

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.21:579.23

Получение и очистка лизостафина, секретируемого в культуральную жидкость рекомбинантным штаммом *Brevibacillus choshinensis*/pNCMO2/lsf12

© 2020 Е. А. ПАНФЕРЦЕВ^{1,*}, Е. В. БАРАНОВА¹, В. В. ЛЕВЧУК¹, Т. В. РЕШЕТНЯК¹, П. В. СОЛОВЬЕВ¹, Н. А. ШИШКОВА¹, Т. В. ФЕДОРОВ¹, А. Г. ВОЛОШИН¹, С. Ф. БИКЕТОВ¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, 142279

*e-mail: panfera62@mail.ru

Поступила в редакцию 04.10.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 15.12.2019 г.

С помощью экспрессионной системы «вектор–хозяин» *Brevibacillus choshinensis* получен рекомбинантный лизостафин, позволяющий синтезировать продукт без сложных стадий рефолдинга белка, которые могут приводить к снижению биологической активности штамма. Была сконструирована плаزمиды pNCMO2/lsf12 и на ее основе рекомбинантный штамм *Brevibacillus choshinensis*/pNCMO2/lsf12, при культивировании которого на жидких питательных средах синтезируется и секретируется в культуральную жидкость белок с молекулярной массой 27 кДа. Стафилолитическая активность очищенного белка (удельная активность 557 ед/мг, рН-оптимум 7,5–8,0, температурный оптимум 50–55 °С) оказалась сравнима с активностью природного лизостафина и его рекомбинантных аналогов. С целью подготовки к промышленному производству фермента разработан метод глубинного культивирования рекомбинантного штамма *Brevibacillus choshinensis*/pNCMO2/lsf12 с выходом по целевому белку до 90 мг/л, а также метод одностадийной очистки лизостафина до состояния 90%-ной гомогенности.

Ключевые слова: *Brevibacillus choshinensis*, ионообменная хроматография, лизостафин

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-7-15

Лизостафин (КФ 3.4.24.75) – фермент микробного происхождения, внеклеточная глицилглициновая эндопептидаза, содержащая ион цинка, впервые был выделен из культуры *Staphylococcus simulans* и описан Schindler и Schuhardt в 1964 г. [1]. Благодаря специфической ферментативной активности лизостафин разрушает клеточные стенки тех микроорганизмов, пептидогликаны которых содержат полиглициновые межпептидные мостики. Поскольку бактерии рода *Staphylococcus* содержат указанные пептидогликаны, все они, включая антибиотикорезистентные, чувствительны к лизирующему воздействию лизостафина, что послужило основанием для испы-

таний лизостафина в качестве лечебного препарата при заболеваниях людей и животных, вызываемых патогенными стафилококками, в частности отитов, гайморитов, фронтитов, тонзиллитов, фарингитов, эндокардитов, остеомиелитов, маститов, а также при фурункулезе, нагноениях ран, сепсисе и др. Способность лизостафина лизировать антибиотикоустойчивые и образующие биопленки стафилококки стала конкурентным преимуществом перед антибиотиками в борьбе с внутрибольничными инфекциями, которые могут поражать эндокардий сердца и различные имплантированные устройства (клапаны, катетеры, кардиостимуляторы и пр.) [2, 3].

Список сокращений: КЖ – культуральная жидкость, ПААГ – полиакриламидный гель; ОП₆₂₀ – оптическая плотность при длине волны 620 нм; РБ – рабочий буфер (50 мМ трис-НСl, рН 7,5 с 100 мМ NaCl).

Лизостафин получают из природных (патогенные штаммы *Staphylococcus simulans* [4–6]) и рекомбинантных продуцентов. Работа с патогенными штаммами требует специальных условий, а полученные из них лизостафины могут содержать пирогены и аллергены, очистка от которых сложна и многостадийна [1, 6]. Актуальной альтернативой природному может служить рекомбинантный лизостафин, которому посвящены многочисленные работы и патенты, связанные с получением фермента в *Bacillus* spp. [7, 8], *Escherichia coli* [9–13], *Pichia pastoris* [14].

Одним из наиболее часто используемых для микробиологического синтеза штаммов-продуцентов является *E. coli*. Однако экспрессия целевого продукта в этом штамме связана с применением для его очистки металл-аффинной хроматографии [11–12], что приводит к загрязнению тяжелыми металлами конечного препарата. При этом значительная часть продукта накапливается в тельцах включений [11–13] и последующее извлечение нативного фермента затруднительно.

Несомненно, что субстанция для фармацевтических целей должна получаться по наиболее экономичной технологии, подразумевающей высокий выход продукта и возможность использования недорогих способов очистки. Ранее были предприняты попытки создания подобных технологий, в частности продуцентов пролизостафина на основе *Bacillus* spp. как описано у Recsei [7]. Отмечено, что особенностью штаммов *Bacillus subtilis* является наличие секретируемой сериновой протеиназы, частично гидролизующей рекомбинантный лизостафин. Такой недостаток отсутствует у штаммов *Bacillus sphaericus*, продуцирующих профермент в культуральную среду с высоким выходом, однако остается необходимость дополнительного этапа активации для получения функционально активного продукта. Создание новых штаммов-продуцентов лизостафина, пригодного для клинической и ветеринарной практики в качестве лечебного антистафилококкового препарата, по-прежнему актуально.

Среди существующих экспрессионных систем, созданных для получения большого количества рекомбинантных белков в растворенном виде, весьма перспективной является система TAKARA (Япония), которая обеспечивает высокопродуктивную экспрессию секреторных гетерологических белков в бациллах. Продукция в среде культивирования как прокариотических, так и эукариотических функционально активных белков, включающих ферменты, антигены и цитокины возможна в диапазоне от 0,1 до 3,7 мг/мл. Продукция бациллярных литических ферментов

(альфа амилаза, сфингомиелиназа, хитозаназа) показана в диапазоне от 1,4 до 3,7 мг/мл [15–17]. Важно, что целевой белок находится в растворенном виде в среде без протеаз и может быть легко отделен от клеточной массы и дебриса, что значительно облегчает последующую хроматографическую очистку продукта до гомогенного состояния. Ранее уже было описано создание рекомбинантного химерного белка возбудителей клещевых боррелиозов с использованием системы «вектор-хозяин» *Brevibacillus choshinensis* (Takara Bio Inc., Япония) [18].

В связи с этим, в настоящей работе ставилась задача получить рекомбинантный штамм-продуцент функционально активного лизостафина с использованием экспрессионной системы TAKARA.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Среды культивирования

Для культивирования *Brevibacillus choshinensis*/pNCMO2/lsf12 были использованы питательные среды – МТ-бульон, г/л: глюкоза – 10, полипептон – 10, мясной экстракт – 5, дрожжевой экстракт – 2, FeSO₄ – 10, MnSO₄ – 10, ZnSO₄ – 1 (Takara Bio Inc.), ГРМ-бульон, г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки – 8, пептон ферментативный – 8, хлорид натрия – 4 (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ), ПС-бульон, г/л: глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5 (Difco, США), аммоний виннокислый – 15, натрий хлористый – 5, магний сернокислый – 0,5, калий фосфорнокислый двузамещенный – 2,6, железо сернокислое – 0,01, цинк сернокислый – 0,001, марганец сернокислый – 0,01 («Химмед», РФ). Для оценки литической активности лизостафина получали клетки культуры *Staphylococcus aureus* ATCC209, используя плотную питательную среду L-агар, г/л: триптон Vacto (Difco) – 10, дрожжевой экстракт (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) – 5, хлорид натрия – 10, агар микробиологический – 15 (Difco). Плотную питательную среду L-агар, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, применяли для генно-инженерных экспериментов на штаммах *E. coli*.

Дизайн праймеров, ПЦР-амплификация

В работе были использованы олигонуклеотидные праймеры для ПЦР амплификации гена *lsf* из *Staphylococcus simulans*, синтезированные фирмой «Синтол» (Москва). Последовательности прямого (5'-ТТААСТGCAGСААСАСАТГААСАТТСА-3') и обратного (5'-ААААГГТАССТСАСТТТАТАГТТССССААААГ-3') праймеров содержали сайты рестрикции (выделены жирным шрифтом)

эндонуклеазами *Pst*I и *Kpn*I соответственно. Структуру праймеров разрабатывали с применением пакета программ DNASTAR LASERGENE.

ПЦР-амплификацию гена *lsf* (735 пн) проводили в термоциклере MJ Mini (Bio-Rad, США). В качестве матрицы использовали 100 нг тотальной ДНК *S. simulans*.

Для ПЦР-амплификации ДНК использовали набор High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Продукты ПЦР очищали из агарозного геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.), согласно протоколу производителя. Лигирование фрагмента ДНК 735 пн и плазмидного вектора pNCMO2 (Takara Bio Inc.), рестрицированных эндонуклеазами *Pst*I и *Kpn*I, проводили с помощью набора Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Трансформацию клеток *E. coli* DH5 α осуществляли, используя набор TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Для скрининга клонов при клонировании использовали термостабильную ДНК-полимеразу (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Электрофорез в агарозном геле проводили в трис-борат-ЭДТА буфере (89 мМ трис, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА, pH 10).

Из позитивных клонов выделяли плазмидную ДНК, которую подвергали рестрикционному картированию с последующим секвенированием клонированного гена (735 пн). Секвенирование проводили на аппарате ABI PRISM[®] 310 GENETIC ANALYZER—APPLIED BIOSYSTEMS с использованием праймеров, комплементарных промоторной и терминаторной областям плазмидного вектора pNCMO2: прямой секвенирующий праймер – 5'-CGCTTGCAGG TTCGG-3'; обратный секвенирующий праймер – 5'-CAATG TAATTGTTCCCTACCTGC-3'.

Получение рекомбинантных клонов *Brevibacillus choshinensis*/pNCMO2/*lsf*12 и экспрессия рекомбинантного лизостафина

В работе использовали систему «вектор–хозяин» *B. choshinensis* (Takara Bio Inc.) включающую: компетентные клетки *B. choshinensis*, векторную плазмиду pNCMO2, буферные растворы А и В, бульон МТ для культивирования рекомбинантных клонов. Трансформацию компетентных клеток *B. choshinensis* проводили по инструкции производителя системы. К оттаянным во льду и осажденным центрифугированием компетентным клеткам добавляли 50 мкл раствора А, содержащего 500 нг плазмидной ДНК pNCMO2/*lsf*12,

и выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Далее добавляли 150 мкл раствора В, встряхивали 10 с и центрифугировали 5 мин при 5000 g. Отбирали супернатант и вносили 1 мл среды МТ. Инкубировали клетки 2 ч при 37 °С. Трансформанты высевали на агаризованную среду МТ с 1% глюкозы и 25 мкг/мл неомицина. Выросшие колонии анализировали при помощи ПЦР, используя прямой и обратный секвенирующие праймеры.

В результате было отобрано несколько колоний *B. choshinensis* с плазмидой pNCMO2/*lsf*12. Пилотную ферментацию рекомбинантных клонов проводили в 3 мл бульона МТ, содержащего 25 мкг/мл неомицина, в течение 24 ч при 33 °С. Выросшую культуру охлаждали до 4 °С и разделяли биомассу и КЖ при помощи низкоскоростного центрифугирования (5000 g, 15 мин). КЖ и клетки штамма *B. choshinensis*/pNCMO2/*lsf*12 тестировали на наличие рекомбинантного белка лизостафина методом вертикального электрофореза по Laemmli [19] в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия в редуцирующих условиях с последующей окраской геля Кумасси R 250.

Культивирование штамма-продуцента

Для получения рекомбинантного белка проводили культивирование штамма *B. choshinensis*/pNCMO2/*lsf*12 в биореакторе Bioflo 110 NBS (США) объемом 7,5 л, содержащем 4 л (коэффициент заполнения 0,53) оригинальной полусинтетической питательной среды ПС с антибиотиком неомицином 25 мкг/мл (Sigma, США). Предварительно проводили восстановительный посев эталонной культуры *B. choshinensis*/pNCMO2/*lsf*12, хранящейся в 20%-ном глицерине (Sigma) при температуре минус 70 °С. Затем колонии культуры с суточного газона штамма суспендировали в физиологическом растворе. Полученную взвесь с концентрацией клеток по стандарту мутности $1 \cdot 10^9$ кл/мл вносили в колбы с жидкой средой ПС. Колбы помещали в термостатирующую качалку при температуре $37 \pm 0,25$ °С и скорости вращения 150 об/мин на 18 ч. Содержимое колб переносили в колбу биореактора и вносили жидкую среду ПС. Культивирование проводили при температуре 37 ± 1 °С в течение 12–18 ч. Уровень аэрации изменяли в процессе культивирования от 1,0 до 2,0 л/мин. Скорость перемешивания устанавливали автоматически по концентрации растворенного кислорода 40%. Периодически, по мере появления пены, в объем реактора добавляли 1–2 мл 10%-ного пеногасителя Софэксил («Софэкс Силикон», Россия). Культивирование прекращали при достижении ОП₆₀₀ биомассы 5,8–6,2 отн. ед. и начала ее снижения (начало лизиса штамма продуцента).

Очистка рекомбинантного лизоафрина

Рекомбинантный лизоафрин очищали ионообменной хроматографией. Клетки культуры *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12 осаждали центрифугированием при 8 000 g в течение 15 мин. Полученную культуральную жидкость фильтровали через элемент патронный фильтрующий «Экоплен-Ф», 0,5 мкм (НПП «Эко-Фильтр», Россия). Фильтрат закачивали на колонку с катионитом Macro-Prep High S Media (Bio-Rad), уравновешенную 50 mM натрий-фосфатным буфером (pH 7,0, 100 mM NaCl).

Колонку промывали пятью колоночными объемами 50 mM натрий-фосфатного буфера (pH 7,0 с 100 mM NaCl). Целевой белок элюировали 50 mM натрий-фосфатным буфером (pH 8,2 с 200 mM NaCl). Работы проводили при температуре 4 °C с использованием перистальтического насоса PD5101 (Heidolph, Германия), оптического детектора Toyfix L single UV и программного пакета ECOMAC-ECOM, v. 0,2836 (Чехия).

В процессе отработки культивирования на различных средах КЖ наносили на колонку с Macro-Prep High S объемом 5 мл со скоростью 1 мл/мин. Масштабную очистку проводили на колонке объемом 120 мл. Рабочая скорость при этом была 7–8 мл/мин. Концентрацию белка определяли по методу Брэфорд [20] с использованием реактивов фирмы Bio-Rad. Чистоту препарата оценивали электрофорезом по Laemmli [19] в 12%-ном ПААГ.

Определение активности рекомбинантного лизоафрина

Для определения активности лизоафрина использовали турбидиметрический метод Sigma Aldrich (L7386). За единицу активности (А) принимали снижение оптической плотности (ОП₆₂₀) суспензии клеток *S. aureus* на 50% под действием лизоафрина за 10 мин при температуре 37 °C и pH 7,5 в кюветах с длиной оптического пути 1 см. В качестве субстрата использовали штамм *S. aureus* ATCC209 (Отдел коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Рабочую культуру готовили следующим образом: засевали чашки с плотной питательной средой (L-агар) культурой стафилококка и инкубировали 16–18 ч при 37 °C. Далее готовили взвесь свежего штамма *S. aureus* ATCC209 в 50 mM буфере трис-НСl, pH 7,5, с 100 mM NaCl (РБ) по стандарту мутности «ГКИ 10 ед», что соответствует $5 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^9$ кл./мл. Полученную культуру разводили РБ до ОП₆₂₀ $0,25 \pm 0,01$ отн.ед., измеренной на фотометре КФК-3 (Россия) в кюветах с длиной

оптического пути 1 см и объемом 6 мл. Полученную суспензию прогревали в водяном термостате 15 мин, 37 °C. Готовили серию двукратных разведений лизоафрина в РБ с концентрациями от 0,5 мг/мл до 0,002 мг/мл. Контрольная проба содержала 5,9 мл культуры и 0,1 мл буфера. В опытные пробы вносили 5,9 мл культуры и 0,1 мл раствора лизоафрина из разведений. Перемешивали полученные суспензии. Измеряли начальную ОП₆₀₀ контрольного и опытных образцов против РБ в качестве референс-раствора. Суспензии инкубировали 10 мин в водяном термостате при температуре 37 °C, охлаждали в ледяной бане и измеряли ОП₆₀₀ в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Определение активности в процессе эксперимента проводили в трех повторах и результат выражали как среднее \pm абсолютное отклонение ($M \pm m$).

Определение влияния pH и температуры на активность рекомбинантного лизоафрина

При определении pH-оптимума активности рекомбинантного лизоафрина использовали серию буферных растворов, содержащих 50 mM трис-НСl и 100 mM NaCl с pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 и 8,8. Для определения температурной зависимости брали 50 mM трис-НСl, pH 7,5 с 100 mM NaCl, меняя в ходе определения активности температуру реакционной среды (25 °C, 35, 45, 55 и 60 °C). В процессе лизиса начальная ОП₆₂₀ суспензии *S. aureus* ATCC209 составляла $0,27 \pm 0,02$ отн. ед., концентрация лизоафрина в реакционной среде 0,1 мкг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование штамма-производителя

Полученный в результате ПЦР-амплификации фрагмент ДНК, размером 735 пн, кодирующий синтез лизоафрина, был клонирован в составе векторной плазмидной ДНК pNCMO2 (Takara Bio Inc.). Клонирование было проведено таким образом, чтобы объединить в единую открытую рамку считывания нуклеотидные последовательности гена *lsf* и универсального сигнального пептида, позволяющего клеткам *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12 секретировать рекомбинантный лизоафрин в среду культивирования (рис. 1).

Последовательность гибридного гена *lsf* была подтверждена секвенированием. Анализ последовательности гибридного гена *lsf*, проведенный с использованием пакета программ DNASTAR LASERGENE, показал, что в составе плазмиды pNCMO2 клонирован фрагмент ДНК размером 735 пн, который находится в единой открытой

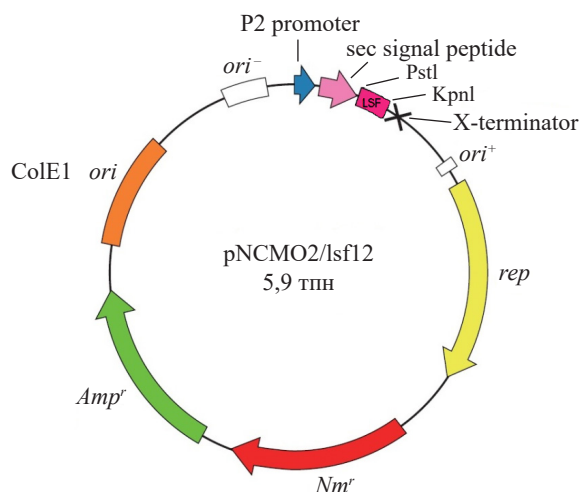


Рис. 1. Физическая карта плазмидной ДНК pNCMO2/lsf12 Цветом выделены гены, локализованные на плазмиде

Fig. 1. Physical map of plasmid DNA pNCMO2/lsf12

рамке считывания со структурой, кодирующей лидерный пептид, необходимый для секреции белка LSF в среду культивирования.

Рекомбинантной плазмидной ДНК pNCMO2/lsf12 трансформировали клетки *B. choshinensis*. В результате трансформации были получены клоны, устойчивые к неомицину и способные синтезировать рекомбинантный лизостафин.

Пилотная ферментация рекомбинантных клонов *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12 в жидкой питательной среде МТ выявила способность клеток секретировать рекомбинантный лизостафин в среду культивирования.

Оптимизация процесса выделения и очистки лизостафина

Возможность очистки целевого белка непосредственно из КЖ путем одноэтапной катионообменной хроматографии была условием при подборе среды культивирования созданного штамма.

Культивирование штамма *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12, как правило, проводят в среде МТ. В настоящей работе была проверена возможность роста штамма и синтеза рекомбинантного белка на следующих жидких питательных средах: контрольная среда МТ-бульон, ГРМ-бульон, ГРМ-бульон с 0,5%-ной глюкозой и 0,5%-ным дрожжевым экстрактом, ПС-бульон (оригинальная лабораторная полусинтетическая среда). Была проведена серия культивирований в колбах объемом 750 мл, содержащих 200 мл соответствующих сред, получена КЖ, рекомбинантный белок был очищен хроматографией на колонке с катионитом Macro-Prep High S объемом 5 мл. Оптимальный результат

по выходу активного лизостафина был достигнут на среде ПС-бульон (рис. 2). Выход очищенного целевого продукта при культивировании на этой среде составил 39 ед. активности с 1 мл КЖ. При этом выращивание на контрольной среде давало только 10 ед/мл КЖ. Выход очищенного лизостафина при выращивании на средах ГРМ и ГРМ с добавками был < 10 ед/мл КЖ.

Культивирование в среде ПС обеспечивало синтез активного лизостафина 50–55 ед/мл КЖ. В то время как при культивировании на средах МТ, ГРМ, ГРМ с 0,5%-ной глюкозой, 0,5%-ным дрожжевым экстрактом синтез целевого белка не превышал 17–23 ед/мл КЖ. Преимуществом среды ПС было также более низкое содержание загрязняющих компонентов в КЖ что облегчало связывание целевого белка с носителем Macro-Prep High S и упрощало очистку.

В дальнейшем было показано, что выход лизостафина при культивировании на оригинальной среде ПС максимален при высокой аэрации, так как *B. choshinensis* относится к числу аэробов. Культивирование на колбах (среда ПС) в условиях повышенной аэрации увеличивало выход очищенного активного лизостафина более чем в 2 раза (95 ед/мл КЖ).

Для очистки секретируемых белков из КЖ на первом этапе обычно используют концентрирование исходного материала одним из известных методов: фильтрацией на мембранах, осаждением высокими концентрациями солей или кислотами. В ранее упомянутой работе Recsei [7] в процессе

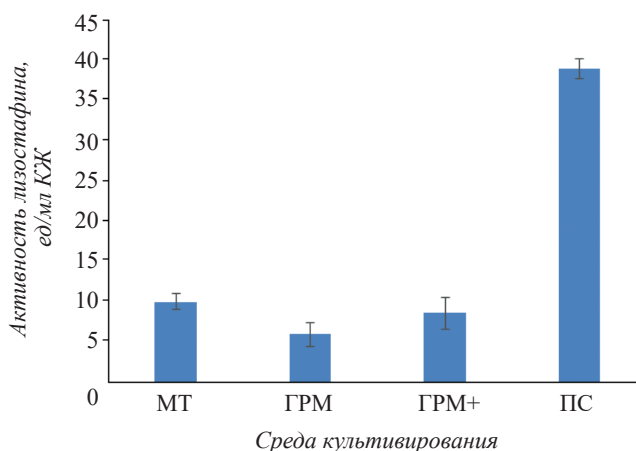


Рис. 2. Выход очищенного лизостафина из КЖ *B. Choshinensis*/pNCMO2/lsf12 при культивировании на разных средах – МТ, ГРМ, ГРМ + 0,5%-ной глюкозы и 0,5%-ного дрожжевого экстракта, ПС. Обозначения сред указаны в тексте

Fig. 2. The yield of purified lysostaphin from the culture liquid (CL) of *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12 cultivated on various media: МТ; ГРМ; ГРМ + 0.5% glucose and 0.5% yeast extract; PS

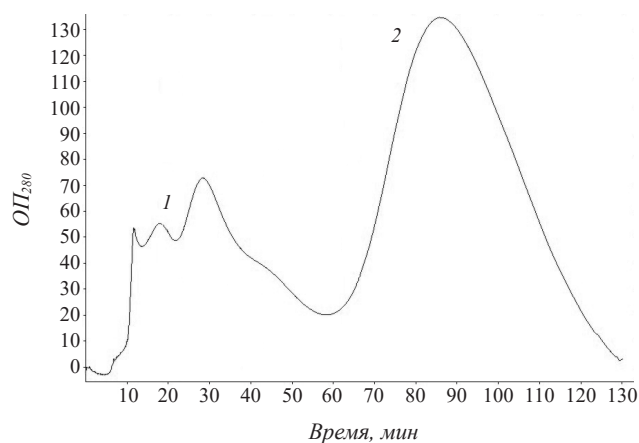


Рис. 3. Профиль элюции лизостафина с колонки Macro-Prep High S (120 мл) 50 мМ натрий-фосфатным буфером с 200 мМ NaCl, pH 8,2: 1 – окрашенные примеси, 2 – пик лизостафина

Fig. 3. Lysostaphin elution profile from the column Macro-Prep High S (120 mL) using 50 mm sodium phosphate buffer with 200 mM NaCl, pH 8,2: (1) colored impurities; (2) lysostaphin peak

очистки рекомбинантного пролизостафина из КЖ на первом этапе применялось осаждение белков сульфатом аммония с последующим диализом. В настоящей работе эта стадия была исключена в связи с подбором среды культивирования (среда ПС) наименее загрязненной посторонними белковыми примесями и обладающей кислотностью и ионной силой, позволяющей сорбировать целевой белок непосредственно из КЖ на хроматографическую колонку. Для элюции лизостафина был выбран буфер со сдвигом pH в слабощелочную область (pH 8,2), позволивший освободиться от белковых примесей. В процессе элюции первым выходил пик, содержащий небольшое количество лизостафина и низкомолекулярную окрашенную примесь, затем целевой пик, содержащий чистый лизостафин (рис. 3). При последующей промывке колонки 50 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 8,2, 500 мМ NaCl) смывали высокомолекулярные примеси. В результате масштабной наработки лизостафина из 4 л КЖ было

получено 372 мг препарата белка с молекулярной массой ~27 кДа и чистотой согласно результату электрофоретического анализа >90% (табл. 1, рис. 4). Подобный выход (до 0,15 мг/мл) достигнут, согласно патенту Recsei [7], также с использованием бациллярного продуцента (*B. sphaericus*), однако, в этом случае продуктом был пролизостафин, требующий еще этапа активации для превращения в активный фермент. В других же системах экспрессии, в частности *E. coli*, были получены активные ферменты со значительно меньшим выходом [9, 11, 13].

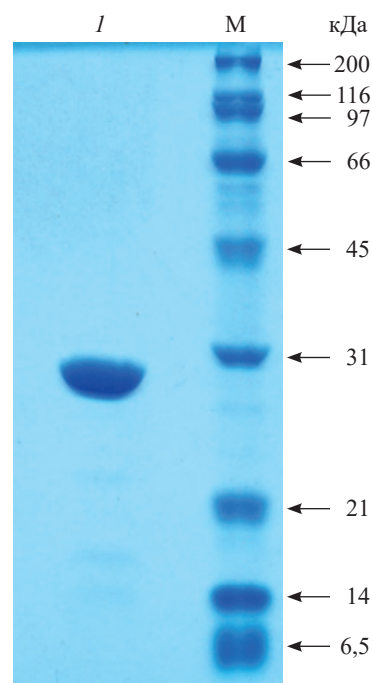


Рис. 4. Электрофоретический анализ в 12%-ном ПААГ препарата лизостафина после масштабной наработки из 4 л КЖ. 1 – 7 мкг хроматографически очищенного препарата лизостафина; М – маркеры молекулярной массы

Fig. 4. Electrophoretic analysis of lysostaphin in 12% PAGE after purification from 4 L of CL. 1 – 7 µg chromatographically purified preparation lysostaphin; M – markers of molecular weight

Таблица 1

Очистка лизостафина из КЖ *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12

Purification of lysostaphin from the *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12 CL

Стадия очистки	Объем, мл	Активность		Белок	
		Удельная, ед/мг	Суммарная, отн. ед	Концентрация, мг/мл	Суммарный, мг
Исходная КЖ	4000	77,5	248 000	0,8	3200
Итоговый препарат после ионообменной хроматографии	300	557,2	207 278	1,24	372

Бактериолитические свойства рекомбинантного лизостафина

Для анализа биологической активности лизостафина предложены различные полуколичественные методы: турбидиметрический, минимальных бактерицидных разведений, диффузии в агаре [21]. Активность хроматографически очищенного рекомбинантного лизостафина оценивали турбидиметрическим методом с использованием живой культуры стафилококка *S. aureus* ATCC209. Зависимость уровня лизиса суспензии клеток стафилококка от концентрации лизостафина приведена на рис. 5. Лизис 50% клеток достигался при концентрации рекомбинантного лизостафина в реакционной среде 0,27 мкг/мл, что соответствовало удельной активности 557 ед/мг и было сравнимо с активностью контрольного препарата лизостафина «Sigma Aldrich, # L7386» (США), обладавшего активностью 589 ед/мг.

Влияние pH и температуры реакционной смеси на активность рекомбинантного лизостафина

Лизостафин, полученный из природных штаммов, обладает максимальной активностью при температуре 45–50 °С и pH 7,5–8,0 [6, 22]. Похожие результаты получены для рекомбинантного лизостафина из *E. coli* [13]. Рекомбинантный лизостафин, полученный нами в *Brevibacillus choshinensis*, показал близкие значения оптимумов активности: 50–55 °С и pH 7,5–8,0, но, в отличие от лизостафина из *E. coli* [13], обладал выраженной зависимостью как от температуры, так и от pH реакционной среды (рис. 6).

В результате выполненной работы была создана новая технология получения и хроматогра-

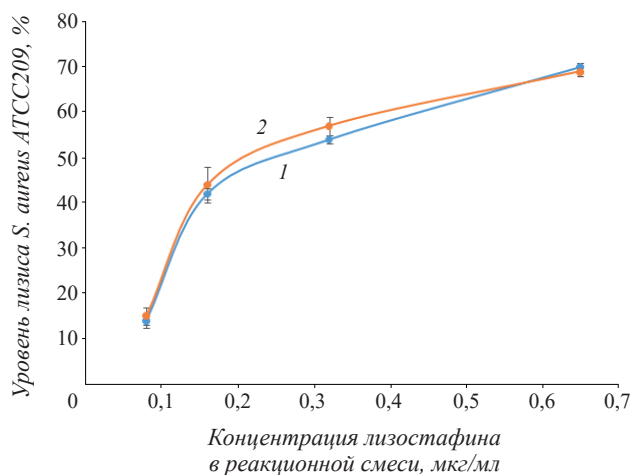


Рис. 5. Зависимость уровня лизиса суспензии клеток *S. aureus* ATCC209 (% просветления мутности суспензии от исходной (Δ ОП₆₂₀)) от концентрации лизостафина в реакционной среде. 1 – рекомбинантный лизостафин *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12; 2 – контрольный лизостафин («Sigma», # L7386)

Fig. 5. Dependence of lysis percentage of *S. aureus* ATCC209 cell suspension on lysostaphin concentration in the reaction medium. Line 1 – recombinant *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12 lysostaphin; line 2 – control lysostaphin («Sigma», # L7386)

фической очистки рекомбинантного лизостафина. Биологические свойства сконструированного штамма-продуцента позволили применить на практике простой и экономически эффективный метод очистки, и в результате увеличить выход биологически активного лизостафина, по сравнению с используемым ранее методом [8, 9, 11–13]. Штамм *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12 обеспечил синтез и секрецию белка в биологически активном виде, тем самым исключив из процесса

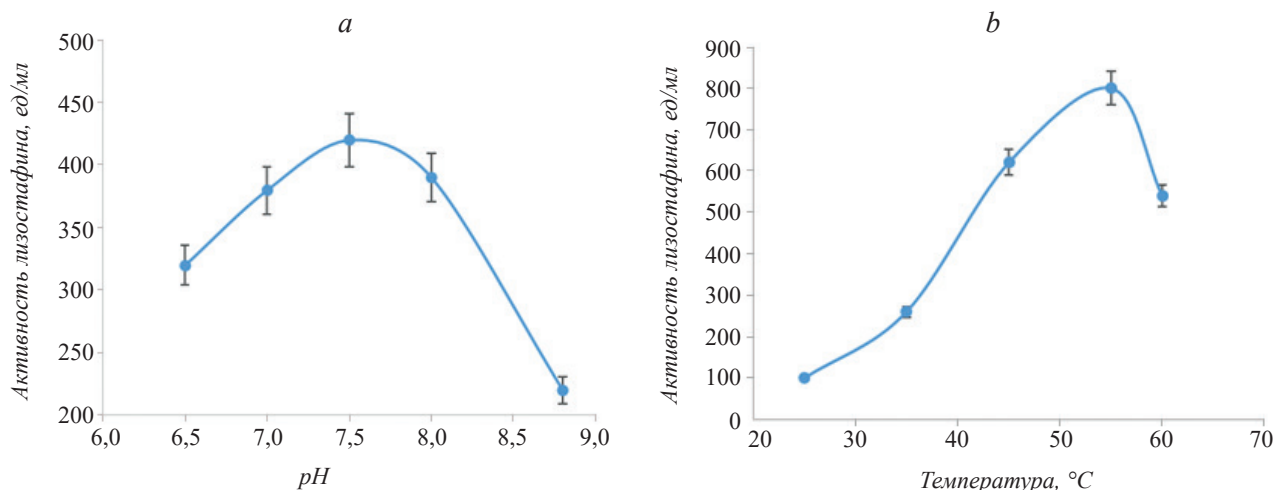


Рис. 6. Зависимость активности лизостафина от pH (a) и температуры (b) реакционной среды

Fig. 6. The dependence of the activity lysostaphin from pH (a) and temperature (b) reaction medium. The initial absorption of the medium 0.27 ± 0.02 o.u., the concentration of lysostaphin 0.1 μ g/mL

стадию рефолдинга белка, необходимую при использовании штаммов-продуцентов на основе *E. coli*. Созданный штамм-продуцент *B. choshinensis*/pNCMO2/lsf12 позволил получить высокоочищенный рекомбинантный лизостафин с удельной активностью 557 ед/мг и выходом по белку до 90 мг/л культуральной жидкости. Определены температурный (50–55 °С) и рН-оптимум (7,5–8,0) активности фермента. Полученный препарат лизостафина обладал чистотой и литической активностью, сравнимой с активностью аналогов, полученных как из природных («Sigma Aldrich, L7386»), так и рекомбинантных штаммов [8, 9, 11–13]. Разработанная оригинальная полусинтетическая среда ПС позволила оптимизировать процесс очистки до одной стадии хроматографии. Простота и технологичность способа очистки позволяет легко масштабировать процесс получения лизостафина в качестве лечебного препарата.

Работа выполнена в рамках НИР № 050 Роспотребнадзора «Мониторинг за циркуляцией возбудителей боррелиоза в отдельных регионах Российской Федерации и совершенствование средств диагностики боррелиозов».

ЛИТЕРАТУРА

1. Schindler C.A., Schuhardt V.T. Purification and properties of lysostaphin: a lytic agent for the *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1965, 97, 242–250 doi: 10.1016/0304-4165(65)90088-7
2. Bastos M.C.F., Coutinho B.G., Coelho M.L.V. Lyso-staphin: a staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals*, 2010, 3, 1139–1161. doi: 10.3390/ph3041139
3. Szweda P., Schielmann M., Kotlowski R., et al. Peptidoglycan hydrolases – potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 96, 1157–1174. doi: 10.1007/s00253-012-4484-3
4. Лавровский С.Н., Леванова Г.Ф., Трошкин Д.М. Способ получения лизостафина. Патент РФ № 2143489, 1999.
5. Суровцев В.И., Борзенков В.М., Федоров Т.В., Смотров О.И. Способ получения лизостафина. Патент РФ № 2342430, 2006.
6. Iversen O. J., Grov A. Studies on lysostaphin separation and characterization of three enzymes. *Eur. J. Biochem.*, 1973, 38, 239–300. PMID 9023202.
7. Recsei P.A. Expression of recombinant mature lysostaphin, Patent US No. 4931390, 1990.
8. Recsei P.A., Gruss A.D., Novick R.P. Cloning, sequence and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. *Proc. Acad. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 1124–1131. doi: 10.073/pnas.84.5.1127
9. Khatry G.S., Sharma R. Expression of recombinant mature lysostaphin, Patent EP 1224271 B1, 2009.
10. Chan E-C. Expression and purification of recombinant lysostaphin in *E. coli*. *Biotechnol. Lett.*, 1996, 18, 833–838. doi: 10.1007/BF00127898
11. Sharma R., Sharma P.R., Choudhary M.L., et al. Cytoplasmic expression of mature glycyglycine endopeptidase lysostaphin with an amino terminal hexa-histidine in a soluble and catalytically active form in *Escherichia coli*. *Protein Express. Purif.*, 2006, 45, 206–215. doi: 10.1016/i.pep.2005.07.025
12. Farhangnia L., Ghaznavi-Rad E., Mollaei N., Abtahi H. Cloning, expression, and purification of recombinant lysostaphin from *Staphylococcus simulans*. *Jundishapur J. Microbiol.*, 2014, 7(5), e10009. doi: 10.5812/jjm.10009
13. Бокша И.С., Лаврова Н.В., Гришин А.В. и др. Рекомбинантный лизостафин *Staphylococcus simulans*: получение, очистка и определение противостафилококковой активности. *Биохимия*, 2016, 81(4), 607–617. doi: 10.13140/RG.2.1.1624.3605
14. Zhao H., Blazanovic K., Choi Y., et. al. Gene and protein sequence optimization for high-level production of fully active and aglycosylated lysostaphin in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, 80, 2746–2753. doi:10.1128/AEM.03914-13
15. Y. Takimura M., Kato T., Ohta H., et al. Secretion of Human Interleukin-2 in Biologically Active Form by *Bacillus brevis* Directly into Culture Medium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997, 61(11), 1858–1861. doi: 10.1271/bbb.61.1858
16. Yashiro K., Lowenthal J.W., O’Neil T.E., et al. High-Level Protein Production of Recombinant Chicken Interferon- γ by *Brevibacillus choshinensis*. *Expression Purification*, 2001, 23, 113–120. doi: 10.1006/rep.2001.1481
17. Yamagata H., Nakahama K., Suzuki Y., Kakinuma A., et al. Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, 86, 3589–3593. doi: 10.1073/pnas.86.10.3589
18. Панферцев Е.А., Баранова Е.В., Мочалов В.В. и др. Конструирование рекомбинантного штамма *Brevibacillus choshinensis*, продуцирующего рекомбинантный химерный боррелиозный антиген. *Клин. лаб. диагностика*, 2018, 63(6), 375–378. doi: 10.18821/0869-2084-2018-63-7-450-454.
19. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 1970, 227(5259), 680–685. doi: 10.1038/227680a0
20. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
21. Kusuma, Kokai-Kun Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, 2005, 49(8), 3256–3263. doi: 10.1128/AAC.49.8.3256-3263.2005
22. Суровцев В.И., Борзенков В.М., Федоров Т.В., Смотров О.И. Ионогенные группы в активном центре лизостафина. Сравнение кинетико-термодинамических и рентгеноструктурных данных. *Биохимия*, 2007, 72(4), 989–993. doi: 10.1134/S0006297907090106

Obtaining and purification of lysostaphin secreted in the culture liquid by *Brevibacillus choshinensis*/pNCMO2/lsf12 recombinant strain

E. A. PANFERTSEV^{1,*}, E. V. BARANOVA¹, V. V. LEVCHUK¹, T. V. RESHETNYAK¹,
P. V. SOLOVIEV¹, N. A. SHISHKOVA¹, T. V. FEDOROV¹, A. G. VOLOSHIN¹, S. F. BIKETOV¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow oblast, 142279 Russia

*e-mail: info@obolensk.org; panfera62@mail.ru

Received October 04, 2019

Revised November 29, 2019

Accepted December 15, 2019

Here, «host-vector» expression system of *Brevibacillus choshinensis* was developed and used for producing a recombinant lysostaphin with high-output. The recombinant plasmid pNCMO2/lsf12 was constructed, and its expression in *Brevibacillus choshinensis* (strain *Brevibacillus choshinensis*/pNCMO2/lsf12) provided a synthesis of the 27-kDa protein, which was secreted into the culture medium. Its specific staphylolytic activity being 557 U/mg at optimal pH (7.5–8.0) and temperature (50–55 °C) values was comparable with the natural and recombinant analogs. We hope that developed methods of a deep cultivation of the recombinant *Brevibacillus choshinensis*/pNCMO2/lsf12 strain for a high-yield production (up to 90 mg/L) and a single-stage purification of lysostaphin (up to 90% homogeneity) become the basis for the production of the enzyme on an industrial scale.

Key words: *Brevibacillus choshinensis*, ion-exchange chromatography, lysostaphin

Funding—The work was financially supported by the Grant No. 050 of Rospotrebnadzor «Monitoring of borreliosis pathogens circulation in regions of the Russian Federation and improvement of diagnostic tools for borreliosis»

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-7-15