

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ В *ESCHERICHIA COLI* ГЕНОВ А- И В-СУБЪЕДИНИЦ РИЦИНА В СОСТАВЕ ХИМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С ГЕНОМ ДИГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ

*М.А. Грачева, *З.М. Галушкина, *Н.Н. Полетаева,

*Л.В. Верховская, *В.Г. Лунин, В.И. Швец

*ГУ НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН

В *Escherichia coli* клонированы и экспрессированы химерные конструкции RTA-DHFR и RTB-DHFR, состоящие из генов А- и В-субъединиц рицина (RTA и RTB) и гена дигидрофолатредуктазы (DHFR). Установлено, что антигенные свойства RTA и RTB в составе химерных белков RTA-DHFR и RTB-DHFR сохраняются.

Рицин – сильнодействующий токсин растительного происхождения, содержащийся в большом количестве в семенах клещевины (*Ricinus communis*). Он представляет серьезную опасность из-за возможности его использования в качестве химического оружия [1, 2]. Кроме того, следы рицина могут присутствовать в касторовом масле, используемом в медицине. Летальная доза рицина для человека при пероральном введении составляет 3 – 5 мкг/кг [3].

На сегодняшний день не существует препаратов для профилактики и лечения отравления рицином, в связи с чем чрезвычайный интерес представляет создание эффективной и безопасной вакцины. Кроме того, большой практический интерес представляет разработка тест-системы для экспресс-индикации рицина, например, на основе ИФА. Производство вакцин и тест-систем требует получения антигенов рицина, а также антител к нему.

Рицин является гликопротеином, белковая часть молекулы которого построена из двух субъединиц – каталитической А-субъединицы (RTA, Ricinus Toxin A-chain) и лектиновой В-субъединицы (RTB, Ricinus Toxin B-chain), соединенных одной дисульфидной связью. RTA (34 кДа) – высоко активная N-гликозидаза, отщепляющая аденин в 28S-рРНК эукариот. В результате отщепления аденина рибосомы утрачивают способность связывать факторы элонгации, что ведёт к блокированию синтеза новых белков, и вызывает апоптоз

и гибель эукариотических клеток. RTB (32 кДа) – лектин, выполняющий транспортные функции, связывающийся с концевыми остатками D-галактозы и N-ацето-галактозамина углеводных цепей рецепторных гликопротеинов и гликолипидов поверхности эукариотической клетки и обуславливающий эндоцитоз и дальнейший транспорт токсина [4, 5].

Работа с нативным рицином для производства вакцин и тест-систем крайне сложна ввиду его высокой токсичности. Следует отметить, что RTA и RTB по отдельности значительно менее токсичны, чем нативный рицин, и при этом они сохраняют антигенные свойства нативного рицина при проведении иммунохимических реакций. Поэтому перспективным подходом для решения проблемы токсичности является получение рекомбинантных RTA и RTB.

Ранее уже были предприняты попытки получения рекомбинантных RTA [6, 7] и RTB [8, 9]. При этом исследователи сталкивались с нестабильностью, низкой растворимостью, склонностью к агрегации полученных продуктов, а также с их токсичностью и низким уровнем экспрессии. Эти трудности решали как введением мутаций в последовательности рекомбинантных RTA и RTB, так и получением этих белков в составе химерных белков с белками-носителями и с сигнальными последовательностями.

Для увеличения уровня продукции рекомбинантных белков в генной инженерии часто применяют технологию слитых (химерных) белков, в основе

которой лежит подход, основанный на соединении в одной рамке трансляции двух генов – гена белка-носителя и гена исследуемого продукта. Эта технология позволяет получать рекомбинантные белки, устойчивые к протеолизу и другим факторам, мешающим эффективной продукции белка в клетках штамма-производителя [10]. В настоящее время в качестве белка-носителя широко используют мышиную дигидрофолатредуктазу (DHFR). Известно, что DHFR не влияет на антигенные свойства полученных в слиянии с ней антигенов, а также увеличивает их иммуногенность [11]. При этом DHFR, сама по себе, обладает низкой иммуногенностью.

Целью данной работы являлось клонирование последовательностей, кодирующих рекомбинантные химерные

белки RTA-DHFR и RTB-DHFR, включающие в свой состав полно-размерные RTA и RTB, соответственно, а также белок-носитель DHFR, экспрессия этих последовательностей в *E. coli* и исследование антигенных свойств полученных белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование плазмид pRTA и pRTB и их экспрессия в E. coli. На начальном этапе работы были получены генно-инженерные конструкции (плазмиды) pRTA и pRTB (рис. 1), содержащие в своем составе нуклеотидные последовательности, кодирующие полно-размерные RTA и RTB. Нуклеотидные последовательности pRTA и pRTB были подтверждены секвенированием.

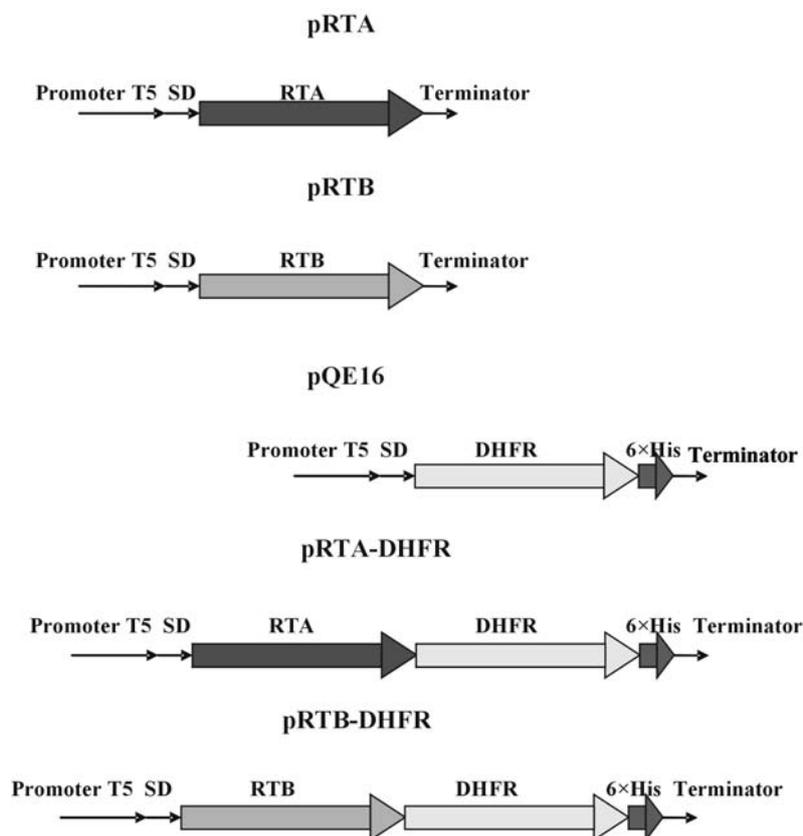


Рис. 1. Генно-инженерные конструкции pRTA, pRTB, pQE16, pRTA-DHFR, pRTB-DHFR. Promoter T5 – промотор бактериофага T5; SD – последовательность Шайна-Дальгарно; RTA – нуклеотидная последовательность, кодирующая А-субъединицу рицина; RTB – нуклеотидная последовательность, кодирующая В-субъединицу рицина; DHFR – нуклеотидная последовательность, кодирующая мышиную дигидрофолат-редуктазу, 6×His – нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность, состоящую из шести остатков гистидина. Terminator – терминатор транскрипции.

Анализ результата экспрессии генов, кодирующих RTA и RTB, в *E. coli* при помощи электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) не показал появления белковых полос ожидаемого молекулярного веса (≈ 34 кДа и ≈ 32 кДа). Возможно, отсутствие видимой экспрессии связано с протеолизом чужеродных для *E. coli* белков RTA и RTB.

Конструирование плазмид pRTA-DHFR и pRTB-DHFR. С целью увеличения уровня продукции антигенов RTA и RTB было решено применить технологию химерных белков, с использованием DHFR в качестве белка-носителя. DHFR содержит гидрофобные области, которые способствуют образованию телец включения при синтезе химерных белков в цитоплазме клеток *E. coli*. Тельца включения представляют собой водонерастворимые обособленные компартменты, препятствующие Действию протеолитических ферментов [11].

Для получения химерных белков RTA-DHFR и RTB-DHFR использовали экспрессионную плазмиду pQE16 фирмы QIAGEN. Особенность этой плазмиды состоит в том, что она уже содержит последовательность, кодирующую в одной рамке считывания DHFR и пептид из шести аминокислотных остатков гистидина (6×His) на С-конце DHFR. Эта плазида позволяет получать антигены в составе химерных

белков с DHFR, очистку которых можно производить в одну стадию с помощью металлохелатной хроматографии, на колонке с сорбентом, содержащим комплекс Ni^{2+} -нитрилотриуксусная кислота (Ni-NTA). Последовательность 6×His обеспечивает высокоэффективное аффинное связывание рекомбинантных химерных белков с Ni-NTA-содержащими сорбентами, способствуя, таким образом, высокой технологичности получения этих химерных белков. Было показано, что последовательность 6×His не снижает биологической активности экспрессируемых белков и сама по себе обладает низкой иммуногенностью [11].

В результате были созданы генно-инженерные конструкции pRTA-DHFR и pRTB-DHFR, содержащие в своем составе нуклеотидные последовательности, кодирующие химерные белки RTA-DHFR и RTB-DHFR, состоящие из полноразмерных RTA и RTB, соответственно, и DHFR (рис. 1). Нуклеотидные последовательности pRTA-DHFR и pRTB-DHFR были подтверждены секвенированием.

Экспрессия RTA-DHFR и RTB-DHFR в E. coli. При изучении кривых роста штаммов *E. coli* M15 [pRep4], трансформированных плазмидами pRTA-DHFR, pRTB-DHFR, pQE16 (рис. 2), наблюдали замедление роста клеток штамма M15 [pRep4, pRTA-DHFR], по сравнению с ростом клеток M15 [pRep4, pRTB-DHFR] и M15 [pRep4, pQE16].

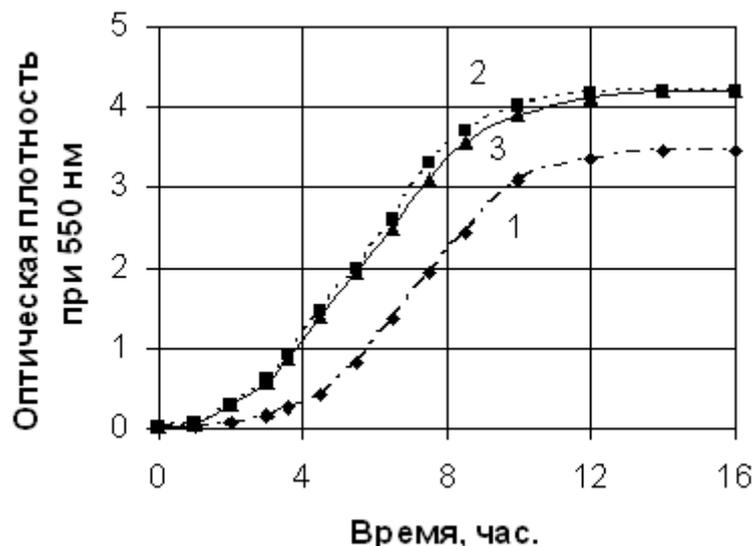


Рис. 2. Динамика роста клеток *E. coli* штаммов M15 [pRep4, pRTA-DHFR] – кривая 1, M15 [pRep4, pRTB-DHFR] – кривая 2 и M15 [pRep4, pQE16] – кривая 3 при 37 °C, при качении 240 об./мин, в колбах объемом 500 мл, в 100 мл среды LB.

Кроме того, наблюдали снижение выхода биомассы штамма M15 [pRep4, pRTA-DHFR] на 18% по сравнению с выходом биомассы штаммов M15 [pRep4, pRTB-DHFR] и M15 [pRep4, pQE16]. Эти факты могут свидетельствовать о токсичности для клеток *E. coli* продуцируемого штаммом M15 [pRep4, pRTA-DHFR] целевого белка RTA-DHFR, причем токсичность привносится в этот химерный белок именно доменом RTA. Замедление роста клеток наблюдали еще до добавления индуктора, что, вероятно, вызвано накоплением токсичного продукта вследствие неполной репрессии экспрессии его гена. Возможно, что в случае экспрессии нехимерного рекомбинантного RTA целевой белок просто не успевал проявить своего токсического действия на клетки из-за его мгновенного протеолиза, поэтому замедления роста клеток в том случае не отмечали, как и появления самого продукта.

Механизм токсического действия RTA-

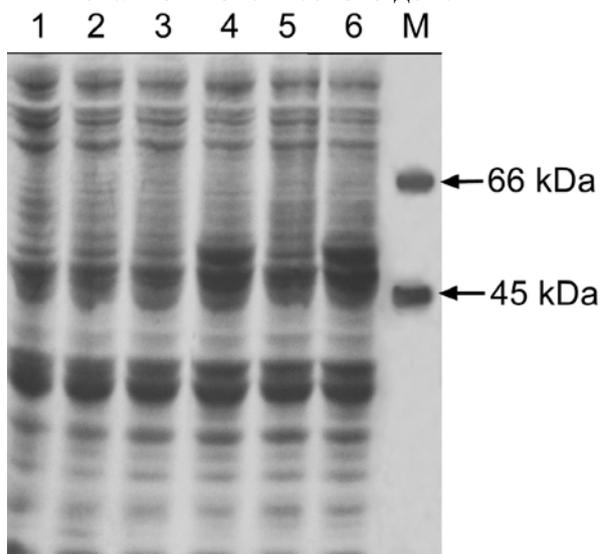


Рис. 3. Электрофореграмма белков в 10% ДСН-ПААГ с окраской Кумасси. Лизаты клеток *E. coli*:

- 1 – M15 [pRep4] – до индукции;
- 2 – M15 [pRep4] – после индукции;
- 3 – M15 [pRep4, pRTA-DHFR] – до индукции; 4 – M15 [pRep4, pRTA-DHFR] – после индукции;
- 5 – M15 [pRep4, pRTB-DHFR] – до индукции; 6 – M15 [pRep4, pRTB-DHFR] – после индукции;
- M – маркеры молекулярной массы: бычий сывороточный альбумин – 66 кДа, овальбумин – 45 кДа.

DHFR может быть связан с N-гликозилазной активностью RTA, которая, возможно, проявляется не только в клетках эукариот, где ее субстратом является 28S-pPHK, но и в клетках прокариот, где нуклеиновые кислоты более подвержены действию различных гидролизующих ферментов, так как в меньшей степени покрыты белками.

В штаммах *E. coli* M15 [pRep4, pRTA-DHFR], M15 [pRep4, pRTB-DHFR] обнаруживалось накопление белковых продуктов ожидаемой молекулярной массы ($\approx 51-53$ кДа). Уровень продукции целевых белков составлял приблизительно 5–7% от общего клеточного белка, что было выявлено при электрофорезе в 10% ПААГ (рис. 3).

В результате анализа распределения целевых белков RTA-DHFR и RTB-DHFR в клетках *E. coli* было показано, что целевые белки накапливаются в них как в виде телец включения, так и в растворимой форме, примерно в равной степени (рис. 4).

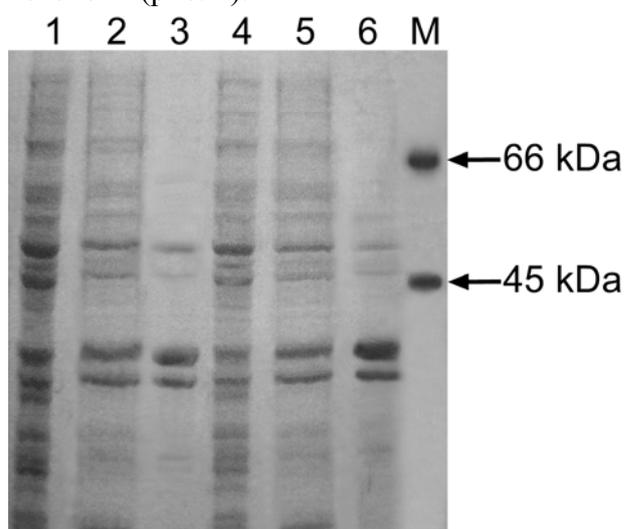


Рис. 4. Электрофореграмма белков в 10% ДСН-ПААГ с окраской Кумасси. Анализ распределения белков RTA-DHFR и RTB-DHFR в клетках *E. coli* M15.

- 1 – M15 [pRep4, pRTA-DHFR] – лизат клеток после индукции; 2 – M15 [pRep4, pRTA-DHFR] – растворимая фракция лизата; 3 – M15 [pRep4, pRTA-DHFR] – нерастворимая фракция лизата;
- 4 – M15 [pRep4, pRTB-DHFR] – лизат клеток после индукции; 5 – M15 [pRep4, pRTB-DHFR] – растворимая фракция лизата; 6 – M15 [pRep4, pRTB-DHFR] – нерастворимая фракция лизата;
- M – маркеры молекулярной массы: бычий сывороточный альбумин – 66 кДа, овальбумин – 45 кДа

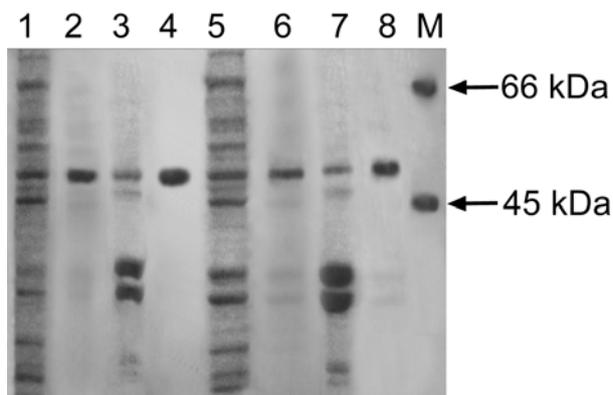


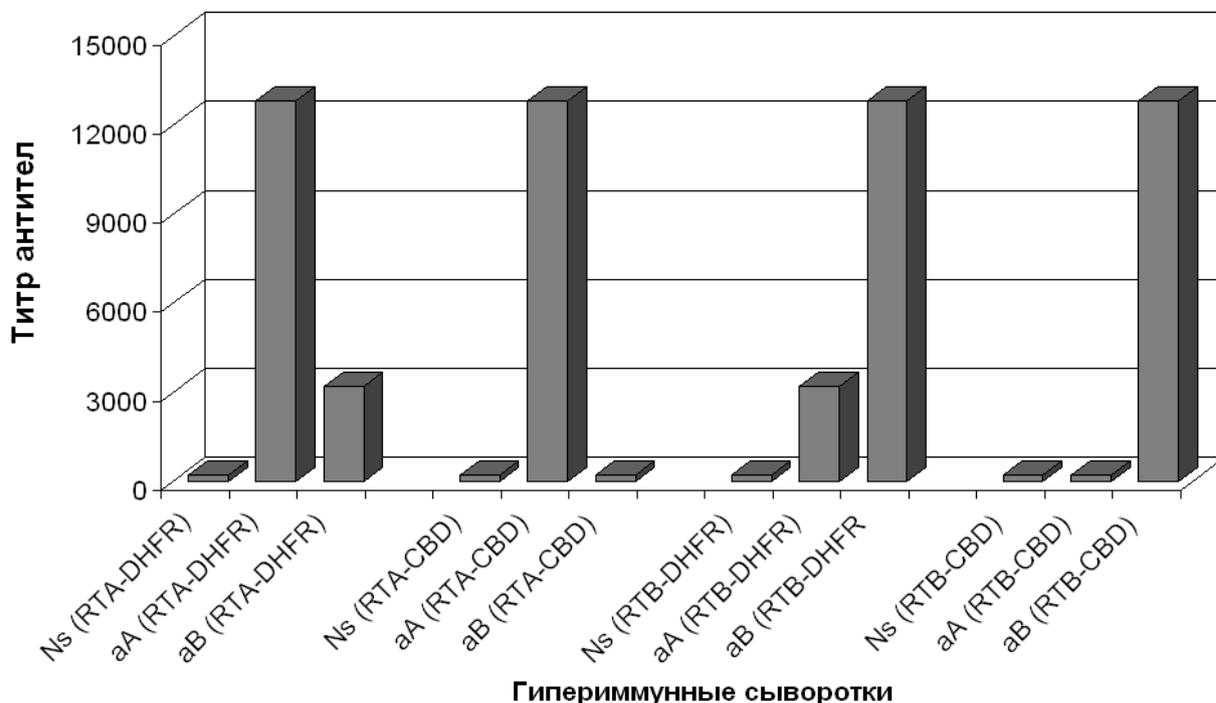
Рис. 5. Электрофореграмма белков в 10% ДСН-ПААГ с окраской Кумасси. Очистка белков RTA-DHFR и RTB-DHFR на колонке с Ni-NTA-агарозой.

1 – M15 [pRep4, pRTA-DHFR] – растворимая фракция лизата; 2 – Очищенный белок RTA-DHFR из растворимой фракции; 3 – M15 [pRep4, pRTA-DHFR] – нерастворимая фракция лизата; 4 – Очищенный белок RTA-DHFR из нерастворимой фракции; 5 – M15 [pRep4, pRTB-DHFR] – растворимая фракция лизата; 6 – Очищенный белок RTB-DHFR из растворимой фракции; 7 – M15 [pRep4, pRTB-DHFR] – нерастворимая фракция лизата; 8 – Очищенный белок RTB-DHFR из нерастворимой фракции; M – маркеры молекулярной массы: бычий сывороточный альбумин – 66 кДа, овальбумин – 45 кДа

Выделение и очистка RTA-DHFR и RTB-DHFR. Были получены препараты очищенных белков с концентрацией 1 мг/мл. Чистота белков RTA-DHFR и RTB-DHFR составила не менее 95% (рис. 5).

Выход белков, полученных при инкубации после индукции изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) в течение 3 ч при 37°C, составил приблизительно 8 мг из 1 л культуры для RTA-DHFR и приблизительно 10 мг из 1 л культуры для RTB-DHFR. Увеличение времени экспрессии свыше 3 ч не способствовало увеличению выхода целевых продуктов.

Исследование антигенных свойств RTA-DHFR и RTB-DHFR. В результате иммунизации кроликов антигенами RTA-DHFR и RTB-DHFR были получены гипериммунные сыворотки. При проведении непрямого ИФА гипериммунная сыворотка, полученная в ответ на RTA-DHFR, проявляла активность в разведении 1:12800 как по отношению к исследуемому антигену RTA-DHFR, так и по отношению к контрольному антигену RTA-CBD (см. эксперимент. часть) (рис. 6).



Гипериммунные сыворотки

Рис. 6. Определение титра антител к RTA и RTB в гипериммунных сыворотках крови кролика методом непрямого ИФА. RTA-DHFR, RTB-DHFR и RTA-CBD, RTB-CBD – антигены, сорбированные на плашке; Ns – предиммунная сыворотка; aA – гипериммунная сыворотка, полученная в ответ на RTA-DHFR; aB – гипериммунная сыворотка, полученная в ответ на RTB-DHFR.

Гипериммунная сыворотка, полученная в ответ на RTB-DHFR, проявляла активность в разведении 1:12800 как по отношению к исследуемому антигену RTB-DHFR, так и по отношению к контрольному антигену RTB-CBD. В предиммунной сыворотке антитела к использованным антигенам отсутствовали. Наблюдали незначительную перекрестную специфичность в сыворотках, которая обусловлена присутствием в составе рекомбинантов общей структуры DHFR. Полученные результаты показали, что химерные белки RTA-DHFR и RTB-DHFR сохранили антигенные свойства, соответственно, RTA и RTB, так как гипериммунные сыворотки были специфичны как к исследуемым антигенам, так и к контрольным.

В заключение следует отметить, что не удалось получить продукции реком-

бинантных нехимерных белков RTA и RTB. Подход с применением DHFR в качестве белка-носителя позволил получить высокоэффективные штаммы-продуценты белков RTA-DHFR и RTB-DHFR. Однако, белок RTA-DHFR, по-видимому, проявляет токсичность по отношению к клеткам *E. coli*, что проявляется в замедлении их роста и снижении выхода биомассы. Антигенные свойства RTA и RTB в составе химерных белков RTA-DHFR и RTB-DHFR сохраняются.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование ДНК.

Последовательность RTA получали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия), с использованием хромосомной ДНК клещевины в качестве матрицы, выделенной из семян клещевины согласно [12], и праймеров:

RTA-F: 5'-TTAGAGGCCATGGGCATATTCCTCCCAACAATACCCAATTATAAAC-3',
RTA-R: 5'-CACTGGTCTAGATTAGGATCCAAACTGTGACGATGGTGGAGGTGCG-3'.

ПЦР проводили в следующем режиме: 5 циклов: 93 °С – 2 мин, 60 °С – 5 мин и 72 °С – 30 с; 30 циклов: 93 °С – 1 мин, 60 °С – 1 мин и 72 °С – 30 с; затем 1 цикл: 60 °С – 5 мин и 72 °С – 10 мин. Плазмиду pRTA получали встраиванием ПЦР-фрагментов последовательности RTA в экспрессионный плазмидный вектор pQE6 (Ap^r) (QIAGEN, США) при помощи эндонуклеаз рестрикции NcoI и BamHI.

N-RTB-F: 5'-TACCAACCATGGGTGCTGATGTTTGTATGGACCCTGAGCCC-3'
N-RTB-R: 5-GAGAGGTCTAGATTAGGATCCCTTAAGGCTCGGGTCCGATGCCCTCACAT-3'.

Плазмиду pNRTB получали встраиванием ПЦР-фрагментов N-концевой последовательности RTB в вектор pQE6 при помощи эндонуклеаз рестрикции NcoI и XbaI. Последовательность, кодирующую

Нуклеотидную последовательность RTB конструировали по частям, с целью убрать неудобные для дальнейшего клонирования сайты рестрикции, присутствующие в нативной ДНК, и ввести новые. Нуклеотидную последовательность, кодирующую N-концевую часть RTB с 1219 по 1982 п. н., получали методом ПЦР (режим см. выше), используя в качестве матрицы ДНК клещевины и праймеры:

C-концевую часть RTB с оптимизированными кодонами с 1956 по 2018 п. н., получали химико-ферментативным синтезом из олигонуклеотидов:

C-RTB-F1: 5'-AATTCTTAAGCAGATTATCCTGTACCCGCTGCA-3',
C-RTB-F2: 5'-TGGCGATCCGAATCAGATCTGGCTGCCGCTGTTTGGATCCTAAT-3',
C-RTB-R1: 5'-CCGGATTAGGATCCAAACAGCGGCAGCCAGATCTGAT-3',
C-RTB-R2: 5'-TCGGATCGCCATGCAGCGGGTACAGGATAATCTGCTTAAG-3'.

Для этого смесь олигонуклеотидов (по 20 пкМ каждого) сначала прогревали на водяной бане в течение 10 мин при 95 °С, а потом охлаждали в течение 4 ч до 25 °С;

далее проводили лигирование при помощи ДНК-лигазы фага T4. Плазмиду pCRTB получали встраиванием C-концевой части RTB в экспрессионный плазмидный

вектор pQE6 с использованием эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *Kpn2I*. Плазмиду pRTB, несущую полноразмерную последовательность, кодирующую RTB, получали из двух плазмид pNRTB и pCRTB при помощи эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *AflIII*.

Олигонуклеотиды для получения RTA и RTB были спланированы на основе известной последовательности ДНК клещевины (*Ricinus communis*), представленной в банке данных GenBank под номером X03179, и синтезированы ЗАО «Синтол» (Россия, Москва).

Получение рекомбинантных плазмид и выделение плазмидной ДНК проводили согласно методам, изложенным в [13]. Для клонирования нуклеотидных последовательностей использовали штамм *E. coli* M15 [pRep4], (Nal^s , Str^s , rif^s , lac^- , ara^- , gal^- , mtl^- , F^- , recA^+ , uvr^+). Трансформацию клеток *E. coli* проводили методом электропорации согласно инструкции к электропоратору фирмы BIO-RAD (США). Бактериальные клетки культивировали при 37 °С в бактериальной среде Luria-Bertani (LB-бульон), со следующими компонентами: триптон, дрожжевой экстракт и агар (Difco, США). Твердая бактериальная среда содержала 2% агара. Для селекции штаммов применяли антибиотики – ампициллин с конечной концентрацией 150 мкг/мл и канамицин с конечной концентрацией 25 мкг/мл. Нуклеотидную последовательность плазмид определяли по методу Сэнгера [14].

Для получения плазмид pRTA-DHFR и pRTB-DHFR нуклеотидные последовательности RTA и RTB из плазмид pRTA и pRTB встраивали в экспрессионный плазмидный вектор pQE16 (Ap^r) (QIAGEN, США) при помощи эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *BamHI*.

Экспрессия рекомбинантных генов. Экспрессию рекомбинантных генов проводили в штамме *E. coli* M15 [pRep4] согласно стандартным протоколам, разработанным фирмой QIAGEN (США) [11]. Бактериальные клетки выращивали в среде LB до оптической плотности, измеряемой при 550 нм, равной 0.7–0.9,

после чего индуцировали экспрессию добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0.01 мМ. Экспрессию проводили на термостатируемой качалке при 37 °С, при 240 об./мин, в течение 3 ч. Анализ уровня продукции белков в клетке осуществляли с использованием электрофореза в 10% ДСН-ПААГ по методу Лэммли [15] с последующей окраской Кумасси R-250.

Выделение и очистка RTA-DHFR и RTB-DHFR. Культуру клеток *E. coli* осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об./мин, осажденные клетки суспендировали в 1% растворе Тритона X-100. Далее проводили лизис клеток сначала лизоцимом с конечной концентрацией 0.01 мг/мл, затем ультразвуком. Лизат центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 мин и отделяли супернатант от осадка. Количественное распределение белков RTA-DHFR и RTB-DHFR в растворимой и нерастворимой фракции клеточного лизата анализировали при помощи электрофореза, как описано выше. Выделение и очистку белков RTA-DHFR и RTB-DHFR проводили как из растворимой фракции (супернатанта), так и из нерастворимой (осадка) на колонке с Ni-NTA-агарозой (QIAGEN, США) согласно [11]. Оценку чистоты полученных белков проводили с использованием электрофореза, как описано выше. Концентрацию очищенных целевых белков определяли методом Брэдфорда [16].

Исследование антигенных свойств RTA-DHFR и RTB-DHFR. Очищенными химерными белками RTA-DHFR и RTB-DHFR проводили иммунизацию кроликов. Для этого 500 мкг рекомбинантного белка в смеси с равным объемом полного адьюванта Фрейнда в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4) вводили кроликам подкожно вдоль спины. Через 4 недели проводили повторную иммунизацию, используя неполный адьювант Фрейнда. Еще через 4 недели проводили третью иммунизацию без адьюванта внутримышечно. Сыворотку крови отбирали до иммунизации и через 10 дней после последней иммунизации.

Определение титра специфических

антител к RТА и RТВ в гипериммунных сыворотках крови кроликов проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). Отрицательным контролем являлась предиммунная сыворотка. В качестве антигенов для сенсibilизации полистиролового микропланшета (Nunc, Дания) использовали как исследуемые химерные белки RТА-DHFR и RТВ-DHFR, так и контрольные антигены – химерные белки RТА-CBD и RТВ-CBD, полученные авторами ранее. В химерных белках RТА-CBD и RТВ-CBD белком-носителем для RТА и RТВ является целлюлозосвязывающий домен (CBD).

Сыворотки титровали методом двукратных разведений и инкубировали с

иммобилизованными на планшете антигенами. Далее проводили инкубацию с антивидовым иммунопероксидазным конъюгатом (Goat-anti-rabbit IgG-HRP, Amersham, рабочее разведение 1:5000). Для проявления реакции в лунки вносили однокомпонентную ТМВ-субстратную смесь (Sigma, США). Оптическое поглощение (ОП) окрашенного продукта пероксидазной реакции определяли на приборе iEMS Reader MF (Thermo Labsystems, Финляндия) при 450 нм. Титром антител считали обратную величину последнего разведения, в котором ОП₄₅₀ исследуемого образца сыворотки в 2 раза превышает ОП₄₅₀ в отрицательном контроле.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Антонов, Н. С. Химическое оружие на рубеже двух столетий / Н. С. Антонов. – М. : Прогресс, 1994. – С. 108–111.
2. Doan, L. G. Ricin: mechanism of toxicity, clinical manifestations, and vaccine development / L. G. Doan // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* – 2004. - Vol. 42, № 2. – P. 201–208.
3. Bigalke, H. Medical aspects of toxin weapon / H. Bigalke, A. Rummel // *Toxicology.* – 2005. – Vol. 214. – P. 210–220.
4. Olsnes, S. Ricin / S. Olsnes, J. V. Kozlov // *Toxicon.* – 2001. – Vol. 39, № 11. – P. 1723–1728.
5. Козлов, Ю. В. Рибосом-инактивирующие лектины растений / Ю. В. Козлов, О. Ю. Сударкина, А. Г. Курманова // *Мол. Биол.* – 2006. – Т. 40, № 4. – С. 711–723.
6. Ricin: current understanding and prospects for an antiricin vaccine / C. J Marsden [et al.] // *Expert Rev. Vaccines.* – 2005. – Vol. 4, № 2. – P. 229–237.
7. Improved formulation of a recombinant ricin A-chain vaccine increases its stability and effective antigenicity / J. H. Carra [et al.] // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25, № 21. – P. 4149–4158.
8. Mutational analysis of the galactose binding ability of recombinant ricin B chain / R. Wales [et al.] // *J. Biol.Chem.* – 1991. – Vol. 266, № 29. – P. 19172–19179.
9. The effects of N-glycosylation on the lectin activity of recombinant ricin B chain / P. T. Richardson [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 1991. – Vol. 213. – P. 19–25.
10. Terpe, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems / K. Terpe // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 60, № 5. – P. 523–533.
11. Henco, K. The QIAexpressionist / K. Henco // *DIAGEN GmbH, QIAGEN Inc.* – 1991. – P. 1–55.
12. Дорохов, Д.Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д. Б. Дорохов, Э. Клоке // *Молекулярная генетика.* – 1997. – Т. 33, № 4. – С. 443–450.
13. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. – М. : Мир, 1984.
14. Sanger, F. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase / F. Sanger, A.R. Coulson // *J. Mol. Biol.* – 1975. – Vol. 94, № 3. – P. 441–446.
15. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 5259 – P. 680–682.
16. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.