

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF CELLULAR PROTEINS OF THE CAUSATIVE AGENT OF MELIOIDOSIS

**E. Korol
D. Tereshko
I. Novitskaya
L. Pechonkina
T. Sharov**

Summary. This article evaluates the effectiveness of various methods for isolating and concentrating protein fractions of intracellular components of the melioidosis pathogen.

The aim of the study was to compare the effectiveness of chromatographic methods for isolating individual protein fractions of intracellular components of the melioidosis pathogen using the antigenically complete *B. pseudomallei* 57576 strains as an example. *Methods.* The study involved a collection strain of the melioidosis pathogen, *B. pseudomallei* 57576, and fractions isolated from the original bacterial suspension. The *B.* strains were disinfected, and then the cellular components and virions were separated using anion exchange, hydrophobic interaction, and size-exclusion chromatography. The preparations were analyzed using polyacrylamide gel electrophoresis and ELISA. *Results.* Thirty fractions of the material containing various components of the original bacterial suspension were isolated and analyzed. Hydrophobic components of the bacterial mass demonstrated the highest activity in the ELISA method with specific immune sera from mice after hydrophobic chromatography with 5RPC sorbents (titer 1:400). Hydrophobic chromatography proved optimal for this task, as it allowed for the most efficient concentration and purification of fractions with immunological properties.

Keywords: melioidosis, chromatography, particularly dangerous infections, antigen.

Король Екатерина Васильевна

Научный сотрудник,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт, Роспотребнадзора
katherina.korol@mail.ru

Терешко Дмитрий Леонидович

Научный сотрудник,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт, Роспотребнадзора
dltereshko@gmail.com

Новицкая Ирина Вячеславовна

Ведущий научный сотрудник,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт, Роспотребнадзора
irvnov@mail.ru

Печёнкина Любовь Анатольевна

Научный сотрудник,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт, Роспотребнадзора
lyubov-vmi@yandex.ru

Шаров Тимур Николаевич

Старший научный сотрудник,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт, Роспотребнадзора
timursharov@gmail.com

Аннотация. Статья посвящена оценке эффективности различных способов выделения и концентрирования белковых фракций внутриклеточных компонентов возбудителя мелиоидоза.

Целью исследования был сравнительный анализ эффективности использования вариантов хроматографического метода для выделения отдельных белковых фракций внутриклеточных компонентов возбудителя мелиоидоза на примере полноценного в антигенном составе *B. pseudomallei* 57576. *Методы.* Объектом исследования служил коллекционный штамм возбудителя мелиоидоза *B. pseudomallei* 57576, а также фракции, выделенные из исходной бактериальной взвеси. Штаммы *B.* обеззараживали, затем компоненты клеток и вирионы разделяли методами анионообменной, гидрофобной и эксклюзионной хроматографии. Анализ препаратов проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и реакции ИФА. *Результаты.* Выделено и проанализировано 30 фракций материала, содержащих различные компоненты исходной бактериальной взвеси. Определено, что наибольшую активность в методе ИФА со специфическими иммунными сыворотками от мышей показали гидрофобные компоненты бактериальной массы после гидрофобной хроматографии с сорбентами «5RPC» (титр 1:400). Показано, что метод гидрофобной хроматографии оказался оптимальным для решения поставленной задачи, так как позволил наиболее эффективно сконцентрировать и очистить обладающие иммунологическими свойствами фракции.

Ключевые слова: мелиоидоз, хроматография, особо опасные инфекции, антиген.

Введение

Мелиоидоз и сап в соответствии с принятой в Российской Федерации номенклатурной терминологией относят к категории особо опасных инфекций, т.к. они вызваны возбудителями II группы патогенности [1], а также, согласно Международным медико-санитарным правилам (2005, приложение № 2), за счет того, что это «болезни, любое событие с которыми всегда оценивается как опасное, поскольку эти инфекции обнаружили способность оказывать серьезное влияние на здоровье населения», и «которые представляют собой особую национальную и региональную проблему», в том числе за счет «значительной распространённости тяжёлых форм и высокой летальности» [2].

В настоящее время протеомные методы, основанные на технологии жидкостной хроматографии, эффективно применяются при изучении фенотипических свойств бактерий, в том числе возбудителей особо опасных инфекций. В частности, комбинацию методов эксклюзионной и ионообменной хроматографии эффективно применяют для получения антигенных препаратов, используемых в серологической диагностике возбудителей бактериальных инфекций [3]. Кроме того, используя последующую концентрацию фракций методом фильтрации, а также детекцию компонентов с помощью электрофореза и вестерн-блоттинга, можно выявить белковые маркеры микроорганизмов, обладающие иммунологической активностью. Результаты данного исследования смогли способствовать как определению физико-химических свойств специфичных для возбудителя мелиоидоза белков, так и в перспективе получению высокоспецифичных чувствительных диагностикумов. Целью данной работы было определить эффективность использования различных вариантов жидкостной хроматографии для разделения компонентов клеточной взвеси возбудителя мелиоидоза на примере штамма *B. pseudomallei* 57576.

Материалы и методы

Для хроматографии использовали высушенные ацетоном клетки штамма *B. pseudomallei* 57576, которые суспендировали в 0,15 М растворе NaCl, после чего обрабатывали ультразвуком (22 кГц, 160 Вт, по 1 мин ×3 раза), а также механической дезинтеграции в гомогенизаторе (4000 об/мин, 10 сек. ×3 раза) и центрифугировали (15000 g, 25 мин). Супернатант пропускали через шприцевой фильтр 0,45 мкм. Гель-фильтрацию проводили на колонке объемом 240 мл, в качестве сорбента использовали Sephacryl S-100. Жидкой фазой служил фосфатно-солевой буфер (0,05М, 0,15 NaCl pH 7,5), скорость потока составляла 0,2 мл/мин. Колонку предварительно промывали 2 объемами 0,5 М раствором уксусной кислоты и 5 объемами 20 % этанола. Анионообменную хромато-

графию проводили на колонке объемом 45 мл, в качестве сорбента использовали DEAE-sephadex A-25. Жидкой фазой служил 0,05М раствор Tris-HCl (pH 8,5), скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Для элюирования использовали градиент NaCl 0,05–0,8 М (0 %–100 % в течение 100 мл). Уравновешивание проводили 3 объемами 0,05М раствор Tris-HCl (pH 8,5). Обращено-фазную хроматографию проводили на двух видах сорбента. 1. На колонке объемом 2,5 мл, в качестве сорбента использовали 5RPC. Жидкой фазой служил раствор 10 мМ ацетат аммония в 2 %-м растворе ацетонитрила (pH 7,0), скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Для элюирования использовали градиент 70 % ацетонитрила (0 %–100 % в течение 50 мл). 2. На колонке объемом 14 мл, в качестве сорбента использовали Phenyl-FF. Жидкой фазой служил раствор фосфатно-солевой буфер (0,05М, 0,15 (NH₄)₂SO₄ pH 7,5), скорость потока составляла 2 мл/мин. Для элюирования использовали градиент фосфатно-солевой буфер со снижением концентрации сульфата аммония (100 %–0 % в течение 100 мл) Фракции дополнительно концентрировали методом ультрафильтрации с использованием фильтра PM-10. Иммунологическую активность выделенных вирусных фракций определяли с помощью иммуноферментного анализа с сыворотками мышей (серия № 3898 в титрах 1/100–1/800 в МКБ).

Результаты

Электрофоретический анализ полученных фракций в сравнении с хроматограммами показан на рисунках 1–4.

Как видно из рисунка 1, фракции 1,2,3 и 4 показали присутствие наибольшего количества отдельных полос на электрофореграмме. Фракции 1 и 2, соответствующие отрицательно заряженным белковым компонентам демонстрировали две визуально чёткие полосы в районе 40 и 80 кДа, и менее заметные полосы в районе 12 и 30 кДа. На фракции 2 также присутствуют слабо выраженные полосы в районах 50 кДа и 70 кДа. Фракции 3 и 4, соответствуют началу элюции, концентрациям 0,15 М и 0,3 М градиентам NaCl, при этом какие-либо полосы на них полностью отсутствуют. Фракции 5,6,7 судя по картине электрофореграммы имеют практически идентичный состав, с убыванием концентрации компонентов: одна мажорная полоса на всех трёх фракциях, а также группа менее выраженных полос, исчезающих у фракции 7. В целом можно отметить достаточно слабое окрашивание полученных фракций нитратом серебра на электрофорезе, несмотря на высокую чувствительность метода.

Как видно из рисунка 2, разделение компонентов происходило в соответствии с используемым методом хроматографии: широкий пик гидрофильных компонентов в начале процесса и множество отдельных гидро-

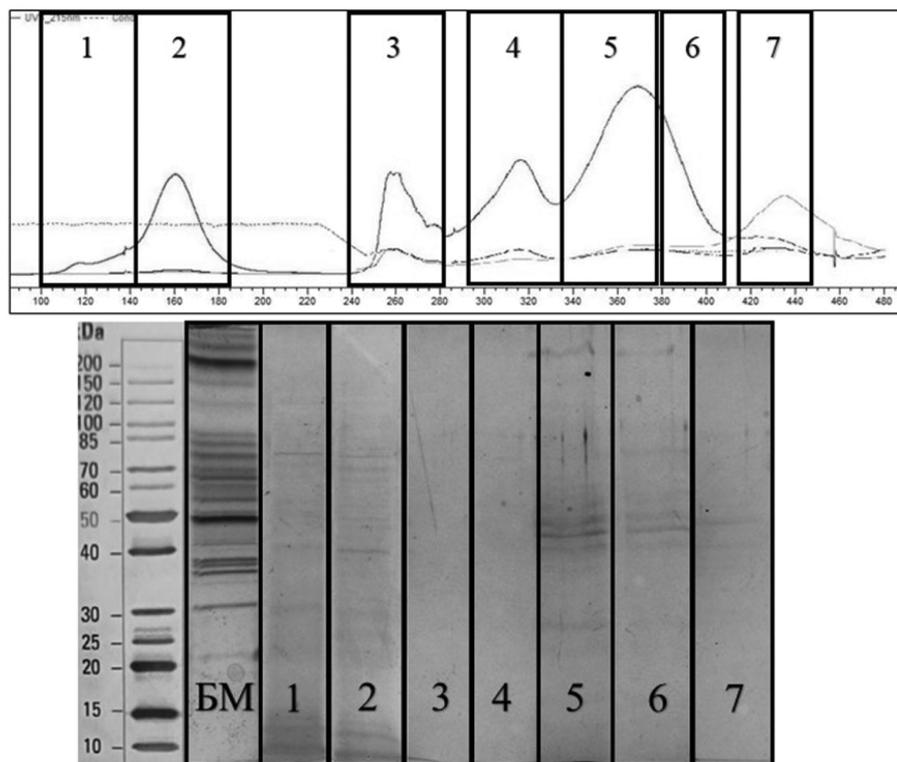


Рис. 1. Электрофореграмма различных фракций *Burkholderia pseudomallei* 57576 после разделения хроматографическим методом на сорбенте «DEAE-sephadex A-25». Фракции 1–7 получены после разделения методом анионообменной хроматографии. Слева от фракции 1 — клеточные белки *Burkholderia pseudomallei* 57576 для сравнения

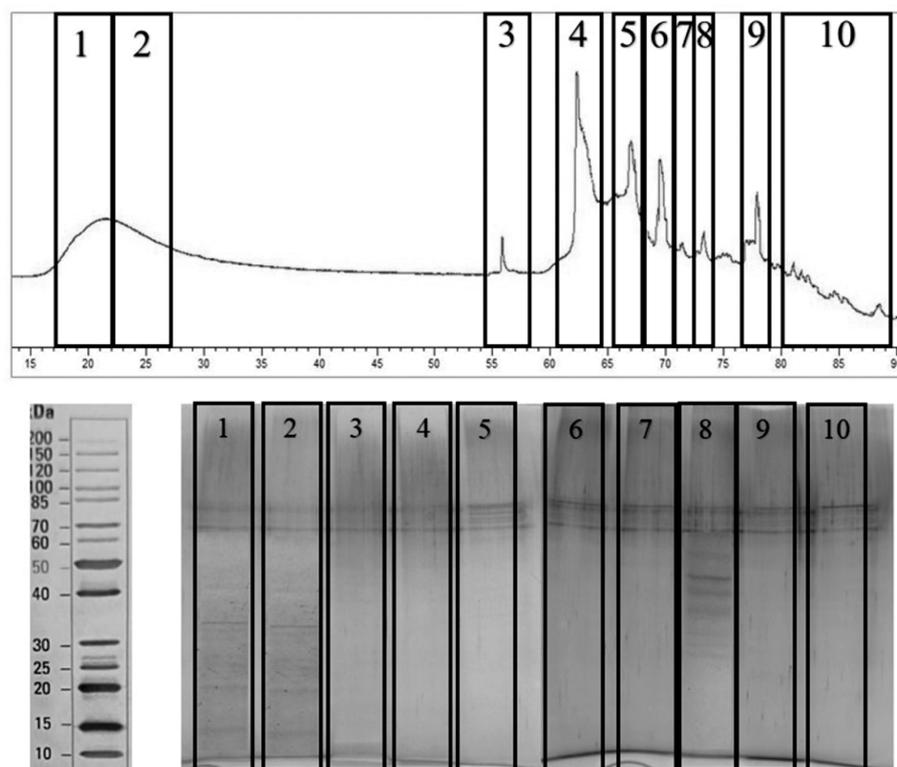


Рис. 2. Электрофореграмма различных фракций *Burkholderia pseudomallei* 57576 после разделения хроматографическим методом на сорбенте 5RPC

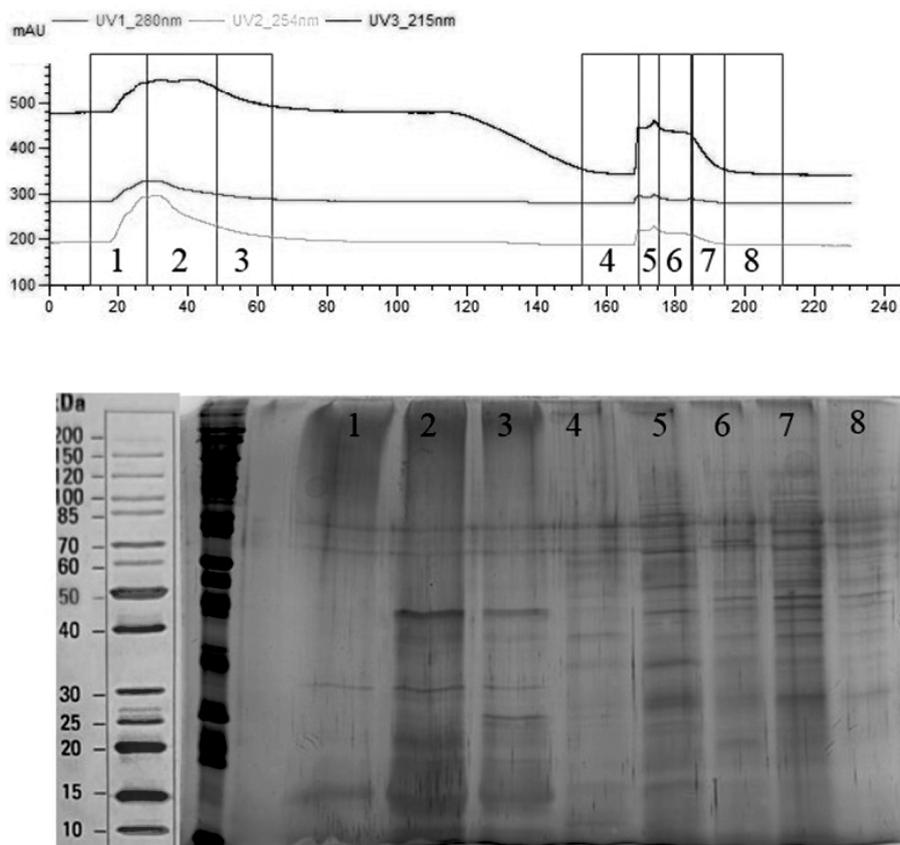


Рис. 3. Электрофореграмма различных фракций *Burkholderia pseudomallei* 57576 после разделения хроматографическим методом на сорбенте «Phenyl-FF»

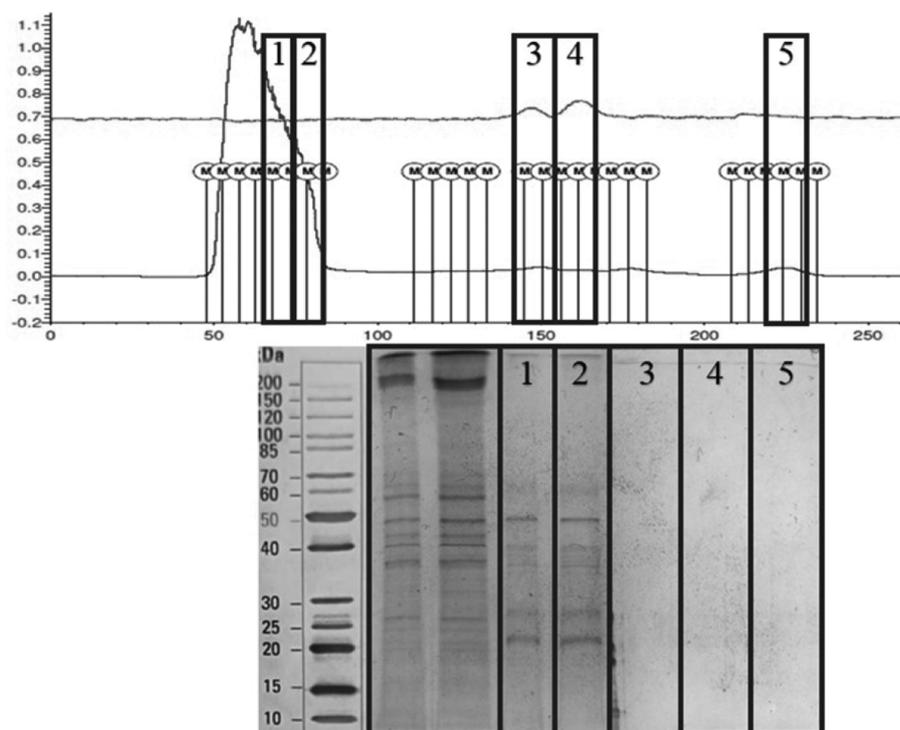


Рис. 4. Электрофореграмма различных фракций *Burkholderia pseudomallei* 57576 после разделения хроматографическим методом на сорбенте Sephacryl S-100. Фракции 1–5 получены после разделения методом гель-фильтрации. Слева от фракции 1 — клеточные белки *Burkholderia pseudomallei* 57576 для сравнения

фобных компонентов после начала элюции (55–90 мл). Однако на электрофореграмме практически нет полос в большинстве сконцентрированных фракций. Две полосы в районе 70 и 85 кДа, присутствующие на каждой дорожке, вероятнее всего соответствуют меркаптоэтанолу в лизирующем буфере. Однако на электрофореграммах 5–10 фракций присутствуют дополнительные линии в районе 83–84 кДа. Для 10 фракции данная полоса выражена наиболее чётко. Кроме того, во фракции 5 можно визуальнo заметить ещё несколько полос, находящихся между артефактными. Во фракциях 1 и 2 (гидрофильные белки) визуальнo заметны по три полосы (15, 20 и 35 кДа), отсутствующие у всех фракций гидрофобных белков. В целом для данного типа сорбента была характерна картина присутствия значительного количества отдельных пиков в процессе элюции раствором ацетонитрила. При этом слабая визуализация компонентов фракций на электрофорезе может быть объяснена их низкой итоговой концентрацией из-за малого объема колонки (2,5 мл) и соответственно малого объема разделяемой пробы (50 мкл).

Как видно из рисунка 3, все фракции после разделения на сефарозном сорбенте «Phenyl-FF» существенно отличались друг от друга. Как и в случае с окраской геля после разделения на сорбенте 5RPC, на электрофореграмме присутствуют две артефактные полосы в районе 70 и 85 кДа. Фракции 1,2,3, соответствующие подъему, вершине и «хвосту» пика гидрофильных соединений, имеют общие полосы в районе 15 и 30 кДа. Фракции 2 и 3 имеют общую мажорную фракцию в районе 42 кДа, у фракции 3 также присутствует полоса 25 кДа, которой нет у других фракций первого пика. Фракция 4 (начало элюции) содержала наименее визуальнo выраженные полосы в диапазоне 32–70 кДа. Фракции 5,6 и 7, соответствующие группе гидрофобных соединений, характеризовались наличием наибольшего числа отдельных электрофоретических полос практически на всём диапазоне масс до 150 кДа. Можно отметить, что гидрофильные компоненты в основном имели молекулярную массу до 50 кДа, в то время как гидрофобные — от 15 до 120 кДа.

Как видно из рисунка 4, на фракциях 1 и 2 визуальнo заметны 6 отдельных электрофоретических полос (20, 27, 37, 40, 50, 60 кДа). При этом обе фракции визуальнo идентичны, и по всей видимости принадлежать отдельному пику. Фракции 3,4 и 5, соответствующие 2,3 и 4 пикам на хроматографии, не показали присутствия на электрофореграммах каких-либо полос. В дальнейшем видится актуальной оптимизация условий проведения гель-фильтрации и внедрение её в качестве второго этапа хроматографического анализа.

Иммунологическая активность отдельных фракций указана в таблицах 1–4.

Таблица 1.
Оптическая плотность отдельных фракций после хроматографического разделения

Титр сы- воротки	Номер фракции после хроматографии							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1/800	0,08	0,111	0,091	0,08	0,077	0,09	0,076	0,112
1/400	0,123	0,216	0,138	0,111	0,122	0,113	0,112	0,175
1/200	0,212	0,292	0,217	0,217	0,174	0,196	0,16	0,25
1/100	0,403	0,507	0,424	0,393	0,375	0,384	0,342	0,484

B. pseudomallei 57576 на сорбенте Phenyl-FF. Сыворотка мышиная мелиоидозная № 3898 в титрах 1/100 — 1/800 в МКБ. ОПкрит. 0,258.

Как видно из таблицы 1, наибольшую иммунологическую активность в методе ИФА показала фракция 2, чья оптическая плотность соответствовала положительному результату в разведении 1:200. Данная фракция соответствует вершине пика выхода гидрофильных белков *B. pseudomallei* 57576. Как видно из рисунка 4, на электрофореграмме данная фракция идентична фракции 1, и содержит три слабые полосы (15, 20 и 35 кДа). При этом разница в иммунологической активности между фракциями 1 и 2, свидетельствует о наличии компонентов, не детектируемых на электрофореграмме. На следующем этапе предполагается оптимизация условий проведения электрофореза.

Таблица 2.
Оптическая плотность отдельных фракций после хроматографического разделения

Титр сы- воротки	Номер фракции после хроматографии						
	1	2	3	4	5	6	7
1/800	0,035	0,134	0,037	0,011	0,124	0,12	0,078
1/400	0,134	0,189	0,101	0,155	0,107	0,122	0,1
1/200	0,189	0,201	0,177	0,2	0,141	0,157	0,16
1/100	0,319	0,431	0,210	0,25	0,294	0,266	0,233

B. pseudomallei 57576 на сорбенте «DEAE-sephadex A-25». Сыворотка мышиная мелиоидозная № 3898 в титрах 1/100–1/800 в МКБ. ОПкрит. 0,258.

Как видно из таблицы 2, только 4 из 7 фракций проявили достаточно высокую иммунологическую активность в исследовании методом ИФА. При этом оптическая плотность фракций положительно заряженных белков, полученных в процессе элюирования, была заметно ниже плотности фракций, не связавшихся с сор-

бентом (в среднем 0,28 и 0,375, соответственно). Ни одна из фракций не проявила иммунологической активности в титре 1:200 или выше.

Таблица 3.

Оптическая плотность отдельных фракций после хроматографического разделения

Титр сыворотки	Номер фракции после хроматографии									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1/800	0,107	0,096	0,118	0,127	0,101	К-	0,081	К-	0,114	К-
1/400	0,161	0,121	0,172	0,193	0,17	0,131	0,138	0,136	0,185	0,286
1/200	0,275	0,205	0,317	0,347	0,315	0,259	0,229	0,261	0,359	0,593
1/100	0,602	0,452	0,586	0,637	0,537	0,508	0,44	0,463	0,668	0,993

B. pseudomallei 57576 на сорбенте 5RPC. Сыворотка мышьяная мелиоидозная № 3898 в титрах 1/100–1/800 в МКБ. ОКрит. 0,258.

Как видно из таблицы 3, 8 из 10 фракций проявили достаточно высокую иммунологическую активность в исследовании методом ИФА. Наиболее активной проявила себя фракция 10, соответствующая комплексу нескольких пиков в завершающей фазе элюции ацетонитрилом (положительный результат с сывороткой в титре 1:400). Также данная фракция единственная имела очень чёткую полосу в районе 66 кДа на электрофорезе. Можно отметить существенную разницу между иммунологической активностью фракций в двух вариантах обращенно-фазной хроматографии (Phenyl-FF и 5RPC). При одинаковом по составу и концентрации исходном материале, в случае использования сорбента 5RPC получалось выделить большее количество активных фракций, при их очевидно, меньшей концентрацией на электрофореграмме. При использовании колонки с Phenyl-FF, наиболее активная фракция находилась в составе гидрофильных белков, а при использовании 5RPC — в составе гидрофобных белков. В целом все выделенные методом обращенно-фазовой хроматографии фракции, в отличие от фракций после анионообменной хроматографии, проявляли иммунологическую активность как минимум при титре сыворотки 1:100.

Как видно из таблицы 4, использование хроматографически очищенных антигенных комплексов в качестве сенситина, в отличие от водно-солевого экстракта дезинтегрированных ультразвуком клеток *B. pseudomallei* 57576, позволило повысить специфичность иммуноферментной реакции. Так, при использовании антигенов, полученных методом водно-солевой экстракции, перекрестные реакции были отмечены с сыворотками против *B. cepacia*, *B. thailandensis*, *B. mallei*, а также против некоторых видов *Pseudomonas* spp. Хроматографи-

Таблица 4.

Оптическая плотность отдельных фракций антигенов *B. pseudomallei* 57576 с сыворотками против близкородственных микроорганизмов в ИФА после хроматографического разделения на сорбенте Sephacryl S-100

Направленность сывороток	ВСЭ	1	2	3	4	5
Нормальная кроличья сыворотка	0,146	0,08	0,071	0,095	0,096	0,091
<i>B. cepacia</i> 25416	0,176	0,14	0,26	0,109	0,118	0,113
<i>B. cepacia</i> 5157	0,63	0,187	0,271	0,138	0,131	0,158
<i>B. cepacia</i> 8235	0,246	0,167	0,347	0,163	0,15	0,168
<i>B. cepacia</i> 8237	0,141	0,086	0,105	0,107	0,1	0,119
<i>B. mallei</i> 10230 (1)	3,031	3,055	1,824	3,054	3,032	3,104
<i>B. mallei</i> 10230 (2)	3,059	3,063	1,682	3,072	3,063	3,102
<i>B. pseudomallei</i> 110	1,267	2,381	3,055	1,808	2,008	2,136
<i>B. pseudomallei</i> 114	0,722	2,033	3,034	1,209	1,24	1,21
<i>B. pseudomallei</i> 57576 (1)	1,006	1,435	0,329	0,634	0,712	0,753
<i>B. pseudomallei</i> 57576 (2)	1,706	1,194	0,415	0,7	0,724	0,666
<i>B. thailandensis</i> смесь 4-х шт	0,602	0,114	0,059	0,118	0,111	0,109
<i>P. aeruginosa</i> H6 9220	0,109	0,077	0,061	0,084	0,087	0,104
<i>P. pseudocaligenes</i> 9036	0,477	0,071	0,09	0,096	0,097	0,096
<i>P. stutzeri</i> 5158	0,343	0,097	0,126	0,139	0,163	0,252
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	0,183	0,131	0,063	0,127	0,139	0,144

ческое разделение антигенов возбудителя мелиоидоза, в частности, использование фракций 1, 3, 4 и 5, привело к устранению перекрестных реакций с сыворотками против *Pseudomonas* spp. и других близкородственных буркхолдерий, за исключением *B. mallei*. Вероятно, положительные результаты в ИФА между используемыми антигенами *B. pseudomallei* и сыворотками, направленными к возбудителю сапа обусловлены высокой степенью гомологий между этими бактериями. Вероятным решением проблемы может явиться получение и использование рекомбинантных антигенов, уникальных для возбудителя мелиоидоза.

Заключение

В целом можно сказать, что хроматографический метод (в особенности гидрофобный вариант) показал эффективность при разделении всего пула клеточных белков *B. pseudomallei* на отдельные компоненты, в том числе и обладающие иммунологической активностью. При этом очевидно, что для выделения и очистки натив-

ных антигенов, необходимо последовательное использование нескольких вариантов хроматографического разделения. Дальнейшим этапом будет получение конкретного белкового антигена с последующим масштабированием схемы хроматографии до препаративного уровня, а также сравнение иммунологических свойств нативного и рекомбинантного антигенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Norman F.F., Chen L.H. Travel-associated melioidosis: a narrative review // *Journal of Travel Medicine*. — 2023. — V. 30. — №. 3. — P. taad039.
2. Hara Y. et al. Multiple-antigen ELISA for melioidosis—a novel approach to the improved serodiagnosis of melioidosis // *BMC infectious diseases*. — 2013. — V. 13. — P. 1–8.
3. Babaie M., Mosavari N., Fazilati M. Isolation and Purification of the *Burkholderia mallei* Antigenic Proteins and its use in diagnostic tests. *Archives of Razi Institute*. 2025;80(3):683–692. DOI: 10.32592/ARI.2025.80.3.683

© Король Екатерина Васильевна (katherina.korol@mail.ru); Терешко Дмитрий Леонидович (dltereshko@gmail.com);
Новицкая Ирина Вячеславовна (irvnov@mail.ru); Печёнкина Любовь Анатольевна (lyubov-vmu@yandex.ru);
Шаров Тимур Николаевич (timursharov@gmail.com)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»