



## МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО НlyIIС-15 ПРОТИВ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА НlyII *B. cereus* ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С САЙТОМ УЗНАВАНИЯ ТРОМБИНОМ

© 2020 г. А. В. Замятина\*, \*\*\*, Н. В. Руденко\*, #, А. П. Каратовская\*,  
А. О. Шепеляковская\*, А. В. Сиунов\*\*, Ж. И. Андреева-Ковалевская\*\*, А. С. Нагель\*\*,  
В. И. Сялямов\*\*, А. С. Колесников\*\*, Ф. А. Бровко\*, \*\*\*, А. С. Солонин\*\*, \*\*\*

\*Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН,  
Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

\*\*Федеральный исследовательский центр “Пушинский научный центр биологических исследований Российской  
академии наук”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, РАН,  
Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 5

\*\*\*Пушинский государственный естественно-научный институт, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 3

Поступила в редакцию 29.04.2020 г.

После доработки 08.05.2020 г.

Принята к публикации 11.05.2020 г.

Среди панели моноклональных антител к рекомбинантному белку НlyIIСТD *Bacillus cereus* обнаружено антитело, способное образовывать иммунный комплекс с областью узнавания тромбином, аминокислотная последовательность которой расположена внутри рекомбинантного НlyIIСТD. Локализацию эпитопа проводили методами пептидного фагового дисплея, а также иммуноферментным анализом и иммуноблоттингом по взаимодействию с рекомбинантными белками, либо содержащими, либо не содержащими отдельные компоненты НlyIIСТD. Выявленный эпитоп расположен в области тромбинового сайта и сохраняет способность взаимодействовать с антителом после протеолизотической атаки белка тромбином.

*Ключевые слова:* бактериальные порообразующие токсины, моноклональные антитела, эпитоп, фаговый дисплей, слитые рекомбинантные белки, *Bacillus cereus sensu lato*, тромбин

DOI: 10.31857/S013234232006038X

### ВВЕДЕНИЕ

Производство различных рекомбинантных белков, отдельных субъединиц, а также полипептидов обуславливает развитие биотехнологических подходов, обеспечивающих быстрый и дешевый метод их выделения в нативном виде. В рутинных экспериментальных исследованиях часто используют различные аффинные сорбенты для жидкостной хроматографии, которые позволяют быстро и эффективно очищать рекомбинантные белки с последующим удалением необходимых для хроматографии этих белков “тэгов” специфическими протеазами. Одним из широко используемых вариантов является введение участков узнавания тромбином. Тромбин (фактор свертывания II) является компонентом системы свертывания крови млекопитающих и функциониру-

ет как сайт специфическая сериновая протеаза, нечувствительная к буферным растворам, содержащим различные детергенты [1]. Этот белок распознает сайт LVPR<sup>^</sup>GS и вносит разрыв между аргинином и глицином [2]. Для изучения генеза НlyII в бактериальных клетках и взаимодействия токсина с клетками эукариот создана панель МА к С-терминальному домену порообразующего белка НlyII [3]. Данная работа посвящена описанию НlyIIС-15, которое эффективно связывается с тромбиновым сайтом гибридного белка, но не с другими пептидными участками рекомбинантного СТD.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

**Характеристика аминокислотной последовательности НlyIIСТD.** Одним из факторов вирулентности условно-патогенного микроорганизма *B. cereus* является порообразующий токсин гемолизин II (НlyII) [4]. Гемолизин II со структурой типа β-баррель имеет высокую гомологию с альфа-токсином *S. aureus* и отличается от него наличием С-терминальной аминокислотной избыточности

Сокращения: НlyIIСТD – С-терминальный домен гемолизина II *Bacillus cereus*; НlyII – гемолизин II *B. cereus*, МА – моноклональные антитела, PBS – фосфатно-солевой буфер.

# Автор для связи: (тел. +7 (926) 592-11-89;  
эл. почта: nrudkova@mail.ru).

DNQKALEEQMNSINSVNDKLNKGGKLSLSMNGNQLKATSSNAG  
YGISYEDKNWGFVNGEKVYTFNEKSTVGNISNDINKLNKGPYIEI  
KQIGTLVPR/GSMAISDPNSSSSVDKLAALAHHHHHH

**Рис. 1.** Аминокислотная последовательность НlyIICTD клонированная из НlyII *B. cereus* ATCC 14579 в рЕТ29b. Молекулярная масса клонированного СТД, 13906.59 Da. Жирными буквами выделен тромбиновый сайт, / указывает место протеолитической атаки тромбином. Курсивом обозначен участок с шестью гистидинами.

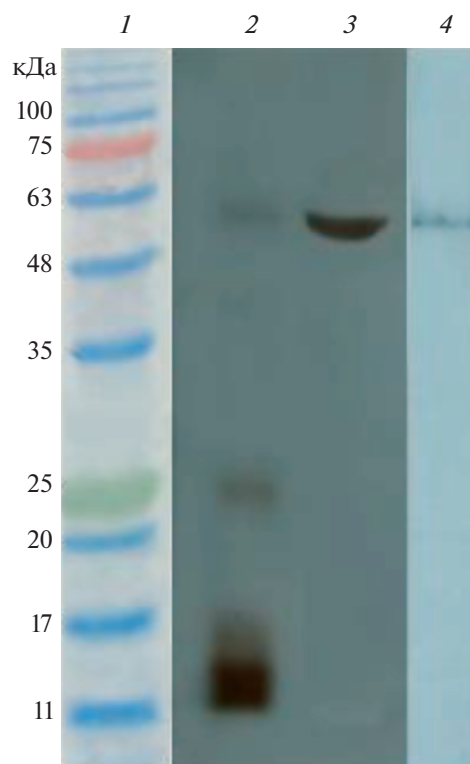
из 94 остатков [5]. Этот участок при ЯМР-анализе продемонстрировал не описанную ранее уникальную пространственную структуру [6]. Участок гена клонирован и НlyIICTD очищен как описано в работе Руденко с соавторами [3]. Аминокислотная последовательность НlyIICTD состоит из аминокислотных остатков С-концевой избыточности НlyII, тромбинового сайта, шести остатков гистидина и линкера (рис. 1).

**Особенности взаимодействия НlyIICTD с эритроцитами, выявляемые МА НlyIIС-15.** В составе панели моноклональных антител против НlyIICTD обнаружено МА номер 15 (НlyIIС-15), которое не способно узнавать антиген в момент его взаимодействия с мембранами как эритроцитов [3], так и липосом [7]. Неспособность взаимодействия НlyIIС-15 со связавшимся с эритроцитами СТД, по-видимому, определяется стерическим расположением эпитопа для этого антитела и его недоступностью относительно точки узнавания мембраны антигеном.

В работе Miles с соавторами [8] было продемонстрировано, что нативный гемолизин II и делеционный вариант, лишенный С-концевого домена, эффективно олигомеризуется как в присутствии эритроцитов, так и липосом. В связи с этим проверена возможность олигомеризации СТД в присутствии эритроцитов и липосом. На рис. 2 показан иммуноблоттинг с использованием МА НlyIIС-15. Как видно из этого рисунка НlyIICTD в присутствии эритроцитов кролика и липосом переходит в тетрамерную форму. До добавления эритроцитов и липосом кроме мономерных форм НlyIICTD видны слабоокрашенные димерные и тетрамерные формы НlyIICTD (рис. 2, дорожка 2). При инкубировании НlyIICTD с эритроцитами МА НlyIIС-15 выявляло тетрамерные формы, в то время как мономерные формы не видны (рис. 2, дорожка 3). Аналогичные результаты были получены при инкубировании НlyIICTD с липосомами (рис. 2, дорожка 4). Таким образом, НlyIIС-15 способно эффективно взаимодействовать с СТД, а эпитоп, узнаваемый этим антителом, расположен на поверхности и доступен МА НlyIIС-15 как у мономерных форм антигена, так и его тетрамерных форм.

**Пептидный фаговый дисплей.** Особенности взаимодействия НlyIICTD с эритроцитами, выявленные с помощью НlyIIС-15, поставили задачу

определения эпитопа, узнаваемого этим антителом. Антигенную детерминанту НlyIICTD, узнаваемую МА НlyIIС-15, определяли методом пептидного фагового дисплея. В этом методе возможные пептидные варианты экспрессируются на поверхности фагового вириона. Отбор фагов, несущих пептидные аминокислотные последовательности, специфически взаимодействующие с МА НlyIIС-15, проводили по способности взаимодействовать друг с другом. Было проведено три раунда селекции. ДНК отобранных индивидуальных фаговых клонов секвенировали. С помощью программы GeneRuner проведен анализ полученных нуклеотидных последовательностей и определены аминокислотные последовательности пептидов, узнаваемых МА НlyIIС-15 и экспонированных в составе белка рIII бактериофагов.



**Рис. 2.** Иммуноблоттинг НlyIICTD до (2) и после (3) инкубации с эритроцитами и с липосомами (4). Окрашено МА НlyIIС-15. (1) – маркеры молекулярных масс.

**Таблица 1.** Выравнивание участка аминокислотной последовательности HlyIICTD из HlyII *Bacillus cereus* и секвенированных пептидов

Номера клонов	Фрагмент HlyIICTD VGNISNDINKLNKIPYIEIKQIGTLVPRGSMASDPNSSSVDKLAAAL
1, 4, 5	-----LQVPRAQHHAIT-----
2	-----WSGALIPRNSTF-----
3	-----NNAPPPPLLFYH-----
6, 8	-----IPSPFNLIIPRYA-----
7	-----IEPDVRGSLIPR-----
9	-----YLSTPSGSLVPR-----
10	-----SVQTLNLIIPRQF-----
11, 12	-----HLLVPRFDVHSM-----

**Таблица 2.** Белки, использованные для иммуноблоттинга

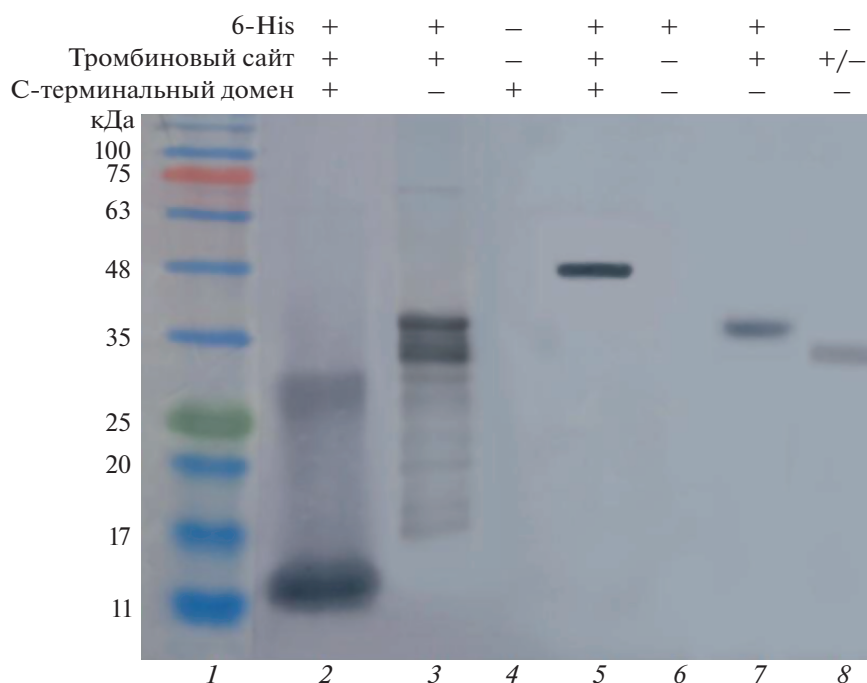
Белок	Рекомбинантная плаزمиды (вектор)	Источник гена	Ссылка/от кого получено
HlyII	pBD170-EN2	<i>B. cereus</i> B771	[19]
HlyIICTD	pET29b	<i>B. cereus</i> 14579 <sup>T</sup>	[3]
HlyII 6His	pSWEET-bgaB	<i>B. cereus</i> 14579 <sup>T</sup>	Лаб. молекулярной микробиологии ИБФМ РАН
HlyIIΔC	pET29b	<i>B. cereus</i> 14579 <sup>T</sup>	Лаб. молекулярной микробиологии ИБФМ РАН
PlcR	pET33b	<i>B. cereus</i> ATCC 4342 <sup>T</sup>	к.б.н. А.М. Шадрин
HlyIIR	pHR	<i>B. cereus</i> B771	[20]

После трех раундов аффинной селекции из неамплифицированного элюата последнего раунда отобраны 30 фаговых клонов. После анализа их взаимодействия с МА HlyIIС-15 отобрано 12 клонов, в которых определена последовательность экспонируемого фагом пептида. Аминокислотные последовательности всех пептидов были выравнены и обнаружено четыре консенсусных аминокислотных остатка (а.о.) LVPR. Причем в клонах 7 и 9 данная консенсусная последовательность непосредственно примыкает к глициновому линкеру, с помощью которого пептиды соединены с последовательностью структурного белка рIII бактериофага. Следовательно, протяженность участка узнавания МА HlyIIС-15 может включать либо четыре LVPR, либо пять а.о. — LVPRG. Остаток глицина является искусственно привнесенным в рекомбинантный белок пептидным фрагментом и выявленный пептид почти полностью соответствующим участку узнавания тромбина LVPR<sup>Δ</sup>GS.

**Экспериментальное подтверждение локализации эпитопа, узнаваемого МА HlyIIС-15 методами иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга.** С помощью иммуноферментного анализа сравнивали взаимодействие МА HlyIIС-15 со следующими препаратами: HlyIICTD, нативным делеционным вариантом HlyIIΔC (без С-терминального участка), содержащим тромбиновый сайт, а также с нативным препаратом HlyII, не содержащим тромбино-

вый сайт. HlyIIΔC и HlyIICTD, содержали шесть гистидиновых аминокислотных остатков. HlyII содержал интактный район, соответствующий С-концевой избыточности порообразующего токсина HlyII *B. cereus*. В результате иммуноферментного анализа показано, что при эффективном взаимодействии с HlyIICTD и HlyIIΔC, МА HlyIIС-15 не узнавали нативный HlyII, не содержащий тромбиновый сайт, что подтверждает результаты, полученные фаговым дисплеем о том, что эпитоп, узнаваемый HlyIIС-15 включает в себя сайт, узнаваемый тромбином.

Для подтверждения эпитопа узнаваемого HlyIIС-15 использовали иммуноблоттинг, в котором проверяли взаимодействие антител наряду с HlyIICTD с рекомбинантными белками PlcR [9], HlyII, делеционным вариантом HlyIIΔC и HlyIIR (репрессор гемолизина II) [10], а также нативным гемолизином II *B. cereus* B771, клонированным в *Bacillus subtilis* BD170 (табл. 2). На рис. 3 продемонстрировано, что МА HlyIIС-15 способно образовывать иммунный комплекс с образцами, содержащими тромбиновый сайт и дополнительных шесть гистидиновых остатков, но не образует подобных комплексов с полноразмерным HlyII дикого типа, не содержащего ни тромбиновый сайт ни шесть гистидиновых аминокислотных остатков. Итак, для образования иммунного комплекса, исследуемого антитела с С-концевым участком HlyII



**Рис. 3.** Иммуноблоттинг с использованием NlyIIС-15. 1 – белки молекулярной массы, 2 – CTD, 3 – NlyIIΔC, 4 – Гемолизин II *B. cereus* V771, клонированный в *Bacillus subtilis*, 5 – NlyII6His, 6 – NlyIIR, 7 – PlcR, 8 – PlcR, обработанный тромбином.

в рекомбинантном белке, необходимо присутствие дополнительных районов, включающих шесть гистидиновых остатков, пептидный линкер и сайт, узнаваемый тромбином. Это предположение было подтверждено способностью МА NlyIIС-15 узнавать рекомбинантный транскрипционный регулятор PlcR *B. cereus*, содержащий тромбиновый сайт, линкер и шестигистидиновый участок в N-концевой части этого белка. Дополнительным доказательством узнавания МА NlyIIС-15 района, расположенного за пределами С-концевого домена NlyII, является способность образовывать иммунный комплекс рекомбинантного белка, лишённого CTD, но содержащего тромбиновый сайт, линкер и шестигистидиновый участок в С-концевой части этого белка. В связи с тем, что NlyIIR, содержащий шесть гистидиновых остатков в N-концевой части, не способен образовывать иммунный комплекс с МА NlyIIС-15 можно заключить, что для узнавания МА своего антигена необходима область тромбинового сайта.

Рекомбинантные белки, содержащие тромбиновый сайт (NlyIICTD и PlcR) были обработаны тромбином. После чего электрофоретическая подвижность белков изменялась в сторону уменьшения молекулярного веса. Интенсивность окрашивания PlcR МА NlyIIС-15 также уменьшалась, что может свидетельствовать о снижении степени связывания антитела с антигеном при удалении части аминокислотных остатков, входящих в эпи-

топ. Анализ возможности взаимодействия рекомбинантных белков, содержащих тромбиновый сайт, линкер и шестигистидиновый участок на разных концах рекомбинантных белков после обработки тромбином позволил подтвердить, что район узнавания МА NlyIIС-15 расположен в области тромбинового сайта. Как видно из рисунка PlcR, содержащий тромбиновый сайт с линкером и шестью гистидиновыми остатками на N-конце, после обработки тромбином снижает, но сохраняет способность окрашиваться NlyIIС-15, это позволило заключить, что МА NlyIIС-15 способно узнавать более широкий участок, чем определено фаговым дисплеем. Аналогичный результат получен после обработки тромбином NlyIICTD. По-видимому, ключевыми аминокислотными остатками эпитопа являются составляющие сайта узнавания тромбином и плюс, возможно, часть из района окружения этого сайта (рис. 4). После протеолиза тромбином рекомбинантного NlyIICTD, содержащего тромбиновый сайт с линкером и шестью гистидиновыми остатками на С-конце белок взаимодействовал с МА NlyIIС-15, что может однозначно указывать на узнавание этим антителом как минимум четырех аминокислотных оснований LVPR, входящих в состав тромбинового сайта (данные не приведены).

Таким образом, район расположения экспериментально детектируемого эпитопа подтверждает определение этого эпитопа пептидным фаговым

С-рекомбинантный белок-gtlvpr/gsmainsdpnsssvdklaaaleНННННН  
 N-mgssННННННsslvpr/gshmasr-рекомбинантный белок

**Рис. 4.** Сравнение участков аминокислотных последовательностей при их различной локализации: С-концевая локализация тромбинового сайта и N-концевая локализация тромбинового сайта. Жирными буквами обозначен сайт узнавания тромбином. / – указывает место протеолитической атаки тромбином. Заглавными буквами обозначен участок, содержащий шесть гистидиновых остатков.

дисплеем. Четырех аминокислот LVPR достаточно для узнавания МА НlyIIС-15.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В течение долгого времени очистка и получение высокоочищенных белков было довольно затратным как по времени, так и затратам, особенно это касалось белков, взаимодействующих с мембранами. Применение современных генно-инженерных технологий частично решило эту проблему. Для получения рекомбинантных белков созданы многочисленные экспрессионные системы с промоторами, обеспечивающими высокий уровень транскрипции гибридных генов в различных бактериальных и грибных системах. В связи с тем, что вопрос как о потенциальной токсичности химических индукторов экспрессии, так и токсичности конечных искомым продуктов до сих пор остается открытым, широко используются ранее описанные варианты инициации биосинтеза, посредством индуктора или температурного сдвига. В этом случае последовательность целевого гена помещается под контроль эффективных фаговых промоторов [11–13]. Для повышения растворимости, уровня экспрессии, а также эффективной очистки аффинной хроматографией к N- или С-концам рекомбинантных белков присоединяют короткие маркерные аминокислотные последовательности, получившие название “fusion tags” [14]. Получение рекомбинантного белка в растворимой форме иногда удается решить присоединением вспомогательной последовательности – хорошо растворимого белка-партнера [15]. Однако, как в первом, так и во втором случае конечный продукт отягощен дополнительными белковыми участками и не является нативным продуктом. На передний план выходит цель в производстве различных рекомбинантных белков, отдельных субъединиц, а также полипептидов, восстановление конечных продуктов в нативном виде. Эта цель достигается введением дополнительных пептидных районов, узнаваемых высоко специфическими протеазами, которые способны отщеплять используемые тэги и восстанавливать рекомбинантные белки практически до нативного состояния. Создание технологии получения рекомбинантных белков или пептидов с использованием протеолитического расщепления всегда является задачей, требующей индивидуального

решения для каждого продукта. Одной из часто используемых высокоспецифичных протеаз является тромбин. После фермент-зависимого протеолиза тромбин может быть легко удален посредством жидкостной хроматографии, предназначенной для очистки или удаления сериновых протеаз. Однако использование тромбина ограничивается лабораторными исследованиями [16]. Наиболее существенным недостатком протеазы является способ ее получения из плазмы крови млекопитающих.

Таким образом, в данной работе описано МА НlyIIС-15, выявляющее тромбиновый сайт за пределами структурной части клонированного белка, содержащего этот сайт. Результаты данной работы предполагают расширение возможностей использования тромбина и сайта его узнавания не только для отсеивания дополнительных пептидных участков, но и в качестве маркера для идентификации и отслеживания различных рекомбинантных белков.

Учитывая, что тромбин активирует факторы свертывания крови V, VIII, VII, XI, XIII, протеин С, тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза [17], то есть они имеют в своем составе пептидные участки, узнаваемые этим белком, МА НlyIIС-15, связывающееся с участком разрезания тромбином, можно использовать для массового анализа образцов при исследовании различных патологий системы свертывания крови. Медицинская практика последних месяцев показала, что при инфекции COVID-19 у пациентов в тяжелой форме наблюдается образование странных тромбов в крови [18]. У ряда больных отмечались признаки сгущения крови и образования тромбов в разных органах. Нейрохирурги отмечают резкий всплеск инсультов из-за тромбов, а патологоанатомы наблюдали при вскрытии легкие, наполненные сотнями микротромбов. В связи с этим использование МА НlyII-15, может оказаться удачным инструментом в изучении и понимании процессов свертывания крови в ходе инфекции COVID-19.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Штаммы плазмиды и белки.** *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Германия) была использована для трансформации рЕТ29b(+) (Novagen, Германия), *E. coli* ER2738 для аффинной селекции фагов.

**Среды и растворы.** Среды: 2YT (16 г/л бакто-триптон, 1 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl, pH 7.0), 1.5% агар и 0.7% агар на основе 2YT. Растворы: 1000× IPTG/X-gal 1.25 г IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) и 1 г X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) в 25 мл DMF (dimethyl formamide), тетрациклин 20 мг/мл в 50% этаноле, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), PBST–PBS, содержащий 0.1% Tween-20, блокирующий раствор 1% желатин на основе PBS-T, преципитирующий раствор PEG/NaCl (20% (w/v) полиэтиленгликоль-6000, 2.5 M NaCl). Белковые маркеры (Abscam, Англия) и ДНК электрофорезные маркеры (Fermentas, Литва), конъюгат антител козла с пероксидазой хрена (Thermo Scientific, США), конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (Thermo Scientific, США).

**Фаговая пептидная библиотека.** В работе для определения эпитопа на молекуле NlyIICTD использовали библиотеку случайных пептидов из 12 аминокислотных остатков (New England Biolabs), отображаемых на фаге M13KE [21]. 12-Мерная фаговая пептидная библиотека имеет репертуар  $10^9$ , пептиды экспонированы на поверхности бактериофагов в составе минорного белка рIII. Каждый клон в библиотеке представлен ~1000 копий.

**Аффинная селекция бактериофагов,** специфически взаимодействующих с MA NlyIIС-15, проводилась в соответствии с инструкцией к фаговой библиотеке с некоторыми модификациями. Для проведения всех трех раундов селекции MA NlyIIС-15 сорбировали на планшеты для иммуноферментного анализа (Greiner, high binding, США) из концентрации 10 мкг/мл в объеме 100 мкл в Na-карбонатном буфере pH 9.6, в течение ночи, при 4°C. Для каждого раунда использовали по 8 лунок. Для предотвращения возможной неспецифической сорбции иммунопланшеты инкубировали с блокирующим буфером в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее к экспериментальным лункам добавляли по 10 мкл фаговой библиотеки с концентрацией частиц  $3.8 \times 10^{12}$  частиц/мл. Инкубировали в течение ночи при 4°C. После инкубации с фаговыми частицами иммунопланшеты отмывали не менее 10 раз PBST. Элюцию связавшихся фагов проводили добавлением в лунки 100 мкл суспензии клеток *E. coli* (штамм ER2738), находящихся в экспоненциальной фазе роста ( $OD_{600} \sim 0.5$ ) с последующей инкубацией при 37°C в течение 45 минут, на этом этапе происходило инфицирование клеток бактериофагами. Далее *E. coli* собирали из лунок и переносили в колбы с 20 мл среды 2YT, содержащей 20 мкг/мл тетрациклина и культивировали в течение ночи на качалке при 200 об./мин и 37°C для амплификации элюированных бактериофагов. Параллельно с этим определяли количество элюированных бактериофагов методом выращивания в полужидком агаре. После треть-

го раунда элюат не амплифицировали. Для изоляции отдельных фагов его титровали на чувствительной культуре и переносили индивидуальные негативные колонии фаговых клонов в пробирки с 5 мл среды 2YT, содержащей разведенную 1 : 100 ночную культуру ER2738. Проводили отдельную амплификацию фаговых клонов в течение ночи на термошейкере при 37°C.

Фаговые клоны, взаимодействующие с MA NlyIIС-15 наилучшим образом, были выбраны по результатам твердофазного иммуноферментного анализа их взаимодействия с сорбированными MA NlyIIС-15. Взаимодействие выявляли с помощью кроличьих поликлональных антител против M13 и антител козла против иммуноглобулинов кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена. Бактериофаги этих клонов были использованы для выделения и секвенирования ДНК.

**Выращивание бактериофагов в полужидком агаре.** 5 мл среды 2YT с тетрациклином инокулировали 50 мкл ночной культуры *E. coli* (штамм ER2738) и культивировали при 37°C до плотности суспензии, соответствующей  $OD_{600} \sim 0.5$ . Готовили чашки Петри с агаризованной средой (1.5% агар на основе 2YT) с IPTG/X-gal и тетрациклином. Полужидкий агар расплавляли на водяной бане и разливали по 3 мл в стерильные культуральные пробирки, поддерживая температуру 45°C. К 3 мл полужидкого агара добавляли 20 мкл суспензии *E. coli* в экспоненциальной фазе роста и 50 мкл препарата, содержащего бактериофаги (на этапе проведения раундов селекции – инфицированные клетки). В случае необходимости предварительно делали серийные разведения препаратов бактериофагов. Полученную смесь быстро выливали и распределяли поверх агаризованной среды. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C, после чего подсчитывали количество негативных колоний фаговых клонов – бляшек.

**Выделение ДНК бактериофагов.** Ночную культуру *E. coli* зараженных индивидуальными клонными бактериофагов центрифугировали 10 минут при  $5000 \times g$ , 4°C. Бактериофаги выделяли из супернатанта путем осаждения полиэтиленгликолем MW 6000 в присутствии высокой концентрации NaCl [21]. Концентрацию фаговых частиц в супернатанте определяли спектрофотометрически при длине волны 269 нм и рассчитывали по формуле [ф.ч.] =  $(2 \times 10^{14} \times A_{269})/30$ . Одноцепочечную ДНК индивидуальных клонов выделяли методом фенольной экстракции с последующим осаждением этиловым спиртом [22].

**Секвенирование ДНК.** Анализ последовательностей ДНК потомков фаговых клонов для определения последовательностей встроок проводили в компании Евроген. Обработка результатов секвенирования производилась в программах Gene Runner, ClustalW.

**Наработка липосом.** Липосомы готовили из раствора лецитина в концентрации 1 мг/мл в смеси хлороформа и метанола (молярное отношение, 2 : 1). После сушки под вакуумом, липидную пленку ресуспендировали в буфере (10 мМ Трис-НСl, рН 7.2, 100 мМ КСl) до общей концентрации липидов 1 мг/мл. Липосомы получали обработкой ультразвуком в течение 30 мин на льду [4]. Олигомерные формы НlyIIСТD выявляли после электрофоретического разделения смеси НlyIIСТD (9 мкМ) с липосомами, предварительно инкубированными в течение 1 часа, при 37°C, и переноса на нитроцеллюлозную мембрану с последующим окрашиванием МА НlyIIС-15.

**Иммуноблоттинг.** Электрофоретическое разделение белков в исследуемых препаратах проводили в присутствии β-меркаптоэтанола как в работе [23]. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану проводили в течение 15 ч при силе тока 20 мА в буфере, содержащем 25 мМ Трис-НСl, 0.25 М глицин, 0.1% додецилсульфат натрия, 20% метанол, рН 8.3. Центры неспецифической сорбции блокировали добавлением 1% (w/v) раствора желатина в РВST в течение 30 мин. Далее мембраны инкубировали в течение 2 ч с МА НlyIIС-15 (10 мкг/мл). После инкубации с антителами мембраны обрабатывали 1 ч конъюгатом пероксидазы хрена с кроличьими антителами к иммуноглобулинам мыши в разведении согласно рекомендации производителя (Thermo Scientific, США) в РВST. На каждой стадии нитроцеллюлозные мембраны тщательно отмывали РВST. Мембрану окрашивали раствором, содержащим 3 мМ диаминобензидина-3,3 тетрагидрохлорида (Sigma-Aldrich, США) и 0.03% перекиси водорода.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н. А. М. Шадрину за предоставленные препараты PlcR из *B. cereus*.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00592.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andrew M., Paes B., Milner R., Johnston M., Mitchell L., Tollefsen D.M., Powers P. // *Blood*. 1987. V. 70. P. 165–172.
2. Vergis J.M., Wiener M.C. // *Protein Expr Purif*. 2011. V. 78. P. 139–142. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.04.011>
3. Руденко Н.В., Каратовская А.П., Замятина А.В., Сиунов А.В., Андреева-Ковалевская Ж.И., Нагель А.С., Бровко Ф.А., Солонин А.С. // *Биоорганическая химия*. 2020. Т. 46. С. 280–285. [Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Zamyatina A.V., Siunov A.V., Andreeva-Kovalevskaya Zh.I., Nagel A.S., Brovko F.A., Solonin A.S. // *Rus. J. Bioorg. Chem*. 2020. V. 46. P. 321–326.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020030188>
4. Andreeva Z.I., Nesterenko V.F., Fomkina M.G., Ternovsky V.I., Suzina N.E., Bakulina A.Y., Solonin A.S., Sineva E.V. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. V. 1768. P. 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.004>
5. Baida G., Budarina Z. I., Kuzmin N.P., Solonin A.S. // *FEMS Microbiol. Lett*. 1999. V. 180. P. 7–14.
6. Kaplan A.R., Kaus K., De S., Olson R., Alexandrescu A.T. // *Sci. Rep*. 2017. V. 7. P. 3277. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02917-4>
7. Замятина А.В., Руденко Н.В., Каратовская А.П., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бровко Ф.А., Солонин А.С. // *Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов*. 2019. С. 95–97.
8. Miles G., Bayley H., Cheley S. // *Protein Sci*. 2002. V. 11. P. 1813–1824.
9. Huillet E., Bridoux L., Barboza I., Lemy C., André-Leroux G., Lereclus D. // *Microbiology*. 2020. V. 166. P. 398–410. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000883>
10. Kovalevskiy O.V., Lebedev A.A., Surin A.K., Solonin A.S., Antson A.A. // *J. Mol. Biol*. 2007. V. 365. P. 825–834.
11. Солонин А.С., Тяняшин В.И., Баев А.С. Новые плазмидные вектора, содержащие регуляторный район фага лямбда // Докл. Акад. наук. СССР. 1979. Т. 245. С. 722–725.
12. Kosykh V.G., Solonin A.S., Buryanov Ya.I., Bayev A.A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1981. V. 655. P. 102–106.
13. Soriano E., Borth N., Katinger H., Mattanovich D. // *Biotechnol. Bioeng*. 2002. V. 80. P. 93–99.
14. Terpe K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2003. V. 60. P. 523–533.
15. Baubichon-Cortay H., Baggetto L.G., Dayan G., Di Pietro A. // *J. Biol. Chem*. 1994. V. 269. P. 22983–22989.
16. Hemker H.C., Al Dieri R., De Smedt E., Béguin S. // *Thromb Haemost*. 2006. V. 96. P. 553–561.
17. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z.J. // *Thromb Haemost*. 2020. V. 18. P. 844–847. <https://doi.org/10.1111/jth.1476832073213>
18. Han H., Yang L., Liu R., Liu F., Wu K.L., Li J., Liu X.H., Zhu C.L. // *Clin. Chem. Lab. Med*. 2020. pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2020-0188/cclm-2020-0188.xml. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0188>

19. *Sineva E.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Shadrin A.M., Gerasimov Y.L., Ternovsky V.I., Teplova V.V., Yurkova T.V., Solonin A.S.* // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 299. P. 110–119.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01742.x>
20. *Budarina Z.I., Nikitin D.V., Zenkin N., Zakharova M., Semenova E., Shlyapnikov M.G., Rodikova E.A., Masyukova S., Ogarkov O., Baida G.E., Solonin A.S., Severinov K.A.* // Microbiology. 2004. V. 150 (Pt 11). P. 3691–3701.
21. *Reddy P., McKenney K.* // Biotechniques. 1996. V. 20. P. 854–860.
22. Ph.D.<sup>TM</sup> Phage Display Libraries. Instruction Manual. Version 3.0 11/18. New England Biolabs, Inc.
23. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

## HlyII C 15 Monoclonal Antibody against the C-Terminal Domain of *B. cereus* HlyII Interacts with the Thrombin Recognition Site

A. V. Zamyatina<sup>\*,\*\*\*</sup>, N. V. Rudenko<sup>\*,#</sup>, A. P. Karatovskaya<sup>\*</sup>,  
 A. O. Shepelyakovskaya<sup>\*</sup>, A. V. Siunov<sup>\*\*</sup>, Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya<sup>\*\*</sup>, A. S. Nagel<sup>\*\*</sup>,  
 V. I. Salyamov<sup>\*\*</sup>, A. S. Kolesnikov<sup>\*\*</sup>, F. A. Brovko<sup>\*,\*\*\*</sup>, and A. S. Solonin<sup>\*\*,\*</sup>

<sup>#</sup> Phone: +7 (926) 592-11-89; e-mail: nrudkova@mail.ru

<sup>\*</sup>Pushchino Branch, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
 pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow, 142290 Russia

<sup>\*\*</sup>Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, FSBI FRC Pushchino Scientific Centre  
 of Biological Research, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow, 142290 Russia

<sup>\*\*\*</sup>Pushchino State Institute of Natural Sciences, pr. Nauki 3, Pushchino, Moscow, 142290 Russia

Testing a panel of monoclonal antibodies to the recombinant HlyIICTD protein from *Bacillus cereus* revealed an antibody capable to form an immune complex with a thrombin recognition region the amino acid sequence of which is located within the recombinant HlyIICTD. The epitope was localized by peptide phage display methods, as well as enzyme immunoassay and immunoblotting for interaction with recombinant proteins that either contain or do not contain individual HlyIICTD components. The detected epitope is located in the cleavage region of the thrombin site and retains the ability to interact with the antibody after thrombin proteolytic attack of a protein with thrombin cleavage site.

*Keywords: bacterial pore-forming toxins, monoclonal antibodies, epitope, phage display, fused recombinant proteins, Bacillus cereus sensu lato, thrombin*