



УДК 616. 932(471)

DOI <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.24.110>

## Гидролазная активность наружной мембраны *Vibrio cholerae* серогрупп O1 и O139

С. Н. Козлов, Е. Ю. Марков, Л. Я. Урбанович, В. Б. Николаев

*Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора, Иркутск*  
E-mail: [ejimej@mail.ru](mailto:ejimej@mail.ru)

**Аннотация.** С применением комплекса зимографических методов (тесты радиальной энзимодиффузии в агарозном геле и субстратный электрофорез в полиакриламидном геле) в препаратах наружной мембраны, полученных из штаммов холерного вибриона O1 и O139 серогрупп разного происхождения и эпидемической значимости, изучен спектр и активность определённого набора гидролитических ферментов, являющихся специфичными для поверхностных структур бактериальной клетки. В качестве субстратов использованы коммерческие препараты желатина,  $\alpha$ -лецитина и протаминсульфата (специфичен для омпитиновых белков, обладающих ферментативной активностью), импрегнированные в агарозный и полиакриламидный гели соответственно пописям стандартного протокола зимографического анализа. В результате исследований обнаружены гидролазы, являющиеся маркерными для наружных мембран грамотрицательных бактерий – протеазы (желатиназы) и лецитиназы, выявлены достоверные межштаммовые различия в степени их продукции у токсигенных и нетоксигенных штаммов. Установлено, что большинство исследованных препаратов наружной мембраны обладает протеазной и лецитиназной активностью. Показано, что высокой протеолитической активностью в отношении желатина и протаминсульфата отличаются препараты наружных мембран, полученные из токсигенных штаммов холерного вибриона, в то время как препараты из нетоксигенных штаммов протеолитически менее активны. Электрофоретически обнаружено наличие лецитиназ в препаратах наружных мембран, при этом установлено, что лецитиназная активность и спектр лецитиназ препаратов наружных мембран из токсигенных штаммов меньше, чем у нетоксигенных штаммов. Обнаруженные различия в активности и составе ферментов позволяют в дальнейшем провести скрининг ферментативно активных штаммов холерного вибриона с целью изучения возможностей конструирования на их основе компонентов бесклеточной вакцины против холеры.

**Ключевые слова:** гидролазы, наружная мембрана, холерный вибрион, зимография.

**Для цитирования:** Гидролазная активность наружной мембраны *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп / С. Н. Козлов, Е. Ю. Марков, Л. Я. Урбанович, В. Б. Николаев // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2018. Т. 24. С. 110–117. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.24.110>

### **Введение**

Одним из важных структурно-функциональных компонентов наружной мембраны патогенных грамотрицательных бактерий, во многом определяющих стратегию возбудителя при взаимодействии с макроорганизмом, яв-

ляется наличие комплекса мембрансвязанных гидролитических ферментов. Ранее нами были получены препараты наружной мембраны холерного вибриона и показана их высокая протективная активность [Наружные мембраны ..., 1995; Получение высокоиммуногенного ..., 1998], однако вопрос наличия и состава гидролитических ферментов этих препаратов был малоизучен. В литературе имеется ряд сообщений об участии гидролаз, присутствующих в поверхностных структурах бактерий грамотрицательных бактерий, в активации врождённого иммунитета макроорганизма, установлена их протективная и иммуномодулирующая активность [Corruption of ..., 2009; Cysteine proteinase ..., 2011], что используется при конструировании диагностических и вакцинных препаратов [Адамов, 1982].

Цель работы – зимографическое выявление гидролаз в препаратах наружной мембраны *Vibrio cholerae* серогрупп О1 и О139 разного происхождения в радиальной энзимодиффузии в агарозном геле и субстратным электрофорезом в полиакриламидном геле.

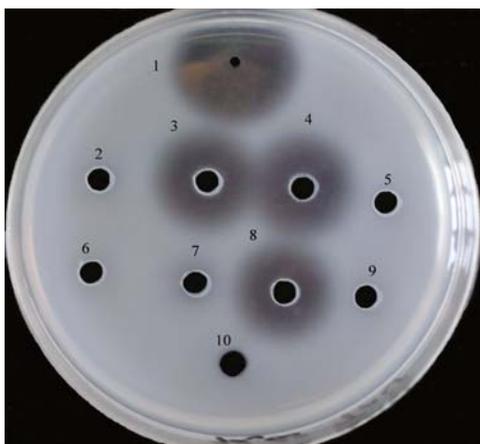
### **Материалы и методы**

В работе использовано 15 штаммов *V. cholerae eltor* серогруппы О1 и 3 штамма *V. cholerae* серогруппы О139, выделенных во время эпидемии от больных холерой (*V. cholerae eltor* О1 М-800, М-878, И-1263, И-1298, И-1299, И-1334, И-1342, И-1327, И-1337, *V. cholerae* О139 И-12, *V. cholerae* О139 59 Din) и поверхностных водоёмов в благополучный по холере период (И-638, 129-05-В, 2131, И-1369, И-680, 2-01, *V. cholerae* О139 И-16), предоставленные музеем живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института. Бактерии культивировали на казеин-дрожжевом агаре (рН 7,6). Суточную культуру каждого штамма вибриона, выращенного при 37 °С, смывали забуференным физиологическим раствором. Препараты наружной мембраны получали, лизируя и одновременно обеззараживая живые клетки холерных вибрионов раствором 4,5 М мочевины с последующим дифференциальным центрифугированием (Z36 НК, Hermle Labortechnik, Германия), и обработкой полученных препаратов нуклеазами (Sigma-Aldrich, США), как описано в работах [Наружные мембраны ..., 1995; Получение высокоиммуногенного ..., 1998]. После суточной экспозиции неразрывимый в мочеине материал (наружная мембрана возбудителя холеры, НМ) отделяли высокоскоростным центрифугированием (Z36 НК, Hermle Labortechnik, Германия), подвергали диализу против проточной и дистиллированной воды и лиофилизировали. Зимографический анализ осуществляли посредством ДСН-электрофореза в блоках 8%-ного ПААГ, импрегнированного в процессе полимеризации разделяющего геля 0,1 % (вес/объём) раствором желатина,  $\alpha$ -лецитина, протаминсульфата по методу С. Neussen с соавторами [Electrophoretic analysis ..., 1980] и с помощью тестов радиальной энзимодиффузии в 1%-ном агарозном геле, содержащем указанные субстраты в конечной концентрации 0,5 %. О наличии гидролитической активности судили по образованию неокрашенных зон (полос) гидролиза на фоне окрашенных субстратных гелей в случае энзим-электрофореза и образова-

нию зон просветления на фоне мутного геля в случае тестов радиальной энзимодиффузии после обработки гелей 20%-ной трихлоруксусной кислотой. Статистическую обработку данных осуществляли с определением средних величин и ошибки средней, результаты считали достоверными, если вероятность ошибки не превышала 0,05 ( $p < 0,05$ ) в пакете программ Statistica 7.0. для Windows.

### **Результаты и обсуждение**

Зимографически показано, что большинство исследованных препаратов наружной мембраны обладают протеазной и лецитиназной активностью. Высокая протеолитическая активность отмечена в препаратах НМ, полученных из токсигенных штаммов холерных вибрионов – зоны гидролиза ( $3 \pm 0,02$ ) мм ( $p < 0,05$ ), (рис. 1, лунки 3, 4, 8.), препараты из нетоксигенных штаммов, изолированных из водоёмов в благополучный по холере период, оказались протеолитически менее активными ( $1 \pm 0,02$ ) мм ( $p < 0,05$ ) (см. рис. 1, лунки 5, 6, 9).



*Рис. 1.* Результат теста радиальной энзимодиффузии препаратов наружной мембраны штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 с 0,1%-ным желатином в качестве субстрата. 1 – трипсин 1 мг/мл; 2 – НМ *V. cholerae eltor* O1 М-800 ( $ctx^+$ ); 3 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1263 ( $ctx^+$ ); 4 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1334 ( $ctx^+$ ); 5 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-638 ( $ctx^-$ ); 6 – НМ *V. cholerae eltor* O1 2-01 ( $ctx^-$ ); 7 – НМ *V. cholerae* O139 И-12; 8 – НМ *V. cholerae eltor* O1 М-878 ( $ctx^+$ ); 9 – НМ *V. cholerae* O139 И-16 ( $ctx^-$ ); 10 – бидистиллированная вода (отрицательный контроль)

С помощью энзим-электрофореза показано, что препараты НМ обладают лецитиназной активностью (рис. 2). Отмечено, что активность препаратов токсигенных штаммов была относительно ниже, чем из нетоксигенных (см. рис. 2). “Размазанность” треков с лецитиназой на зимограммах объясняется недостаточностью диссоциации препаратов НМ в условиях энзим-электрофореза в присутствии детергента, но без термической обработки с образованием комплексов, незначительно отличающихся друг от друга по молекулярной массе и обладающих ферментативной активностью.

При изучении спектра протеаз НМ в энзим-электрофорезе в ПААГ с желатином взятых в исследование штаммов установлено, что препараты, полученные из токсигенных штаммов, характеризуются большей активностью желатиназ, чем из нетоксигенных (рис. 3, табл.).

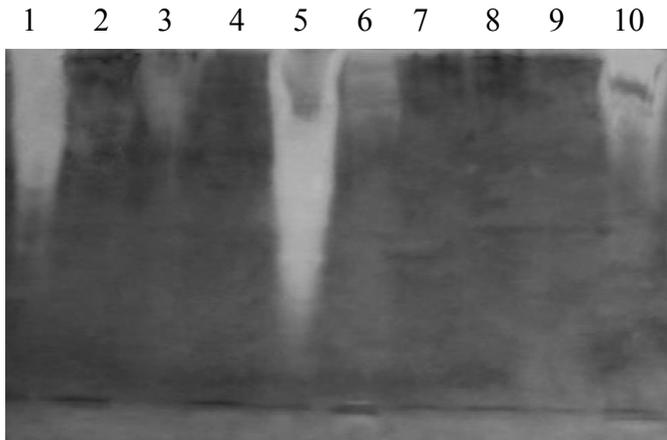


Рис. 2. Энзим-электрофореграмма лецитиназ препаратов субклеточных фракций штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 с 0,1%-ным лецитином в качестве субстрата. Окраска 0,25%-ным раствором Кумасси R-250. 1 – НМ *V. cholerae* eltor O1 М-878 ( $ctx^+$ ); 2 – МЭ *V. cholerae* eltor O1 129-05-В ( $ctx^-$ ); 3 – НМ *V. cholerae* eltor O1 2-01 ( $ctx^-$ ); 4 – НМ *V. cholerae* cholerae 569В ( $ctx^+$ ); 5 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-638 ( $ctx^-$ ); 6 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-1263 ( $ctx^+$ ); 7 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-1337 ( $ctx^+$ ); 8 – НМ *V. cholerae* eltor O1 2131 ( $ctx^-$ ); 9 – МЭ *V. cholerae* eltor O1 И-1369 ( $ctx^-$ ); 10 – МЭ *V. cholerae* O139 И-16 ( $ctx^-$ )

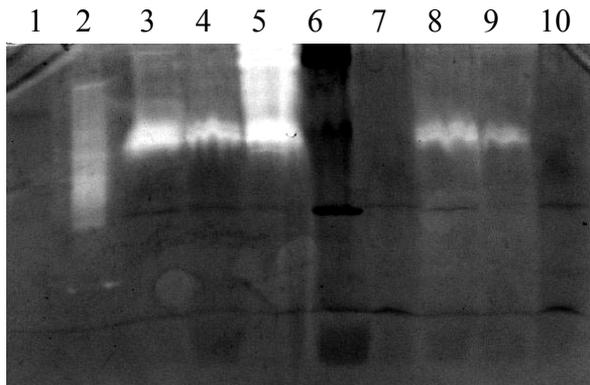


Рис. 3. Энзим-электрофореграмма препаратов наружной мембраны штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 в 10%-ном ПААГ с 0,1%-ным желатином в качестве субстрата. 1 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-1327 ( $ctx^-$ ); 2 – НМ *V. cholerae* eltor O1 М-878 ( $ctx^+$ ); 3 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-1263 ( $ctx^+$ ); 4 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-1327 ( $ctx^+$ ); 5 – НМ *V. cholerae* eltor O1 М-800 ( $ctx^+$ ); 6 – НМ *V. cholerae* eltor O1 129-05-В ( $ctx^-$ ); 7 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-638 ( $ctx^-$ ); 8 – НМ *V. cholerae* O139 И-12 ( $ctx^+$ ); 9 – НМ *V. cholerae* O139 59 Din ( $ctx^+$ ); 10 – НМ *V. cholerae* O139 И-16 ( $ctx^-$ )

Препараты НМ токсигенных штаммов проявили такую же тенденцию при гидролизе протаминсульфата – специфического для омптинов субстрата, что указывает на присутствие их в составе белков наружной мембраны OmpT и OmpU, характеризующихся наличием иммуногенных свойств [The OmpU ..., 1995].

Таблица

Характеристика гидролитической активности препаратов наружной мембраны в тестах радиальной энзимодиффузии ( $p < 0,05$ )

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Желатиновая активность (мм)	Лецитиновая активность (мм)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 М-878 ( $ctx^+$ )	(6±0,03)	(5±0,02)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 М-800 ( $ctx^+$ )	(2±0,02)	(4±0,02)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1263 ( $ctx^+$ )	(4±0,03)	(4±0,03)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1337 ( $ctx^+$ )	(4±0,02)	(3±0,03)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1327 ( $ctx^-$ )	(1±0,02)	(2±0,02)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1299 ( $ctx^-$ )	(2±0,03)	(1±0,02)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1369 ( $ctx^-$ )	(2±0,02)	(1±0,02)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 2131 ( $ctx^-$ )	(1±0,03)	(1±0,02)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 129-05-B ( $ctx^-$ )	(2±0,02)	(1±0,03)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-638 ( $ctx^-$ )	(1±0,03)	(1±0,02)
<i>V. cholerae</i> eltor O1 2-01 ( $ctx^-$ )	(2±0,03)	(1±0,03)
<i>V. cholerae</i> O139 И-12 ( $ctx^+$ )	(3±0,02)	(3±0,02)
<i>V. cholerae</i> O139 59 Din ( $ctx^+$ )	(4±0,03)	(3±0,02)
<i>V. cholerae</i> O139 И-16 ( $ctx^-$ )	(1±0,02)	(2±0,02)

### Заключение

Таким образом, в препаратах НМ, полученных из штаммов *Vibrio cholerae* серогрупп О1 и О139 разного происхождения, зимографически выявлено наличие гидролаз, обладающих протеазной (желатиновой) и лецитиновой (фосфолипазной) активностью, установлены межштаммовые различия в активности выявленных ферментов у препаратов НМ. По результатам тестов радиальной энзимодиффузии препараты НМ токсигенных штаммов проявляют большую ферментативную активность в сравнении с нетоксигенными. Высокая иммуногенность препарата НМ, установленная ранее [Наружные мембраны ..., 1995; Получение высокоиммуногенного ..., 1998], объясняется, по-видимому, сохранением препаратами ряда свойств, присущих поверхностным структурам живых клеток, таких как ферментативная активность и наличие адгезивной активных липополисахаридов и омпитинов [Характеристика иммунобиологических ..., 1996], что даёт возможность использования препаратов наружной мембраны холерного вибриона для конструирования противохолерной химической вакцины.

### Список литературы

- Адамов А. К. Метаболический иммунитет к холере. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 1982. 176 с.
- Наружные мембраны холерного вибриона как потенциальный компонент химической вакцины / Е. Ю. Марков, А. Я. Урбанович, Е. П. Голубинский, А. Б. Чернов // Журн. микробиол. 1995. № 2. С. 86–89.
- Получение высокоиммуногенного препарата наружных мембран *Vibrio cholerae* eltor / Е. Ю. Марков, Л. Я. Урбанович, Е. П. Голубинский, Э. С. Каретникова, Т. А. Иванова, В. Б. Николаев, Н. П. Завезенов, Е. Н. Субычева // Журн. инфекц. патологии. 1998. Т. 5, № 4. С. 42–48.

Характеристика иммунобиологических свойств антигенного препарата наружных мембран холерного вибриона / Л. Я. Урбанович, Е. Ю. Марков, Е. П. Голубинский, Р. С. Колесник, С. Г. Саппо, В. С. Ганин, Э. С. Каретникова, Т. А. Иванова // Биотехнология. 1996. № 6. С. 27–33.

Potempa J., Pike R. N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases // J. Innate Immun. 2009. Vol. 1, N 2. P. 70–87. <https://doi.org/10.1159/000181144>.

Nelson D. C., Carbe J., Collin M. Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* – a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins // Biochem. 2011. Vol. 392, N 12. P. 1077–1088. <https://doi.org/10.1515/BC.2011.208>.

Heussen C., Dowdle E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates // Anal. Biochem. 1980. Vol. 102, N 1. P. 196–202. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90338-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90338-3).

The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae* / V. Sperandio, J. A. Girón, W. D. Silveira, J. B. Kaper // Infect. Immun. 1995. Vol. 63, N 11. P. 4433–4438.

## Hydrolase Activity of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Strains Outer Membranes

S. N. Kozlov, E. Yu. Markov, L. Ya. Urbanovich, V. B. Nikolaev

*Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор, Irkutsk*

**Abstract.** By means of a zymography (tests of a radial enzyme diffusion in agarose gel and a substrate electrophoresis in polyacrylamide gel) in the preparations of an outer membrane received from strains of a cholera vibrio of O1 and O139 serogroups of different origin and the epidemic importance a range and activity of a certain set of the hydrolytic enzymes which are specific to superficial structures of a bacterial cell have studied. For this purpose as substrate commercial preparations of gelatin,  $\alpha$ -lecithin and the protamine sulfate (it is specific to the omptin proteins having enzymatic activity) which were impregnated in agarose and polyacrylamide gels according to copy-books of the standard protocol of the zymographic analysis have been taken. As a result of the conducted researches the hydrolases which are marker for outer membranes of gram negative bacteria – proteases (gelatinases) and lecithinases are found, reliable interstrains differences in degree of their production between toxigenic and nontoxigenic strains are revealed. It is established that the majority of the preparations of an outer membrane taken in a research has protease and lecithinase activity. It is shown that concerning gelatin and the protamin sulfate the preparations of outer membranes received from toxigenic strains of a cholera vibrio while preparations from nontoxigenic strains proteolytic are less active differ in high proteolytic activity. Electrophoretically existence lecithinases in preparations of outer membranes is revealed, however it is established that the lecithinase activity and a spectrum of lecithinases are less than preparations of outer membranes from toxigenic strains, than at nontoxigenic strains. Thus, zymographically the found differences in activity and composition of enzymes allow to carry out further screening of enzymatically active strains of a cholera vibrio for their more detailed studying and designing on their basis as one of components of the acellular vaccine against cholera.

**Keywords:** hydrolase, outer membrane, *V. cholerae*, zymography.

**For citation:** Kozlov S.N., Markov E.Yu., Urbanovich L.Ya., Nikolaev V.B. Hydrolase Activity of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Outer Membranes. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2018, vol. 24, pp. 110–117. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.24.110> (in Russian)

## References

- Adamov A.K. *Metabolicheskii immunitet k kholere* [Metabolic Immunity to Cholera]. Saratov, Saratov St. Univ. Publ., 1982, 176 p.
- Markov E.Yu., Urbanovich L.Ya., Golubinskii E.P., Chernov A.B. Naruzhnye membrany kholernogo vibriona kak potentsial'nyi komponent khimicheskoi vaksiny [Outer Membranes of Vibrio cholerae as Potential Component of Chemical Vaccine]. *Zhurn. mikrobiologii* [Journal of Microbiology], 1995, no 2, pp. 86-89. (in Russian).
- Markov E.Yu., Urbanovich L.Ya., Golubinskii E.P., Karetnikova E.S., Ivanova T.A., Nikolaev V.B., Zavezenov N.P., Subycheva E.N. Poluchenie vysokoimmunogennoho preparata naruzhnykh membran Vibrio cholerae eltor [Production of High Immunogenic Preparation of Vibrio cholerae eltor Outer Membranes]. *Zhurn. infeksionnoi patologii* [Journal of Infection Pathology], 1998, vol. 5 no. 4, pp. 42-48. (in Russian).
- Urbanovich L.Ya., Markov E.Yu., Golubinskii E.P., Kolesnik R.S., Sappo S.G., Ganin V.S., Karetnikova E.S., Ivanova T.A. Kharakteristika immunobiologicheskikh svoistv antigeno-nogo preparata naruzhnykh membran kholernogo vibriona [Description of Immunobiological Properties of Antigenic Preparation of Vibrio cholerae Outer Membranes]. *Biotekhnologiya* [Biotechnology], 1996, no. 6, pp. 27-33. (in Russian).
- Potempa J., Pike R.N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.*, 2009, vol. 1 no. 12, pp. 70-87. <https://doi.org/10.1159/000181144>
- Nelson D.C., Carbe J., Collin M. Cysteine proteinase SpeB from Streptococcus pyogenes – a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biochem.*, 2011, vol. 392 no 12, pp. 1077–1088. <https://doi.org/10.1515/BC.2011.208>
- Heussen C., Dowdle E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102 no. 1, pp. 196-202. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90338-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90338-3)
- Sperandio V., Girón J.A., Silveira W.D., Kaper J.B. The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of Vibrio cholerae. *Infect. Immun.*, 1995, vol. 63 no. 11, pp. 4433-4438.

*Козлов Станислав Николаевич*  
научный сотрудник  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилиссера, 78  
тел.: (3952) 22–01–38  
e-mail: ejimei@mail.ru

*Kozlov Stanislav Nikolaevich*  
Research Scientist  
Irkutsk Anti-plague Research Institute of  
Siberia and Far East of Rosпотребнадзор  
78, Trilisser st., 664047, Russian Federation  
tel.: (3952) 22–01–38  
e-mail: ejimei@mail.ru

*Марков Евгений Юрьевич*  
доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник,  
заведующий отделом  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилиссера, 78  
тел.: (3952) 22–01–38  
e-mail: markov\_evgenii@mail.ru

*Markov Evgeniy Yurievich*  
Doctor of Sciences (Biology), Senior  
Research Scientist, Head of department  
Irkutsk Anti-plague Research Institute of  
Siberia and Far East of Rosпотребнадзор  
78, Trilisser st., Irkutsk, 664047, Russian  
Federation  
tel.: (3952) 22–01–38  
e-mail: markov\_evgenii@mail.ru

*Урбанович Людмила Яковлевна*  
доктор медицинских наук  
старший научный сотрудник  
Иркутский научно-исследовательский

*Urbanovich Lyudmila Yakovlevna*  
Doctor of Sciences (Medicine),  
Senior Research Scientist  
Irkutsk Anti-plague Research Institute of

*противочумный институт  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилиссера, 78  
тел.: (3952) 22-01-38*

*Николаев Валерий Борисович  
кандидат медицинских наук  
старший научный сотрудник  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилиссера, 78  
тел.: (3952) 22-01-38  
e-mail: balera58.58@mail.ru*

*Siberia and Far East of Rospotrebnadzor  
78, Trilisser st., Irkutsk, 664047, Russian  
Federation  
tel.: (3952) 22-01-38*

*Nikolaev Valerii Borisovich  
Candidate of Sciences (Medicine)  
Senior Research Scientist  
Irkutsk Anti-plague Research Institute of  
Siberia and Far East of Rospotrebnadzor  
78, Trilisser st., Irkutsk, 664047, Russian  
Federation  
tel.: (3952) 22-01-38  
e-mail: balera58.58@mail.ru*

**Дата поступления:** 20.12.2017

**Received:** December, 20, 2017