вакцин совместно с рекомбинантными антигенами. Такие иммуногены индуцируют более мощную выработку антигенспецифичных IgG антител (в 10 раз и более), по сравнению с одновременным совместным введением флагеллина и антигенов [Taylor DN et al, 2011]. Данный подход был использован при изучении экспериментальных вакцин против гриппа в доклинических и I фазе клинических испытаний VAX 125 (ClinicalTrials.gov NCT00730457), а также в вакцинах против малярии [Taylor DN et al, 2011] и даже против кариеса [Sun Y et al, 2012]. В ходе I фазы клинических испытаний, при иммунизации вакцинами на основе таких гибридных белков, побочные эффекты не обнаружены. При исследовании ДНК-вакцины, предназначенной для профилактики и лечения COVID-19, в состав которой входит ген, кодирующий белок SARS-CoV-2 S1, слитый с рекомбинантным флагеллином *S. typhimurium*, получены данные указывающие о наличии долгосрочного гуморального иммунитета у мышей после иммунизации данной вакциной [Song L et al, 2023].

Значение флагеллина *P. aeruginosa*, как фактора патогенности, в развитии синегнойной инфекции, показывает целесообразность создания вакцины, содержащей в своем составе рекомбинантный флагеллин для стимуляции специфического иммунитета. Кроме того, иммуностимулирующие домены флагеллина возможно использовать не только в составе антисинегнойной вакцины, но и применять как адъювант в рецептуре иммунных препаратов против других патогенов. Однако, в настоящее время, несмотря на многочисленные исследования, иммуногенный и адъювантный потенциал флагеллина *P. aeruginosa* остаются до конца не изученными.

#### **Степень разработанности темы исследования**

Важная роль в патогенезе *P. aeruginosa* отводится жгутиковому аппарату, который опосредует ключевые этапы инфекционного процесса - колонизацию поверхностей, инициацию и образование биопленок, что, в свою очередь, обуславливает устойчивость возбудителя к антимикробным препаратам [Маянский А.Н. и соавт., 2012]. Известно, что жгутики состоят из белка - флагеллина (от *flagellum* – жгутик), а флагеллины в свою очередь способны стимулировать иммунные реакции и активировать TLR5 фактор врожденного иммунитета [Lin YJ et al, 2023].

В лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова проведены эксперименты по созданию противосинегной вакцины, получен ряд рекомбинантных белков OrgF, OrgI, делеционный вариант экзотоксина А (aTox), а также слитые конструкции проявляющие защитные свойства от экспериментальной синегной инфекции [Гатыпова Е. В. и соавт., 2008; Калошин А.А. и соавт., 2017]. Для повышения иммуногенности все рекомбинантные белки были сорбированы на гидроксиде алюминия. Дальнейшие исследования, направленные на подбор адьюванта, являются необходимым условием для обеспечения формирования более выраженного и длительного иммунного ответа при вакцинации. Перспективным кандидатом на эту роль может стать флагеллин *P. aeruginosa*, который является лигандом для рецептора врожденной иммунной системы, что обосновывает целесообразность его применения в составе экспериментального вакцинного препарата [Cui B et al, 2023].

Таким образом, детальное изучение иммунобиологических свойств рекомбинантного белка флагеллина *P. aeruginosa* позволит определить его иммуногенный потенциал и способность индуцировать протективный иммунитет.

### **Цель и задачи исследования**

**Цель работы** - получение рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa* и исследование его иммунобиологических свойств.

#### **Задачи исследования:**

1. Подобрать праймеры, клонировать нуклеотидные последовательности генов, кодирующих рекомбинантный белок FliC *P. aeruginosa* и создать штамм-продуцент рекомбинантного белка.
2. Разработать метод очистки рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* и синтезировать его в препаративном количестве.
3. Изучить иммунобиологические свойства рекомбинантного белка FliC (токсичность, протективность, антигенность и влияние на подвижность бактериальных клеток), получить иммунные сыворотки и оценить воздействие антител на биопленкообразование *P. aeruginosa*.
4. Исследовать адьювантные возможности рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* по отношению к неродственному антигену *K. pneumoniae*.
5. Получить моноклональные антитела к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa*, изучить их основные иммунохимические свойства и возможность использования в ИФА для детекции антигена.

### **Научная новизна исследования**

Впервые сконструирован штамм-продуцент *E. coli* pQE-30-FliC рекомбинантного белка флагеллина *P. aeruginosa* с использованием генно-инженерных технологий. Новизна подтверждена патентом Российской Федерации № 2793753 С1 от 05.04.2023.

Разработан оригинальный метод очистки рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa*, включающий последовательные этапы: получение телец включения, удаление примесей с использованием буферных растворов мочевины и гуанидин гидрохлорида, диализ, что обеспечивает получение не токсичного препарата со степенью чистоты 97,6 %.

Выявлены защитные свойства рекомбинантного белка FliC на модели экспериментальной синегнойной инфекции у мышей, продемонстрированы адьювантные возможности рекомбинантного белка FliC при сочетанном введении с поверхностным антигеном *K. pneumoniae*. установлено что сыворотки полученные в результате иммунизации мышей рекомбинантным белком флагеллином *P. aeruginosa* подавляют зону роста и биопленкообразование *P. aeruginosa*.

Установлено, что сыворотки полученные в результате иммунизации мышей рекомбинантным белком флагеллином подавляют зону роста и биопленкообразование *P. aeruginosa* штамма PA-103 в экспериментах *in vitro*.

Получены три гибридомы - продуцента моноклональных антител, взаимодействующие с одним участком молекулы рекомбинантного белка FliC, и показана перспектива их использования в ИФА, для детекции антигена.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные данные о свойствах рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa* расширяют представления о функциональном потенциале исследуемого белка. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что данный белок не токсичен и обладает выраженными антигенными свойствами, а также тенденцией к проявлению адьювантных свойств, что делает его перспективным кандидатом для разработки вакцин.

Штамм *E. coli* pQE-30-FliC - продуцент рекомбинантного белка FliC депонирован в коллекцию штаммов ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова и может быть использован в качестве производственного в технологии получения рекомбинантного белка при разработке вакцины против синегнойной инфекции.

Разработана оригинальная методика получения высокоочищенного, не токсичного рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* обеспечивающая чистоту 97,6 %.

### **Методология и методы исследования**

Работа выполнена в лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», г. Москва. Все

исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (протокол Учреждения № 7 от 29.09.2022).

Методология исследования спланирована в соответствии с поставленной целью. Объектом исследования стал рекомбинантный флагеллин *P. aeruginosa*, полученный в результате синтеза полноразмерной последовательности гена *fliC* с помощью ПЦР. Предметом исследования являлись иммунобиологические свойства полученного рекомбинантного белка и его адьювантные возможности. Анализ научной литературы, посвященной теме, проведен на основе формально-логистических методов исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов. В работе использованы микробиологические, молекулярно-биологические, иммунологические, биохимические, биологические и статистические методы. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволили обеспечить объективность полученных результатов и выводов.

#### **Личный вклад автора**

Научные результаты, содержащиеся в диссертации, получены автором лично и представляют собой законченное самостоятельное научное исследование. Автор принимал непосредственное участие во всех этапах работы, включая разработку дизайна исследования, научно-информационный поиск по теме диссертации, подготовку обзора литературы, определение цели и задач исследования, проведения экспериментов, статистическую обработку данных, на основании которых сформулированы основные положения работы, научно-практическая значимость исследования и выводы. Подготовка основных публикаций проведена при непосредственном участии автора.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Сконструированный штамм-продуцент *E. coli* pQE-30-FliC характеризуется высоким выходом целевого продукта при культивировании, а разработанный оригинальный метод очистки рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* позволяет получать его со степенью чистоты 97,6 %. Новизна подтверждена патентом Российской Федерации № 2793753 С1 от 05.04.2023.

2. Рекомбинантный белок FliC не токсичен, обладает защитными свойствами с индексом эффективности 3,0, при иммунизации мышей стимулирует образование специфических антител, подавляющих зону роста и био пленкообразование *P. aeruginosa*. В сочетанном использовании с поверхностным антигеном *K. pneumoniae* проявляет адьювантные свойства с индексом эффективности 6,1.

3. Полученные моноклональные антитела к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa* относятся к классу IgG, направлены к одному участку на молекуле белка и позволяют выявлять данный белок при помощи ИФА.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология, областям исследования по п. 4. «Строение микробной клетки», п. 11. «Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ», п. 12. «Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности», п. 15. «Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки».

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность результатов подтверждена проведением достаточного объёма исследований и выбором чётких, аргументированных критериев включения материала в исследование. В работе использовались актуальные методики, выполненные на современном сертифицированном оборудовании.

Основные результаты доложены и обсуждены на научно-практических конференциях: «Биотехнология: наука и практика» с 20 по 24 сентября 2021 г. в санатории Ай-Петри (пгт. Кореиз, Алушкинское шоссе, 15, Крым); Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (Москва, 30–31 марта 2021 г.); X Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» 12-16 сентября 2022 г. в экоотеле «Алые Паруса» (к.п. Сатера, Алушта, Крым); Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (Москва, 03–04 июня 2022 г.); XI международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (п. Новомихайловский Краснодарский край, Туапсинский район 11-14 Сентября 2023 г.); Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (20–21 апреля 2023 г.) (награжден дипломом I степени на конкурсе молодых ученых); Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology», в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН. ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. (Москва, 2024г.) (награжден дипломом II степени на конкурсе молодых ученых); V - объединенного иммунологического форума (Пушкинские горы, 29 июня – 5 июля 2024 г.); XII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (п. Новомихайловский Краснодарский край, Туапсинский район 9-13 Сентября 2024 г.); Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (22–23 апреля 2025 г.) (награжден дипломом I степени в секции «Микробиология»).

Апробация материалов диссертационного исследования проведена на конференции отдела микробиологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова (Протокол № 1 от 28.05.2025 г.).

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебно-методическую и научно-исследовательскую деятельность кафедры фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». Акт внедрения № 1 от 21.03.2025.

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертационного исследования опубликовано 12 печатных работ, в том числе 2 научные статьи в журналах, входящих в международные базы данных Scopus, Web of Science, Chemical Abstracts, 1 – патент, 9 – публикаций в сборниках материалов международных всероссийских и межрегиональных научных конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Материалы диссертации изложены на 128 страницах, иллюстрированы 6 таблицами и 21 рисунком. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 193 источника (их них – 66 отечественных и 127 зарубежных авторов).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

**Материалами исследования** явились вирулентные штаммы для выделения геномной ДНК и оценки иммунобиологических свойств рекомбинантного флагеллина: *P. aeruginosa* штамм PA-103 из коллекции лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, *K. pneumoniae* штамм № 204 из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова.

При клонировании генно-инженерных конструкций использовали следующие коммерческие штаммы: *Escherichia coli* M15 [pREP4] (Qiagen, США), *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, США). Для клонирования и экспрессии гена *fliC* *P. aeruginosa* использовали рекомбинантные плазмиды pTZ57R (Qiagen, США) и pQE-30 (Fermentas, Литва).

Эксперименты выполнены на прошедших карантин животных, белых беспородных мышах одного пола массой 14-16 г и 18-20 г, а также мышах линии BALB/c массой 15-18 грамм. Животных получали из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России (филиал «Андреевка»).

## Методы исследования

Методом фенол-хлороформной экстракции из штамма PA-103 *P. aeruginosa* получали образец геномной ДНК. Процедуру проводили в соответствии с общепринятыми методиками [Sambrook J et al, 2001; Маниатис Т. и соавт., 1984].

Подбор праймеров для ПЦР осуществляли с использованием полноразмерной последовательности ДНК штамма *P. aeruginosa* PA-103 (база данных GenBank) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/647734823>] в программе «Omiga 2.0».

Методы, применяемые в генной инженерии (ПЦР, лигирование, выделение ДНК, рестрикция, приготовление и трансформация компетентных клеток, сайт-направленный мутагенез) использовали в соответствии с общепринятыми протоколами [Sambrook J et al, 2001].

ПЦР-продукт клонировали в плазмидный вектор pTZ57, затем проводили лигирование и трансформацию в клетках *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Отбор клонов и рестрикционный анализ проводили методом элетрофореза в 1-1,5 % агарозном геле. Рестрикцию гена *fliC* осуществляли с использованием ферментов *Bam*HI и *Hind*III (Fermentas, Литва).

Подтверждение нуклеотидной последовательности, кодирующей рекомбинантный белок FliC в плазмидный вектор pTZ57R, проводили с помощью секвенирования в научно-производственной компании «СИНТОЛ» [Электронный ресурс <https://www.syntol.ru/>].

Ген *fliC* вырезали из неэкспрессирующего вектора pTZ57R-FliC по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III, а затем по тем же сайтам рестрикции встраивали в плазмидный вектор pQE-30.

Бактериальный продуцент рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* культивировали в среде Luria-Bertani (LB) с добавлением индуктора изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозида (ИПТГ). Электрофорез полученного белкового образца проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) в трис-трициновом буфере по методу Лэммли [Laemmli UK et al, 1970]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом по Лоури [Lowry OH et al, 1951].

Первый этап очистки заключался в получении телец включения, содержащих рекомбинантный белок FliC *P. aeruginosa*, технологию получения проводили по протоколу, описанному в работе [Калошин А.А. и соавт., 2021]. Для дальнейшей очистки рекомбинантного белка FliC, содержащегося в тельцах включения, разработана оригинальная технология [Калошин А.А. и соавт., 2023], основными этапами которой являются: 1) удаление примесей, растворимых в буфере, содержащем 8 М мочевины; 2) растворение рекомбинантного белка FliC в буфере, содержащем 6 М гуанидин хлорида; 3) перевод рекомбинантного белка FliC в нативные условия при помощи диализа против 50 мМ Tris-HCl, pH 9,0 с шестью сменами буфера.

Оценку чистоты полученной белковой фракции рекомбинантного белка FliC проводили при помощи обработки результатов электрофореза в ПААГ по Лэммли с использованием программного обеспечения Phoretix 1D (Total Lab, Великобритания).

Определение концентрации эндотоксинов в препаратах проводили с использованием количественного хромогенного ЛАЛ-теста (Nucult Biotech, Нидерланды) по конечной точке.

Для изучения острой (аномальной) токсичности белым беспородным мышам массой 18-20 гр внутрибрюшинно вводили препарат рекомбинантного белка FliC в дозах 25, 50, 100 мкг на мышь, используя 10 мышей в группе. Наблюдение за животными осуществляли в течение 7 дней. Ежедневно проверяли вес каждой особи, а также регистрировали состояние (поведенческие реакции, падеж) [Неугодова Н.П. и соавт., 2020].

Для определения протективных и адьювантных свойств рекомбинантного белка FliC, мышей массой 14-16 гр иммунизировали различными препаратами: рекомбинантный белок FliC в дозе 50 мкг/мышь; смесь рекомбинантного белка FliC и поверхностного антигена *K. pneumoniae* в дозах по 50 мкг/мышь, которые вводили внутрибрюшинно двукратно в объеме 0,5 мл на животное с интервалом 14 дней. Заражение мышей проводили через две недели после курса иммунизаций.

Через 10 - 14 сут после иммунизации у пяти мышей из каждой группы брали кровь и в сыворотке определяли титры специфических антител к рекомбинантному белку FliC с использованием иммуноферментного анализа (ИФА).

Для проведения исследования на подавление зоны роста *P. aeruginosa* полученные сыворотки с различным разведением (1:100, 1:300, 1:1000), добавляли в агаризованную LB-среду (0,3 % полужидкий агар) и разливали в 12 луночные планшеты. Культуру *P. aeruginosa* штамма PA-103 разводили до оптической плотности (ОП) 0,2 при OD600 и добавляли в центр каждой лунки планшета в объеме 0,2 мл. В качестве контроля использовали нормальную мышиную сыворотку (НМС).

Биопленкообразование *P. aeruginosa* изучали с помощью определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-луночного полистеролового стерильного планшета [O'Toole GA et al, 1999].

Для получения поликлональных антител (ПкАт) мышей линии BALB/c иммунизировали трехкратно внутрибрюшинно рекомбинантным белком FliC *P. aeruginosa* по 50 мкг в 0,5 мл физиологического раствора, рН 7,2, с двухнедельным интервалом. Через 7 дней после последней иммунизации рекомбинантным белком FliC у мышей проводили забор крови.

Для получения иммунных спленоцитов мышам трижды внутрибрюшинно вводили препарат рекомбинантного белка FliC по 50 мкг в 0,5 мл физиологического раствора. За 3 дня до гибридизации проводили последнюю, бустерную инъекцию. Интервал между инъекциями составлял 2 недели. Эксперимент проводили на 10 мышах линии BALB/c массой 15-18 гр.

Гибридизацию клеток, последующее культивирование, первичный скрининг, массовое культивирование гибридом-продуцентов *in vitro* и *in vivo*, криоконсервацию клеток, а также

очистку моноклональных антител (МкАт) с помощью насыщенного раствора сульфата аммония проводили принятыми в лаборатории методами [Broecker F et al, 2015].

Для постановки ИФА рекомбинантный белок FliC разводили в КББ до концентрации 5-10 мкг/мл и затем вносили в 96-луночный планшет (Costar, США). В лунки с сорбированным рекомбинантным белком FliC добавляли МкАт, разведенные в ФСБ. Результаты реакции оценивали по оптической плотности на фотометре с вертикальным ходом луча (Thermo Fisher, США).

Для проведения иммуноблоттинга осуществляли влажный перенос образцов из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану (0,2 мкм, Bio-Rad, США). Мембрану разрезали на полосы и инкубировали с соответствующим МкАт или ПкАт. Взаимодействие антител с рекомбинантным белком FliC оценивали по специфическому окрашиванию мембраны.

Эпитопную направленность МкАт изучали методом конкурентного ИФА. На первом этапе проводили конъюгирование МкАт с пероксидазой хрена периодатным методом [Nakane et al, 1974]. Для постановки конкурентного анализа в лунки планшета (Costar, США) одновременно вносили МкАт и МкАт-ПХ (МкАт, конъюгированные пероксидазой хрена) разных клонов, в концентрации соответствующей 50 % связыванию антител с антигеном, иммобилизованном на планшете. В качестве контроля использовали лунки с МкАт и МкАт-ПХ одного клона.

Детекцию рекомбинантного белка FliC осуществляли при помощи сэндвич – варианта ИФА. Данный вид иммуноферментного анализа проводили в нескольких вариантах, используя в качестве покрывающих поверхность планшетов ПкАт-(FliC) и МкАт-2(FliC).

Статистический анализ данных осуществляли в программе Microsoft Office Excel. Микробиологические эксперименты по оценке количественных показателей проводили не менее трех раз.

## Результаты

### Клонирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих рекомбинантный белок FliC *P. aeruginosa*

На основании анализа литературных данных, для исследования представлял интерес консервативный белок флагеллин (FliC) *P. aeruginosa*, являющийся структурным компонентом жгутика бактерии.

На первом этапе проведен анализ нуклеотидной последовательности гена *fliC*, с использованием имеющихся в открытом доступе данных геномных библиотек. Из штамма PA-103 *P. aeruginosa*, методом фенол-хлороформной экстракции получен образец геномной ДНК. При помощи биоинформационного анализа в программе «Omiga 2.0» подобраны праймеры с целью амплификации гена *fliC*, кодирующего синтез полноразмерного белка флагеллина: прямой праймер соответствовал последовательности гена *fliC* (5'-GGA TCC GCC TTG ACC GTC AAC

ACC AAC ATC G) и имел дополнительный сайт рестрикции *Vam*HI, а обратный праймер был комплементарен последовательности (5'-AAG CTT AGC GCA GCA GGC TCA GAA CCG AC).

Методом ПЦР провели амплификацию фрагмента генома *P. aeruginosa*, кодирующего полноразмерный белок флагеллин. В результате получены специфичные продукты соответствующие нуклеотидной последовательности фрагмента генома *P. aeruginosa*, кодирующего полноразмерный белок флагеллин.

На следующем этапе ПЦР-продукт клонировали в неэкспрессирующий вектор pTZ57R (Рисунок 1, дорожка 1). Далее провели лигирование и трансформацию в клетках *Escherichia coli* *DH5α*. Затем получили колонии на плотной питательной среде, которые пересевали на жидкую LB-среду. В результате из выросшей бактериальной культуры выделили плазмидную ДНК.

Отбор клонов и рестрикционный анализ проводили методом элетрофореза в 1-1,5 % агарозном геле. Рестрикцию гена *fliC* осуществляли с использованием ферментов *Vam*HI и *Hind*III (Рисунок 1, дорожка 2).

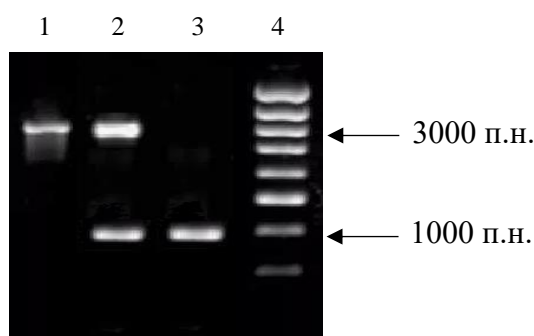


Рисунок 1 - Результаты ПЦР-амплификации последовательности нуклеотидов, кодирующих белок FliC и рестрикционный анализ генно-инженерной конструкции pTZ57R-FliC в 1 % агарозном геле.

Примечание: Дорожки: 1 – плазмидный вектор pTZ57R; 2 – генно-инженерная конструкция для получения рекомбинантного белка FliC в клетках *E. coli* штамма M15 (pTZ57R-FliC); 3 – результат ПЦР амплификации гена *fliC*; 4 – ДНК-маркер с указанными размерами п.н.

На следующем этапе, ген *fliC* вырезали из неэкспрессирующего вектора pTZ57R-FliC по сайтам рестрикции *Vam*HI и *Hind*III, а затем по тем же сайтам рестрикции встраивали в плазмидный вектор pQE-30. Далее проводили трансформацию плазмиды в клетках *E. coli* штамма M15. В процессе работы по результатам рестрикционного анализа в 1 % агарозном геле был отобран клон № 20, первый фрагмент которого соответствовал размеру контрольной плазмидной ДНК (3500 п.н.), а второй - ПЦР продукту с размером 1161 п.н. В результате получена рекомбинантная конструкция pQE-30-FliC (Рисунок 2).

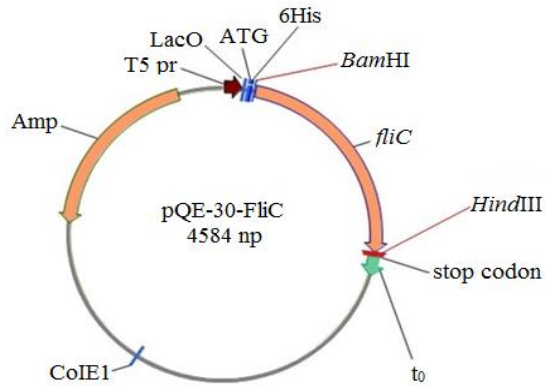


Рисунок 2 – Схема генно-инженерной конструкции pQE-30-FliC, предназначенной для синтеза рекомбинантного белка FliC.

Примечание: *Bam*HI, *Hind*III – сайты рестрикции; 6His – регион, кодирующий шесть гистидинов; ATG – стартовый кодон, кодирующий метионин; *lac*O – лактозный оперон; T5 pr – модифицированный промотор бактериофага T5; Amp – ген устойчивости к ампициллину; *to* – регион остановки транскрипции; *ColE1* – участок инициации плазмидной репликации; pr – пар нуклеотидов.

В результате секвенирования по методу Сэнгера, последовательность гена *fliC* из штамма PA-103 соответствовала последовательности нативного белка флагеллина *P. aeruginosa*.

Для синтеза рекомбинантного белка FliC использовали созданный продуцент, проводя индукцию экспрессии белка с помощью изопропил- $\beta$ -D-тиогаляктопиранозида (ИПТГ). Выход белка из 1 литра среды культивирования составил 2 г/л.

В результате проведенной работы при электрофоретическом анализе белковых продуктов, полученных при культивировании клеток *E. coli* с конструкцией pQE-30-FliC после индукции экспрессии (добавление ИПТГ), идентифицирован рекомбинантный белок с молекулярной массой 40 кДа, что соответствовало расчетным данным (40,7 кДа) (Рисунок 3).

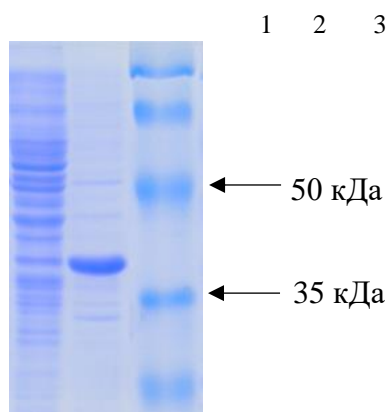


Рисунок 3 – Электрофореграмма образцов в ПААГ, полученных в результате экспрессии гена *fliC*, встроенного в плазмиду pQE-30 в клетках *E. coli* штамма M15.

Примечание: Дорожки на электрофореграмме: 1 – образец, содержащий белки из клеток штамма-продуцента FliC, полученные при выращивании штамма-продуцента в отсутствии индуктора ИПТГ; 2 – образец, содержащий белки штамма-продуцента FliC, полученные при выращивании биомассы в присутствии индуктора ИПТГ; 3 – маркер молекулярной массы белка (стрелками отмечены молекулярные массы двух маркерных белков).

Для определения концентрации рекомбинантного белка FliC в растворе проводили расчет с использованием коэффициента экстинкции 0,7, рассчитанного в программе «Omega 2.0», измерение проводили на спектрофотометре при длине волны 280 нм.

### Очистка рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa*

Очистку рекомбинантного белка FliC проводили в два этапа: непосредственное получение телец включения и их дальнейшее освобождение от примесей при помощи буферных растворов мочевины и гуанидин гидрохлорида. Полученные белковые образцы анализировали методом электрофореза в ПААГ по Лэмбли.

Поскольку рекомбинантный белок FliC, содержащийся в тельцах включения, не растворялся в буферном растворе мочевины, это свойство было решено использовать для удаления примесей других белков. Для этого тельца включения ресуспендировали в буферном растворе с 4 М мочевиной и инкубировали 30 мин (Рисунок 4, дор. 1) с последующим центрифугированием. При этом, как было показано на электрофорезе в ПААГ, супернатант не содержал потерь целевого продукта (Рисунок 4, дор. 2). Далее рекомбинантный белок FliC растворяли в течение 12 ч в буферном растворе с 6 М гуанидин гидрохлоридом с последующим центрифугированием и удалением нерастворимого осадка. Полученный супернатант, содержащий рекомбинантный белок FliC (Рисунок 4, дор. 4), подвергали диализу против 50 мМ Tris-HCl буфера, pH 9,0. Оценку чистоты полученной белковой фракции рекомбинантного белка FliC проводили при помощи обработки результатов электрофореза в ПААГ с использованием программного обеспечения Phoretix 1D, (степень чистоты составила 97,6 %).

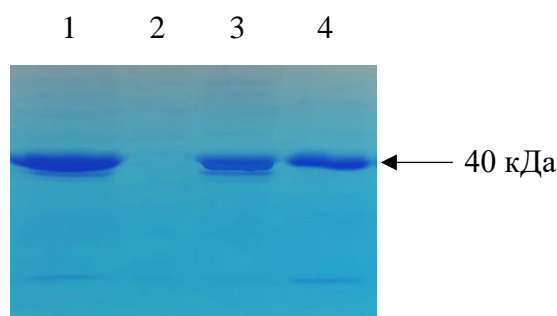


Рисунок 4 – Электрофореграмма образцов при получении очищенного препарата рекомбинантного белка FliC.

Примечание: Дорожки на электрофореграмме: 1 – образец телец включения, ресуспендированных в буферном растворе с 4 М мочевиной; 2 – образец супернатанта после центрифугирования ресуспендированных в буферном растворе с 4 М мочевиной телец включения; 3 – образец телец включения после инкубации в буферном растворе с 6 М гуанидин гидрохлоридом; 4 – образец супернатанта, содержащего рекомбинантный белок FliC, после осаждения обработанных буферным раствором с 6 М гуанидин гидрохлоридом телец включения.

### Изучение токсичности рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa*

In vivo изучена зависимость токсических эффектов от дозы рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* (Таблица 1). При оценке токсических свойств учитывали: вес животных, падеж, а также проводили оценку поведенческого фенотипирования мышей.

Таблица 1 - Результаты изменения массы тела мышей после введения рекомбинантного FliC *P. aeruginosa* в различных дозах

Препарат (Доза введения)	Средняя масса тела мышей по дням, гр (M ± SD)								Увеличение массы через 7 сут	
	Исходная	1й день	2й день	3й день	4й день	5й день	6й день	7й день	гр	%
FliC 25 мкг	19,8 ±0,87	20,0 ±0,92	20,5 ±0,98	21,0 ±1,2	21,4 ±1,21	22,0 ±1,3	22,5 ±1,38	23,1 ±1,3	3,3 ±0,9	14,2
FliC 50 мкг	20,1 ±1,0	20,3 ±1,1	20,8 ±0,98	21,3 ±1,0	21,8 ±1,12	22,2 ±1,25	22,6 ±1,2	23,2 ±1,34	3,1 ±1,0	13,3
FliC 100 мкг	20,3 ±1,20	20,5 ±1,1	20,9 ±1,13	21,3 ±1,28	21,8 ±1,3	22,4 ±1,38	22,8 ±1,3	23,4 ±1,28	3,1 ±0,8	13,2
Физ-р. 0,9 % Контроль	20,3 ±1,11	20,6 ±1,13	20,9 ±1,37	21,4 ±1,40	21,9 ±1,54	22,5 ±1,46	23,1 ±1,4	23,6 ±1,41	3,3 ±0,9	13,9

В эксперименте использовали белых беспородных мышей массой 18 – 20 г в количестве 10 особей на группу. Препарат рекомбинантного белка FliC вводили внутривентриально в дозах 25, 50 и 100 мкг на животное. В течение 7 дней фиксировали общее состояние мышей, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, состояние волосяного покрова, потребление корма и воды. В ходе исследования в опытных группах не выявлено отклонений от нормального физиологического состояния животных.

#### Исследование иммуногенных свойств рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa*

Для постановки экспериментов по изучению иммуногенных свойств рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* производили трехкратную внутривентриальную иммунизацию мышей массой 18 – 20 гр с интервалами в две недели, собирая сыворотки от пяти животных после каждого введения.

В результате ИФА выявлены высокие титры (1:512 000) специфических антител в образцах сывороток крови, взятых от 5 иммунизированных белых беспородных мышей после двукратной иммунизации. Трехкратная иммунизация не обеспечивала статистически значимого увеличения титров специфических антител.

Для оценки функциональной активности специфических антител провели исследование их влияния на подвижность бактериальных клеток *P. aeruginosa* в полужидком агаре.

В результате экспериментов выявлено, что культура *P. aeruginosa* в контрольных лунках

с добавлением нормальной мышинной сыворотки (НМС) разрасталась почти по всей поверхности контрольных лунок (Рисунок 5). В лунках с добавлением иммунных сывороток радиус зоны роста ограничивался 3-4 мм, что свидетельствовало о задержке роста бактерии (Рисунок 5).

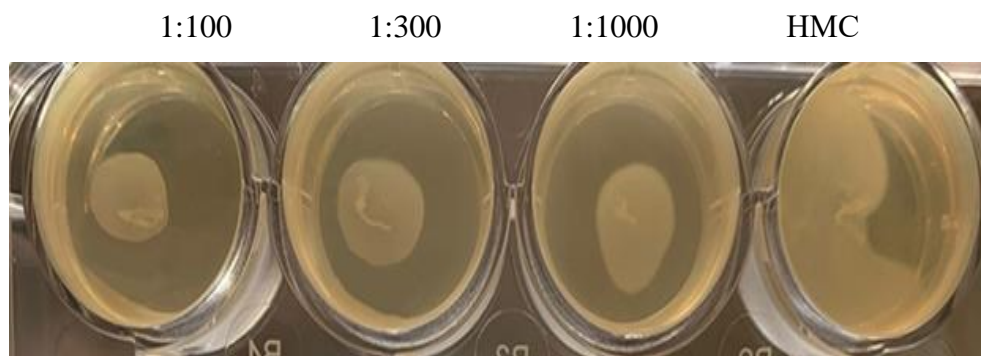


Рисунок 5 - Подавление зоны роста подвижности *P. aeruginosa* иммунными сыворотками.  
Примечание: 1:100; 1:300; 1:1000 – разведение сывороток по отношению к среде, НМС – нормальная мышинная сыворотка

Чтобы оценить влияние полученных иммунных сывороток на биопленкообразование (БПО) *P. aeruginosa* штамма РА-103 в лунки 96 луночного культурального планшета вносили сыворотку, полученную к *P. aeruginosa* и сыворотку к рекомбинантному белку FliC, в предложенных разведениях (Таблица 2). В качестве отрицательного контроля использовали НМС.

Таблица 2 – Влияние полученных сывороток на БПО *P. aeruginosa* штамма РА-103

Титр антител в сыворотке	БПО <i>P. aeruginosa</i> штамма РА-103 (ед, ОП690), Ме (Q1-Q3),		
	Образцы		
	Сыворотка к <i>P. aeruginosa</i> (n=10)	Сыворотка к рекомбинантному белку FliC (n=10)	НМС (контроль) (n=10)
1:512 000	0,12 (0,10-0,14)*	0,14 (0,12-0,15)*	0,44 (0,43-0,45)
1:256 000	0,14 (0,12-0,14)*	0,16 (0,14-0,17)*	0,46 (0,45-0,47)
1:128 000	0,15 (0,14-0,15)*	0,18 (0,17-0,19)*	0,45 (0,44-0,46)
1:64 000	0,17 (0,16-0,18)*	0,22 (0,21-0,23)*	0,50 (0,49-0,51)
1:32 000	0,21 (0,20-0,23)*	0,29 (0,27-0,30)*	0,48 (0,47-0,49)
1:16 000	0,34 (0,32-0,35) *	0,40 (0,38-0,42)	0,51 (0,50-0,51)

Продолжение таблицы 2

1:8000	0,47 (0,44-0,48)	0,45 (0,44-0,47)	0,50 (0,48-0,51)
1:4000	0,50 (0,47-0,53)	0,51 (0,48-0,52)	0,49 (0,47-0,51)
Примечание: * $p < 0,05$ — достоверность различий по сравнению с контролем (Критерий Манна-Уитни)			

В результате показано, что полученная сыворотка к рекомбинантному белку FliC с титром специфических антител 1:32 000 приводила к достоверному снижению БПО по сравнению с контрольными лунками. Сыворотка полученная к цельным клеткам *P. aeruginosa* снижала интенсивность БПО, при титре антител 1:16 000.

### **Изучение протективных и адьювантных свойств рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa***

Учитывая известные данные по адьювантным свойствам флагеллина *S. typhimurium*, представляло интерес оценить аналогичный потенциал у рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa*. Опыты по активной защите включали в себя иммунизацию мышей композицией, содержащей рекомбинантный белок FliC и поверхностный антиген *K. pneumoniae*, выбранный в качестве антигенной мишени для оценки адьювантного эффекта. Особое внимание также уделили чистоте полученного препарата, остаточное содержание ЛПС контролировали для исключения ложноположительных результатов, связанных с его неспецифическим иммуностимулирующим действием.

Для постановки экспериментов по изучению протективных и адьювантных свойств формировали 6 групп животных, которым вводили исследуемые препараты внутривенно двукратно с интервалами в 14 дней (Таблица 3). Мышей контрольных и опытных групп заражали штаммами *P. aeruginosa* PA-103 или *K. pneumoniae* № 204. В группе мышей, иммунизированных рекомбинантным белком FliC и инфицированных *P. aeruginosa* (Таблица 3, группа № 1), значение ЛД<sub>50</sub> составило 91,7 млн м.к., (индекс эффективности соответствовал 3,1), что свидетельствовало о протективном эффекте введенного рекомбинантного белка FliC в отношении *P. aeruginosa*.

Адьювантные свойства флагеллина подтверждены увеличением индекса эффективности в группах, иммунизированных комбинацией рекомбинантного FliC и антигена *K. pneumoniae* (Таблица 3, группа № 2, группа № 5). При этом защита формировалась как против родственного, так и против неродственного штамма за счет перекрестной реактивности.

Таблица 3 – Протективные и адъювантные свойства рекомбинантного белка FliC при внутрибрюшинном заражении мышей *P. aeruginosa* штамм РА-103 и *K. pneumoniae* штамм № 204

Группа животных	Заражение		Количество мышей, павших/всего	ЛД <sub>50</sub> , млн м.к. (ДИ)	ИЭ
	штамм	доза заражения, млн м.к.			
Группа № 1 – мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC	<i>P. aeruginosa</i> РА-103	200	7/8	91,7 (60,3– 147,9)	3,1
		100	5/8		
		50	1/8		
		25	0/8		
		12,5	0/8		
Группа № 2 – мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC и поверхностным антигеном <i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i> РА-103	200	4/8	154,0 (117,5– 354,8)	5,6
		100	2/8		
		50	0/8		
		25	0/8		
		12,5	0/8		
Группа № 3 – контроль (неиммунизированные мыши)	<i>P. aeruginosa</i> РА-103	100	8/8	29,7 (19,5– 44,7)	–
		50	6/8		
		25	3/8		
		12,5	1/8		
		6,25	0/8		
Группа № 4 – мыши, иммунизированные поверхностным антигеном <i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> № 204	200	4/8	129,6 (85,1– 223,9)	3,6
		100	3/8		
		50	2/8		
		25	0/8		
		12,5	0/8		
Группа № 5 – мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC и поверхностным антигеном <i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> № 204	200	2/8	218,0 (166,0– 501,2)	6,1
		100	1/8		
		50	0/8		
		25	0/8		
		12,5	0/8		
Группа № 6 – контроль (неиммунизированные мыши)	<i>K. pneumoniae</i> № 204	100	8/8	35,0 (25,1– 50,1)	–
		50	5/8		
		25	3/8		
		12,5	0/8		
		6,25	0/8		

Примечание: (ДИ) – доверительный интервал, ИЭ – индекс эффективности

Установленные иммунобиологические свойства рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* обуславливают необходимость создания специфичных средств его детекции, применимых на различных стадиях производства и очистки. В связи с этим, целью следующего этапа исследования явилось получение моноклональных антител (МкАт) к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa* для разработки метода ИФА.

### **Получение МкАт к рекомбинантному флагеллину *P. aeruginosa***

Для получения первичных гибридных культур мышей линии BALB/c массой 15-18 гр иммунизировали рекомбинантным белком FliC *P. aeruginosa*. Гибридизацию клеток проводили согласно протоколу. Соотношение клеток миеломы P3-X63-Ag8.653 (NP) и иммунных спленоцитов мыши составляло 1:5 (15 млн. клеток NP и 75 млн. иммунных спленоцитов).

В результате гибридизации из 288 засеянных лунок рост культур наблюдали в 200 лунках (эффективность слияния 69 %). По итогам первичного тестирования в непрямом ИФА из 200 растущих культур 32 являлись антителообразующими (эффективность иммунизации 16 %).

На основании данных последующих тестирований и наблюдения за ростом культур для получения препаративных количеств МкАт были отобраны три наиболее активных и стабильных клона - 1B3, 1G5 и 1G10, продуцирующие антитела к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa*. В результате клонирования от каждой культуры удалось получить по одному клону: 1B3/D2 (МкАт-1), 1G5/G7 (МкАт-2) и 1G10/D6 (МкАт-3).

### **Изучение иммунохимических свойств МкАт**

Для концентрирования и первичной очистки МкАт от балластных белков использовали метод осаждения сульфатом аммония.

Определение класса и изотипа полученной  $\gamma$ -глобулиновой фракции МкАт проводили методом непрямого ИФА. Планшеты сенсibilизировали рекомбинантным белком FliC в концентрации 5 мг/мл в КББ. Высоленные  $\gamma$ -глобулиновые фракции МкАт к рекомбинантному белку FliC титровали в диапазоне от 1:50 до 1:12800. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена козы антитела к IgA, IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

В результате установлено, что все три МкАт относятся к классу IgG, МкАт-1 относится к подклассу IgG1, а МкАт-2 и МкАт-3 – к подклассу IgG2b мыши.

Исследование взаимодействия МкАт с рекомбинантным белком FliC в иммуноблоттинге показало, что МкАт-1 и МкАт-2 специфически взаимодействовали с рекомбинантным белком FliC. Отсутствие взаимодействия МкАт-3 с иммобилизованным рекомбинантным белком FliC в проведенном анализе возможно указывает на то, что МкАт-3 распознаёт конформационно-зависимый эпитоп, который может разрушаться при денатурации белка в процессе подготовки образца для иммуноблоттинга.

Для проведения дальнейших исследований получили препаративные количества МкАт из асцитной жидкости, накопленной в брюшной полости мышей после инокуляции гибридных клеток. Концентрация белка в выделенных из асцитной жидкости МкАт-1 составила 16,7 мг/мл, МкАт-2 – 13,1 мг/мл, МкАт-3 – 11,9 мг/мл.

Определение эпитопной направленности МкАт к рекомбинантному белку FliC осуществляли методом «конкурентного» - варианта ИФА. С этой целью были приготовлены

конъюгаты МкАт, меченные пероксидазой из корня хрена. Рабочие разведения конъюгатов подбирали методом титрования в непрямом ИФА. В результате для МкАт-1-ПХ и МкАт-2-ПХ были установлены разведения равные 1:500 и 1:1000, соответственно. Конъюгат МкАт-3-ПХ с низкой активностью (титр < 1:100), которая вероятно связана со слабой афинностью МкАт-3 в дальнейших исследованиях не использовали.

Конкурентный ИФА проводили при одновременном внесении меченых и немеченых МкАт в концентрациях, соответствующих 50 % связыванию с иммобилизованным антигеном. В результате установлена высокая степень перекрестной конкуренции (> 60 % подавления связывания) между МкАт-1 и МкАт-2, что указывало на их принадлежность к одному участку на молекуле рекомбинантного белка FliC.

### Разработка иммуноферментного анализа для выявления рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa*

Разработку модельной системы для выявления рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* проводили с использованием полученных МкАт-2 и ПкАт.

Для постановки анализа планшет сенсibilизировали ПкАт в концентрации 5,0 мкг/мл, затем в лунки планшета вносили заранее приготовленные в отдельных пробирках серийные двукратные разведения рекомбинантного белка FliC в диапазоне концентраций от 5 до 0,03 мкг/мл. После инкубации в течение часа вносили конъюгат МкАт-2-ПХ в рабочем разведении 1:1000. Результаты реакции оценивали по оптической плотности на фотометре с вертикальным ходом луча (Thermo Fisher Scientific Multiskan FC, США) при длине волны 450 нм.

На рисунке 6 представлен типичный калибровочный график зависимости концентрации белка от оптической плотности.

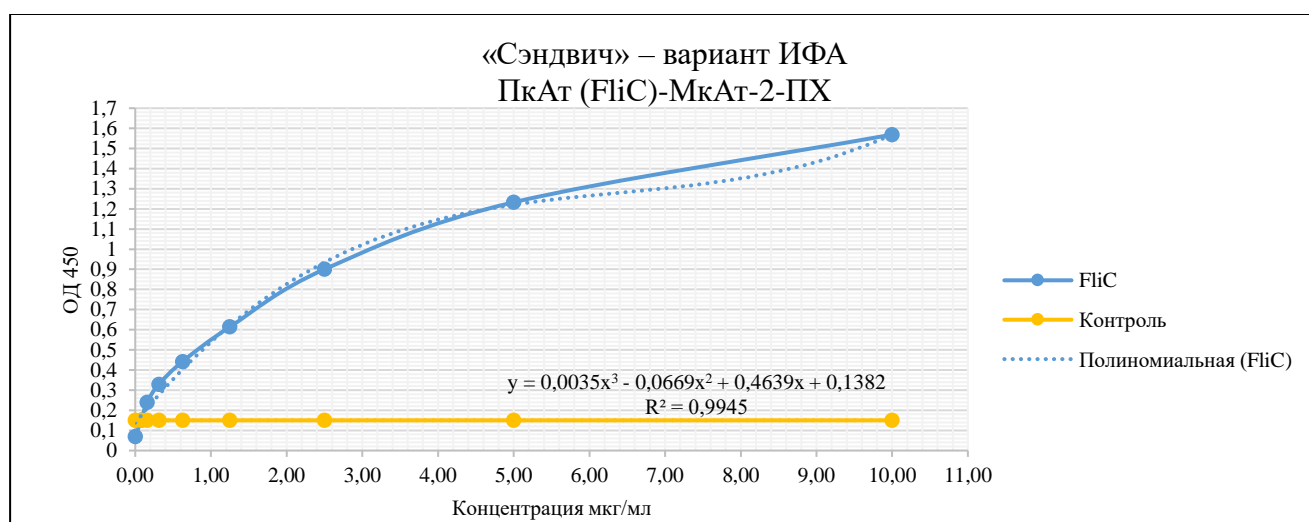


Рисунок 6 - Результаты анализа с помощью «сэндвич» – варианта ИФА ПкАт-(FliC) - МкАт-2-ПХ.

Примечание: FliC – исследуемый рекомбинантный белок, контроль – лунки с добавлением буфера, который использовали для разведения калибровочных проб.

В предварительных опытах была показана возможность детекции рекомбинантного белка FliC с чувствительностью 0,25 мкг/мл в «сэндвич» - варианте ИФА. Метод может быть использован в качестве стандартной процедуры для оценки выхода рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* на всех этапах его получения.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены три МкАт к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa*, два из которых направлены к одному участку молекулы белка, а также показана возможность использования МкАт и ПкАт для конструирования тест-системы на основе ИФА для детекции рекомбинантного белка FliC в процессе его получения.

### ВЫВОДЫ

1. Клонирована нуклеотидная последовательность гена *fliC*, кодирующая жгутиковый белок флагеллин *P. aeruginosa*, послужившая основой для создания штамма-продуцента *E. coli* с конструкцией pQE-30-FliC, при культивировании которого получен целевой продукт – рекомбинантный белок FliC *P. aeruginosa*.

2. Разработана методика очистки рекомбинантного белка FliC, состоящая из последовательных этапов: получение телец включения, удаление примесей с использованием буферных растворов мочевины и гуанидин гидрохлорида и диализа, позволившая выделить нетоксичный препарат с чистотой 97,6 %.

3. Установлено, что рекомбинантный белок FliC обладает защитными свойствами на модели экспериментальной синегнойной инфекции у мышей с индексом эффективности 3,0, а также проявляет адьювантную активность при сочетанном введении с поверхностным антигеном *K. pneumoniae*, обеспечивая индекс эффективности 6,1.

4. Выявлена способность сывороток мышей, иммунизированных рекомбинантным белком FliC *P. aeruginosa*, подавлять зону роста и биопленкообразование гомологичного штамма *in vitro*.

5. Получены три штамма гибридом, продуцирующих МкАт к одному участку на молекуле рекомбинантного белка FliC. Изучены их основные иммунохимические свойства, доказана принадлежность к классу IgG, а также специфичность связывания с рекомбинантным белком FliC в ИФА и иммуноблоттинге.

6. Показана возможность использования МкАт и ПкАт при конструировании тест-системы на основе ИФА для детекции рекомбинантного белка FliC.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученный штамм-продуцент обеспечивает стабильную экспрессию рекомбинантного белка FliC, что позволит стандартизировать и масштабировать процесс получения антигена с воспроизводимыми характеристиками.

Разработанный протокол очистки рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* обладает значительным потенциалом. Методологическая основа, заключающаяся в последовательной денатурации, солюбилизации из телец включения и ренатурации в щелочных условиях, может быть адаптирована для очистки широкого спектра других гидрофобных рекомбинантных белков, что делает метод перспективным для внедрения в стандартные биотехнологические процессы.

Разработанный ИФА на основе моно/поликлональных антител можно использовать в качестве стандартного метода для детекции рекомбинантного белка FliC на всех этапах биосинтеза и очистки.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Жеребцов, А. П.** Перспективы использования флагеллина в составе вакцин / **А. П. Жеребцов, Н. А. Михайлова** // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology*: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 30–31 марта 2021 года / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: «Издательство «Перо», 2021. – С. 14-15.
2. **Жеребцов, А. П.** Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* / **А. П. Жеребцов, А. А. Калошин, Н. А. Михайлова** // *Актуальная биотехнология*. – 2021. – № 1. – С. 182.
3. **Жеребцов, А. П.** Получение рекомбинантной формы флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa* / **А. П. Жеребцов, Н. А. Михайлова, А. А. Калошин** // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology*: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 03–04 июня 2022 года / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: «Издательство «Перо», 2022. – С. 9.
4. **Жеребцов, А. П.** Получение и исследование рекомбинантной формы флагеллина С *Pseudomonas aeruginosa* / **А. П. Жеребцов, А. А. Калошин, Н. А. Михайлова** // *Актуальная биотехнология*. – 2022. – № 1. – С. 86.
5. **Патент Российской Федерации № 2793753.** Калошин, А. А. Рекомбинантная плазмидная ДНК PPA-FLICC, кодирующая синтез рекомбинантного флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa*, штамм *Escherichia coli* PA-FLICC – продуцент гибридного рекомбинантного белка и способ получения указанного белка / А. А. Калошин, **А. П. Жеребцов, Н. А. Михайлова**, № **2022123813**: заявл. **07.07.2022**: опубл. **05.04.2023**

6. **Жеребцов, А. П.** Исследование иммуногенных свойств рекомбинантной формы флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa* / **А. П. Жеребцов, Н. А. Михайлова** // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology*: сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 20–21 апреля 2023 года / ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. – Москва: «Издательство «Перо», 2023. – С. 18.

7. **Жеребцов, А. П.** Исследование адъювантных свойств рекомбинантной формы флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa* / **А. П. Жеребцов, А. А. Калошин, Н. А. Михайлова** // *Актуальная биотехнология*. – 2023. – № 2. – С. 14.

8. Получение моноклональных антител для выявления рекомбинантного флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa* / **А. П. Жеребцов, И. В. Яковлева, Н. Ф. Гаврилова, Н. А. Михайлова** // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology*: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 23–24 апреля 2024 года. – Москва: ООО «Издательство «Перо», 2024. – С. 18-19.

9. Конструирование модельной системы для выявления рекомбинантного флагеллина с *Pseudomonas aeruginosa* в ИФА / **А. П. Жеребцов, Н. Ф. Гаврилова, И. В. Яковлева, Н. А. Михайлова** // *Актуальная биотехнология*. – 2024. – № 4. – С. 6-7.

10. **Жеребцов, А. П.** Получение рекомбинантного флагеллина С *Pseudomonas aeruginosa* и изучение его иммунобиологических свойств / **А. П. Жеребцов, А. А. Калошин, Н. А. Михайлова** // **Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение**. – 2024. – Т. 24, № 1. – С. 91-102. [Chemical Abstracts].

11. Получение моноклональных антител для детекции рекомбинантного флагеллина С *Pseudomonas aeruginosa* / **А. П. Жеребцов, И. В. Яковлева, Н. Ф. Гаврилова, Н. А. Михайлова** // **Инфекция и иммунитет**. – 2024. – Т. 14, № 3. – С. 551-556. [Scopus, Web of Science].

12. **Жеребцов, А. П.** Исследование влияния моноклональных антител к рекомбинантному флагеллину на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa* / **А. П. Жеребцов, И. В. Яковлева, Н. А. Михайлова** // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology*: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 80-летию Великой Победы, Москва, 22–23 апреля 2025 года. – Москва: ООО «Издательство «Перо», 2025. – С. 14-15.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

FlC – флагеллин

БПО – биопленкообразование

ИФА – иммуноферментный анализ

МкАт – моноклональные антитела

ПкАт – поликлональные антитела