

11. Torres L. de F., Ribeiro D., Hirata R., Jr. et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp. with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2013, 108 (3). pii: S0074-02762013000300272.
12. Zasada A.A, Formińska K., Wołkowicz T. et al. The utility of the PCR melting profile technique for typing *Corynebacterium diphtheriae* isolates. *Lett Appl. Microbiol.* 2014, 59 (3): 292-298.

Поступила 05.03.17

Контактная информация: Борисова Ольга Юрьевна, д.м.н.,
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (499)747-64-84

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

А.А.Калошин, А.В.Солдатенкова, Е.М.Зими́на, Н.А.Михайлова

ПОЛУЧЕНИЕ СЛИТЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ OprF-ΔOprI, ΔOprF-ΔOprI И OprF-aTox-ΔOprI PSEUDOMONAS AERUGINOSA

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Получение слитых рекомбинантных белков *Pseudomonas aeruginosa*, обладающих защитными свойствами от экспериментальной синегнойной инфекции. *Материалы и методы.* В плаزمидах, предназначенных для экспрессии в клетках *Escherichia coli*, клонированы слитые последовательности генов oprF, oprI и делеционной формы toxA *P. aeruginosa*. Синтезированные рекомбинантные белки очищали в колонках с никель-сефарозой. При оценке защитных свойств препараты рекомбинантных белков вводили мышам внутривентриально двукратно с двухнедельным интервалом. При экспериментальном заражении живую вирулентную культуру *P. aeruginosa* штамма PA103 инъецировали животным внутривентриально через две недели после курса иммунизаций. *Результаты.* Получены три слитых рекомбинантных белка: 1. OprF-ΔOprI включал полноразмерную последовательность белка OprF и делеционный вариант белка OprI (с отсутствием первых 20 аминокислотных остатков); 2. ΔOprF-ΔOprI состоял из C-концевой области (192 — 342 аминокислотные остатки) OprF и делеционного варианта белка OprI; 3. OprF-aTox-ΔOprI включал полноразмерную последовательность белка OprF, последовательность нетоксичного варианта экзотоксина А (без 106 C-концевых аминокислотных остатков) и делеционный вариант белка OprI. Показано, что наилучшими защитными свойствами обладали слитые рекомбинантные белки OprF-ΔOprI и OprF-aTox-ΔOprI в иммунизирующих дозах 25 мкг и 50 мкг на животное соответственно для первого и второго белков. *Заключение.* Полученные результаты открывают перспективы для дальнейших исследований по созданию специфических иммунобиологических препаратов на основе слитых рекомбинантных белков синегнойной палочки.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 32—38

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белок F наружной мембраны (OprF), белок I наружной мембраны (OprI), экзотоксин А, анатоксин, слитые рекомбинационные белки OprF-ΔOprI, ΔOprF-ΔOprI и OprF-aTox-ΔOprI

А.А.Калошин, А.В.Солдатенкова, Е.М.Зими́на, Н.А.Михайлова

OBTAINING FUSED RECOMBINANT PROTEINS OprF-ΔOprI, ΔOprF-ΔOprI AND OprF-aTox-ΔOprI OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Obtaining fused recombinant proteins of *Pseudomonas aeruginosa* that have protective properties against experimental pseudomonas infection. *Materials and methods.* Fused sequences of *P. aeruginosa* genes oprF, oprI and deleted form of toxA were cloned in plasmids for the expres-

sion in *Escherichia coli*. The synthesized recombinant proteins were purified in Ni-sepharose columns. Recombinant proteins were administered to mice intraperitoneally twice with a 2 week interval to evaluate protective properties. Virulent culture of *P. aeruginosa* strain PA103 was injected into the animals intraperitoneally 2 weeks after the immunization course as experimental challenge. **Results.** 3 fused recombinant proteins were produced: 1. OprF- Δ OprI included full sequence of OprF protein and deletion variant of OprI (lacking first 20 amino acids); 2. Δ OprF- Δ OprI consisted of C-terminal region (192 — 342 amino acids) OprF and deletion variant of OprI protein; 3. OprF-aTox- Δ OprI included full sequence of OprF protein, sequence of nontoxic variant of exotoxin A (without 106 C-terminal amino acids) and deletion variant of OprI protein. Fused recombinant proteins OprF- Δ OprI and OprF-aTox- Δ OprI at immunization doses of 25 and 50 μ g for the first and second protein, respectively, were shown to have the best protective properties. **Conclusion.** The results obtained open perspectives for further studies to create specific immune biological preparations based on fused recombinant proteins of *P. aeruginosa*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 32—38

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, F protein of the outer membrane (OprF), I protein of the outer membrane (OprI), exotoxin A, anatoxin, fused recombinant proteins OprF- Δ OprI, Δ OprF- Δ OprI and OprF-aTox- Δ OprI

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее серьезных возбудителей оппортунистических инфекций является синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*). Этот микроорганизм характеризуется высокой способностью к быстрому развитию резистентности к антибиотикам, что делает неэффективными общепринятые методы лечения. Поэтому актуальным является разработка иммунобиологических препаратов для борьбы с синегнойными инфекциями. Создание вакцин на основе протективных антигенов возбудителя пока не увенчалось положительными результатами из-за технологических трудностей выделения целевых антигенов, которые преодолимы с использованием генно-инженерных методов [6, 8, 9].

Ранее показано, что рекомбинантный белок F наружной мембраны (OprF) *P. aeruginosa* и делеционная форма экзотоксина А (анатоксин) *P. aeruginosa* способствовали защите иммунизированных мышей от экспериментальной внутрибрюшинной синегнойной инфекции. При этом комплексное введение обоих белков приводило к увеличению защитных свойств [2]. Поэтому представляло интерес получение слитного рекомбинантного белка, включающего аминокислотные последовательности OprF и анатоксина — OprF-aTox, который также показал свою эффективность [7]. С целью увеличения протективных свойств и спектра антигенных детерминант исследована возможность включения в состав вакцинного препарата белка I наружной мембраны (OprI). Ген этого белка был слит с геном белка OprF в двух вариантах, с получением слитых рекомбинантных белков OprF-OprI и Δ OprF-OprI. Показано, что в результате добавления последовательности белка OprI происходило усиление защитных свойств [3]. Однако все слитые рекомбинантные белки (OprF-OprI, Δ OprF-OprI и OprF-aTox) оказались не однородны в очищенных препаратах, что обусловило актуальность усовершенствования их структур. Кроме того, представлялось целесообразным объединение трех основных протективных антигенов в одном слитом рекомбинантном белке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генно-инженерные конструкции для синтеза слитых рекомбинантных белков OprF- Δ OprI и Δ OprF- Δ OprI получены с использованием рекомбинантных плазмид pQE30-oprF-oprI и pQE30- Δ oprF-oprI [3], несущих слитые гены

orfF (полноразмерный и кодирующий только 192 — 342 аминокислотные остатки) и orfI. Для удаления первых 60 нуклеотидов гена orfI использовали ПЦР. Прямой праймер для ПЦР (5'-TCA GAT CTG CAG CCA CTC CAA AGA AAC C) содержал нуклеотидные последовательности, кодирующие с 21 по 27 аминокислоты белка OrfI и имел на 5'-конце дополнительный сайт рестрикции BglII (подчеркнут). Обратный праймер для ПЦР (5'-TCA GAT CTC TTG GCT TCA GCT TCT ACT TC) был комплементарен концу гена orfF и также содержал на 5'-конце дополнительный сайт рестрикции BglII (подчеркнут). Полученные амплификаты после очистки в агарозном геле обработали рестриктазой BglII и использовали в реакции лигирования с T4 ДНК-лигазой. Продуктами лигирования трансформировали клетки *Escherichia coli* штамма M15 (QIAGEN).

Генно-инженерная конструкция для синтеза слитого рекомбинантного белка OrfF-atox-ΔOrfI получена на основе рекомбинантной плазмиды pET28-orfF-atox, несущей слитые гены полноразмерного orfF и делеционного варианта toxA (atox) [4]. При ПЦР гена orfI использовали следующие праймеры: 5'-A ACC TCG AGC AGC AGC CAC TCC AAA GAA AC и 5'-TTC CTC GAG TTA CTT GCG GCT GGC TTT TTC C. Они содержали на своих 5'-концах дополнительные сайты рестрикции XhoI (подчеркнуты). Первый праймер включал с 59 по 80 нуклеотидные последовательности гена orfI и имел после сайта рестрикции дополнительный нуклеотид (C) для восстановления рамки считывания, а второй был комплементарен концу гена orfI. В качестве матрицы для получения гена orfI служила плазмидная конструкция, предназначенная для экспрессии рекомбинантного белка OrfI [1]. Размер делеционного варианта гена orfI составил 210 нуклеотидов. Амплификат и векторную рекомбинантную плазмиду pET28-orfF-atox обработали рестриктазой XhoI и после очистки в агарозном геле объединили в реакции лигирования с T4 ДНК-лигазой. Полученную лигазную смесь использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21(DE3).

Все генно-инженерные манипуляции проводили в соответствии с общепринятыми методиками [10]. Отбор рекомбинантных клонов осуществляли по результатам рестриктного анализа и секвенирования. Секвенирование проводили с помощью капиллярного ДНК секвенатора (Applied Biosystems 310 DNA analyzer) с использованием BigDye Terminator v 3,1 Cycle Sequencing Kit в соответствии с рекомендациями фирмы производителя.

Синтез рекомбинантных белков с использованием созданных продуцентов осуществляли путем индукции экспрессии с помощью изопропил-β-Д-тиогалактопиранозида (ИПТГ). Белковые продукты анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли. Рекомбинантные белки очищали методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы (GE Healthcare, Швеция) в 8 М буферном растворе мочевины. Белковые препараты переводили в физиологический раствор хлорида натрия с помощью диализа.

Содержание белков определяли в спектрофотометре Genesys 6 (Thermo-scientific, США) при длине волны 280 нм. При расчете концентрации белков использовали следующие коэффициенты экстинкции: 0,6 для OrfF-ΔOrfI и 0,5 для ΔOrfF-ΔOrfI, 0,89 для OrfF-atox и 0,96 для OrfF-atox-ΔorfI, рассчитанные в программе OMIGA.

Иммуноблоттинг проводили по общепринятой методике [10]. При анализе использовали следующие иммунные сыворотки крови кроликов: к рекомбинантному белку OrfF [5], к рекомбинантному белку OrfI [1] и к ре-

комбинантному анатоксину [4]. Для предотвращения неспецифического взаимодействия поликлональной сыворотки крови с белками *E. coli* сыворотку обрабатывали бактериальным лизатом [10].

Для проведения иммунизации животных рекомбинантные белки сорбировали в течение суток при температуре 4 — 7°C на гидроксиде алюминия (гель гидроксида алюминия, НПО «Микроген») в соотношении 1:1. Препарат вводили мышам массой 18 — 20 г внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. Использовали двукратную с двухнедельным интервалом схему иммунизации.

Через две недели после второй иммунизации животных заражали внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл различными дозами живой вирулентной культуры *P. aeruginosa* (штамм PA103), выращенной на агаризованной среде Хоттингера. Подсчет погибших и выживших особей проводили в течение семи дней с последующим определением ЛД₅₀, которую вычисляли по формуле Кербера в модификации Ашмарина—Воробьева: $LD_{50} = 10^{(lgA - lg2 \times (B_1/C_1 + B_2/C_2 + B_3/C_3 + B_4/C_4 + B_5/C_5 - 0,5))}$, где А — максимальная инфекционная доза в опыте, В — количество животных, павших в группе, С — первоначальное количество животных в группе.

Все работы с животными проводили в соответствии с положениями «Правила проведения работ и использованием экспериментальных животных».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения рекомбинантных белков, содержащих слитые последовательности белка OprF (в полноразмерной и укороченной формах) и белка OprI с отсутствием первых двадцати аминокислот, проведены делеции в плазмидных конструкциях pQE30-oprF-oprI (4,7 kb) и pQE30-ΔoprF-oprI (4,3 kb), которые использовались для синтеза слитых рекомбинантных белков OprF-OprI (47,9 кДа) и ΔOprF-OprI (31,6 кДа) [6]. Делеции проводили с помощью ПЦР, амплифицируя в линейном виде плазмиды pQE30-oprF-oprI и pQE30-ΔoprF-oprI, у которых отсутствовали триплеты, кодирующие первые двадцать аминокислот белка OprI. Амплификаты (размером около 4,7 kb и 4,3 kb) после обработки рестриктазой BglII (содержались в последовательностях, используемых для ПЦР праймерах) замкнули на кольцевые формы в реакции лигирования. В результате экспрессии полученных модифицированных конструкций (pQE30-oprF-ΔoprI и pQE30-ΔoprF-ΔoprI) в клетках *E. coli* штамма M15 наблюдали синтез слитых рекомбинантных белков OprF-ΔOprI и ΔOprF-ΔOprI с массой около 50 и 30 кДа соответственно. Расчетные молекулярные массы данных белков соответствовали 46,8 и 30,5 кДа.

Для создания слитого рекомбинантного белка OprF-aTox-ΔOprI, включающего в своем составе аминокислотные последовательности основных протективных антигенов *P. aeruginosa*, использовали плазмидную конструкцию pET28-oprF-atox (8 kb), предназначенную для синтеза рекомбинантного белка OprF-aTox (103,6 кДа) [7]. В эту плазмиду встроили амплифицированный делеционный вариант гена oprI по сайту рестрикции XhoI, который был расположен после гена atox. В результате экспрессии полученной плазмидной конструкции pET28-oprF-atox-ΔoprI в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) происходил синтез рекомбинантного белка OprF-aTox-ΔOprI с массой около 110 кДа.

Рекомбинантные белки хроматографически очищали в колонках с никель-сефарозой, поскольку они имели на N-конце дополнительную 6-гистидиновую аминокислотную последовательность. Слитые рекомбинантные белки OprF-ΔOprI и ΔOprF-ΔOprI проявили высокую специфичность в иммуноблот-

тинге по отношению к кроличьим сывороткам, иммунным к отдельным рекомбинантным белкам *OrgF* и *OrgI*. Слитый рекомбинантный белок *OrgF-aTox-ΔOrgI* был специфичен в иммуноблоттинге при взаимодействии с кроличьими антисыворотками к отдельным рекомбинантным белкам *OrgF*, *OrgI* и анатоксину.

Защитные свойства очищенных гибридных белков оценены при экспериментальной синегнойной инфекции. При иммунизации рекомбинантными белками *OrgF-ΔOrgI* и *ΔOrgF-ΔOrgI* использовали дозы 25 и 50 мкг, а при иммунизации рекомбинантным белком *OrgF-aTox-ΔOrgI* использовали дозы 50 и 100 мкг. В качестве препарата сравнения при исследовании рекомбинантного *OrgF-aTox-ΔOrgI* использовали рекомбинантный белок *OrgF-aTox*, который вводили в дозах 50 и 100 мкг по аналогичной схеме.

После курса двукратной иммунизации животных заражали различными дозами с двукратным шагом (от 6,25 до 100 млн микробных клеток м.к.) живой вирулентной культурой *P. aeruginosa*. ЛД₅₀ для мышей, иммунизированных рекомбинантным белком *OrgF-ΔOrgI*, составила 50 млн м.к. при дозе 50 мкг и 53,59 млн м.к. при дозе 25 мкг. ЛД₅₀ в группах мышей, иммунизированных рекомбинантным белком *ΔOrgF-ΔOrgI* в тех же дозах, составила 46,65 и 43,53 млн м.к. соответственно. Значения ЛД₅₀ в группах мышей, иммунизированных рекомбинантным белком *OrgF-aTox-ΔOrgI*, составили 53,59 и 35,36 млн м.к. для доз введения 50 и 100 мкг соответственно. В то же время, аналогичные значения для групп мышей, иммунизированных рекомбинантным белком *OrgF-aTox*, составляли 40,61 и 32,99 млн м.к. В качестве контроля выступала группа неиммунизированных животных той же партии, которым водили от 3,125 до 50 млн

Исследование защитных свойств рекомбинантных белков *P. aeruginosa*

Группа животных	Доза заражения, млн м.к.	Количество мышей, павших/выживших	ЛД ₅₀ , млн м.к.	ИЭ*
Иммунизированные <i>OrgF-aTox</i> (50 мкг на мышь)	100	8/2	40,61	2,64
	50	5/5		
	25	3/7		
	12,5	2/8		
Иммунизированные <i>OrgF-aTox</i> (100 мкг на мышь)	100	10/0	32,99	2,14
	50	6/4		
	25	3/7		
	12,5	2/8		
Иммунизированные <i>OrgF-aTox-ΔOrgI</i> (50 мкг на мышь)	100	7/3	53,59	3,48
	50	4/6		
	25	2/8		
	12,5	1/9		
Иммунизированные <i>OrgF-aTox-ΔOrgI</i> (100 мкг на мышь)	100	8/2	35,36	2,30
	50	5/5		
	25	6/4		
	12,5	1/9		
Иммунизированные <i>OrgF-ΔOrgI</i> (50 мкг на мышь)	100	5/5	50,00	3,25
	50	4/6		
	25	4/6		
	12,5	2/8		
Иммунизированные <i>OrgF-ΔOrgI</i> (25 мкг на мышь)	100	7/3	53,59	3,48
	50	5/5		
	25	1/9		
	12,5	1/9		
Иммунизированные <i>ΔOrgF-ΔOrgI</i> (50 мкг на мышь)	100	8/2	46,65	3,03
	50	5/5		
	25	2/8		
	12,5	1/9		
Иммунизированные <i>ΔOrgF-ΔOrgI</i> (25 мкг на мышь)	100	10/0	43,53	2,83
	50	4/6		
	25	3/7		
	12,5	0/10		
Интактные мыши (контрольные)	50	10/0	15,39	—
	25	7/3		
	12,5	3/7		
	6,25	2/8		
		3,125	0/10	

Примечание. *ИЭ — индекс эффективности защитных свойств.

м.к. синегнойной культуры и ЛД₅₀ в которой соответствовала 15,39 млн м.к. (табл.)

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее получены и исследованы гибридные (слитые) рекомбинантные белки наружной мембраны *P. aeruginosa*: OprF-OprI и Δ OprF-OprI. Первый рекомбинантный белок включал полноразмерную последовательность, а второй С-концевую область (192 — 342 аминокислотные остатки) белка OprF, которые были слиты с полноразмерной последовательностью белка OprI [3]. В результате двукратной иммунизации установлено, что слитый рекомбинантный белок обладал более выраженным защитным эффектом в сравнении с использованием отдельного рекомбинантного белка OprF. Второй слитый рекомбинантный белок — Δ OprF-OprI, полученный с использованием делеционного варианта гена oprF, не показал достоверного преимущества по сравнению с рекомбинантным белком OprF. Хроматографически очищенные рекомбинантные белки OprF-OprI и Δ OprF-OprI состояли из двух фракций различной молекулярной массы. Молекулярная масса тяжелых фракций составляла около 50 кДа для белка OprF-OprI и около 30 кДа для белка Δ OprF-OprI, что соответствовало расчетным данным для слитых рекомбинантных белков. Молекулярная масса легких фракций соответствовала 40 кДа и 20 кДа. Тяжелые фракции реагировали с антисыворотками к обоим рекомбинантным белкам (OprF и OprI), в то время как легкие только с антисывороткой к рекомбинантному белку OprF. Разница в размерах фракций у обоих рекомбинантных белков составила 10 кДа, что соответствовало размеру рекомбинантного белка OprI. Предположительно, образование легких фракций происходило из-за отщепления аминокислотных последовательностей белка OprI в клетке-продуcente. Вероятно, в районе первых аминокислотных остатков последовательности белка OprI расположен сайт расщепления полипептидной цепи. Поэтому в рекомбинантных плазмидных конструкциях pQE30-oprF-oprI и pQE30- Δ oprF-oprI, предназначенных для экспрессии в бактериальных клетках *E. coli* штамма M15, проведена делеция нуклеотидной последовательности, кодирующей начальные аминокислотные остатки белка OprI. В результате удалось получить слитые рекомбинантные белки OprF- Δ OprI и Δ OprF- Δ OprI, уровень синтеза которых, визуально, оказался в несколько раз выше, чем у штаммов-продуцентов белков OprF-OprI и Δ OprF-OprI. При этом не происходило накопления в клетках более легких фракций, а рекомбинантные продукты проявили специфичность как с сывороткой к OprF, так и с сывороткой OprI.

Основой при создании конструкции, предназначенной для синтеза рекомбинантного белка, состоящего из слитых последовательностей основных протективных антигенов *P. aeruginosa*, стимулирующих иммунные реакции против поверхностных белков OprF и OprI, а также экзотоксина А, служила рекомбинантная плаزمида pET28b-oprF-atox [7]. Эта плазмида содержала полноразмерный ген oprF *P. aeruginosa* (1050 н.п.), встроенный по сайту рестрикции HindIII. После гена oprF по сайтам рестрикции HindIII и XhoI был встроен делеционный вариант гена toxA (ген, кодирующий экзотоксин А *P. aeruginosa*) — atox. Ген atox, размером 1593 н.п., кодировал полноразмерные первый и второй домены экзотоксина А и только часть третьего цитотоксического домена. Эти слитые последовательности генов oprF и atox находились под контролем регуляторных участков для экспрессии в бактериальных клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). В конце последовательности гена atox отсутствовал стоп-

кодон, что давало возможность для встраивания следующего гена, который представлял собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок OpgI *P. aeruginosa*, по сайту рестрикции XhoI. При этом проводили встраивание не полноразмерного гена, а последовательности с отсутствующими нуклеотидами, кодирующих первые двадцать аминокислот. В результате был получен слитый рекомбинантный белок OpgF-aTox-ΔOpgI, специфически реагирующий в иммуноблоттинге с антисыворотками к отдельным рекомбинантным белкам OpgF, opgI и анатоксину.

При подборе иммунизирующих доз для оценки защитных свойств в настоящем исследовании использовали дозы 25 и 50 мкг для слитых рекомбинантных белков OpgF-ΔOpgI и ΔOpgF-ΔOpgI. Для рекомбинантного белка OpgF-ΔOpgI, вводимого в дозе 25 мкг, индекс эффективности защитных свойств (соотношение значения ЛД₅₀ в опытной группе к значению ЛД₅₀ в контрольной группе) соответствовал 3,48, для варианта ΔOpgF-ΔOpgI — 3,03.

При исследовании слитого рекомбинантного белка OpgF-aTox-ΔOpgI использовали дозы 50 и 100 мкг. Наиболее эффективной для этого рекомбинантного белка можно считать дозу 50 мкг, при которой индекс эффективности соответствовал индексу эффективности слитого рекомбинантного белка OpgF-ΔOpgI — 3,48. Использование более высокой дозы в 100 мкг вызывало снижение индекса эффективности до 2,3.

Полученные предварительные результаты открывают перспективы для дальнейших исследований по созданию специфических иммунобиологических препаратов на основе слитых рекомбинантных белков синегнойной палочки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гатыпова Е.В., Злыгостев С.А., Калошин А.А., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантного белка I наружной мембраны (OpgI) *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его антигенных свойств. Журн. микробиол. 2008, 6: 50-53.
2. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств комплекса рекомбинантного белка F наружной мембраны и рекомбинантного анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2016, 71 (1): 5-10.
3. Калошин А.А., Михайлова Н.А., Леонова Е.И. Получение гибридного белка OpgF-OpgI *Pseudomonas aeruginosa*. Журн. микробиол. 2012, 3: 35-43.
4. Калошин А.А., Исаков М.А., Михайлова Н.А., Вергиев Ю.В. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 154 (9): 330-335.
5. Калошин А.А., Гатыпова Е.В., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств. Биотехнология. 2011, 2: 74-84.
6. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А. и др. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015, 17 (3): 170-186.
7. Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А., Зимина Е.М. и др. Получение рекомбинантного слитого белка OpgF-aTox *Pseudomonas aeruginosa*, обладающего защитными свойствами. Биопрепараты. 2016, 16 (2): 96-100.
8. Chatterjee M., Anju C.P., Biswas L. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. Int. J. Med. Microbiol. 2016, 306 (1): 48-58.
9. Doring G., Pier G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine. 2008, 26 (8): 1011-1024.
10. Sambrook J.F., Russell D.W. Molecular Cloning. 2001.

Поступила 22.05.17

Контактная информация: Калошин А.А.,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00