

# Получение и масс-спектрометрическая характеристика рекомбинантных субъединиц шига-токсинов первого и второго типов (Stx1 и Stx2) *Escherichia coli*

М.А.Шкуратова<sup>1</sup>, М.А.Марьин<sup>1</sup>, М.М.Рогозин<sup>1</sup>, А.К.Сурин<sup>1</sup>, Л.В.Коломбет<sup>1</sup>, В.В.Фирстова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт», Пушкино, Московская область, Российская Федерация

В работе представлены результаты оптимизации метода получения шига-токсинов первого и второго типов (Stx1 и Stx2), продуцируемых некоторыми штаммами кишечной палочки, которые обозначают аббревиатурой STEC (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*). Для экспрессии белка использовали штамм *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, который содержит дополнительные копии генов, редких для *E. coli* тРНК, что обеспечивает эффективную трансляцию Stx-белков. Культивирование проводили при пониженной температуре в среде для аутоиндукции ZYM-5052. В результате Stx-белки экспрессировались в цитоплазму в растворимой форме. После очистки белков методом аффинной хроматографии на колонке с никелевым сорбентом конечный выход рекомбинантных субъединиц шига-токсинов составлял приблизительно 1,7 мг/л для rStx1A; 1,9 мг/л для rStx2A; 2,5 мг/л для rStx1B и 2,7 мг/л для rStx2B. С использованием масс-спектрометрического анализа подтвердили идентичность полученных белков и определили наиболее часто повторяющиеся последовательности протеинов rStx1A, rStx2A, которые могут быть использованы при разработке базы для экспресс-идентификации шига-токсинов.

**Ключевые слова:** шига-токсин, масс-спектрометрия, рекомбинантные белки, идентификация

**Для цитирования:** Шкуратова М.А., Марьин М.А., Рогозин М.М., Сурин А.К., Коломбет Л.В., Фирстова В.В. Получение и масс-спектрометрическая характеристика рекомбинантных субъединиц шига-токсинов первого и второго типов (Stx1 и Stx2) *Escherichia coli*. Бактериология. 2021; 6(4): 30–38. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-30-38

## Preparation and mass-spectrometric characteristics of recombinant shiga-toxin units of the first and second types (Stx1 and Stx2) *Escherichia coli*

М.А.Shkuratova<sup>1</sup>, М.А.Maryin<sup>1</sup>, М.М.Rogozin<sup>1</sup>, А.К.Surin<sup>1</sup>, Л.В.Kolombet<sup>1</sup>, V.V.Firstova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

<sup>2</sup>Pushchino State Institute of Natural Science, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

The paper presents the results of optimization of the method for obtaining shiga toxins of the first and second types (Stx1 and Stx2), produced by some strains of *Escherichia coli* (STEC). For protein expression, the *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS strain was used, which contains additional copies of genes rare for *E. coli* tRNA, which ensures efficient translation of Stx proteins. The cultivation was carried out at a reduced temperature in a medium for autoinduction ZYM-5052. As a result, Stx proteins were expressed in the cytoplasm in a soluble form. After purification of proteins by affinity chromatography on a column with a nickel sorbent, the final yield of recombinant shiga toxin subunits was approximately 1.7 mg/L for rStx1A; 1.9 mg/L for rStx2A; 2.5 mg/L for rStx1B and 2.7 mg/L for rStx2B. Using mass-spectrometric analysis, the identity of the obtained proteins was confirmed and the most frequently repeated sequences of proteins rStx1A, rStx2A, which can be used in the development of a base for the rapid identification of shiga-toxins, were determined.

**Key words:** shiga-toxin, mass-spectrometry, recombinant proteins, identification

**For citation:** Shkuratova M.A., Maryin M.A., Rogozin M.M., Surin A.K., Kolombet L.V., Firstova V.V. Preparation and mass-spectrometric characteristics of recombinant shiga-toxin units of the first and second types (Stx1 and Stx2) *Escherichia coli*. Bacteriology. 2021; 6(4): 30–38. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-30-38

### Для корреспонденции:

Шкуратова Мария Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 31-1915  
E-mail: maria\_shkuratova@mail.ru

Статья поступила 03.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

### For correspondence:

Maria A. Shkuratova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 31-1915  
E-mail: maria\_shkuratova@mail.ru

The article was received 03.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

**Б**актерии *Escherichia coli*, продуцирующие шига-токсин (STEC), являются причиной развития серьезных заболеваний, сопровождающихся лихорадкой, рвотой, кровавой диареей [1]. Под влиянием шига-токсинов (Stx) развивается геморрагический колит и гемолитико-уремический синдром, что в итоге может привести к летальному исходу [2]. Шига-токсины являются основными факторами патогенности STEC штаммов. Они подразделяются на два класса – Stx1 и Stx2 [3]. Шига-токсины относятся к АВ-токсинам и представляют собой двухкомпонентные белковые комплексы. Молекулярная масса шига-токсинов составляет около 70 кДа, из которой 32 кДа составляет субъединица А, а 38 кДа – 5 идентичных субъединиц В, каждая из которых имеет массу 7,7 кДа [4]. Субъединица А представляет собой ферментативно-активную N-гликозидазу, способную ингибировать синтез белка путем отщепления аденинового основания в положении 4324 от 28S рРНК эукариотической рибосомной 60S-субъединицы, что приводит к гибели клетки. В-пентамер содержит множество сайтов связывания рецепторов для глоботриаозилцерамида (Gb3) или глоботетраозилцерамида (Gb4), экспрессируемых на поверхности эукариотических клеток [5]. Несмотря на структурное сходство, Stx1 и Stx2 обнаруживают значительные различия в биологической активности. Эпидемиологические исследования и исследования молекулярного типирования показывают, что штаммы STEC, продуцирующие Stx2, более тесно связаны с гемолитико-уремическим синдромом, чем штаммы STEC, продуцирующие Stx1 [6].

Для своевременного выявления шига-токсинов в окружающей среде или в биологических средах необходима разработка высокочувствительных методов детекции данных белков [3]. В качестве такого метода может выступать масс-спектрометрический анализ. При разработке эффективных методов детекции шига-токсинов необходимо прежде всего получить рекомбинантные белки. Белки Stx могут быть получены в прокариотической системе – метод является рутинным и хорошо отработан. Однако для обеспечения высокого выхода белка с сохранением его функциональных характеристик необходимо получить белок в растворенной форме.

**Цель исследования** – разработать оптимальный метод получения субъединиц рекомбинантных белков шига-токсинов Stx1 и Stx2 STEC и с использованием методов масс-спектрометрии подтвердить их идентичность и чистоту.

## Материалы и методы

**Конструирование плазмид экспрессии.** ДНК бактериального штамма *E. coli* O157:H7 (№6098) использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации генов шига-токсина 1 и 2. ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом для грамотрицательных бактерий. До выделения очищенной ДНК все манипуляции с культурой проводили в условиях 2-го уровня биобезопасности. Каждую субъединицу амплифицировали отдельно с помощью специфических праймеров, которые перечислены в табл. 1. Прямым праймером на N-конец всех белков вводили дополнительную аминокислоту серин. Обратным праймером на 3'-конец ДНК добавляли стоп-кодон ТАА.

Таблица 1. Последовательности праймеров для амплификации субъединиц шига-токсинов

№	Название	Последовательность, 5'-3'	Длина	Предназначение
1	1AFor	TCCAAGGAATTTACCTTAGACTTC	24	Амплификация гена stx1A
2	1ARev	TTAACTGCTAATAGTTCTGCGCA	23	
3	2AFor	TCCCGGGAGTTTACGATAGACTTT	24	Амплификация гена stx2A
4	2ARev	TTATTTACCCGTTGTATATAAAAAC	25	
5	1BFor	TCCACGCCTGATTGTGTAAGTGG	23	Амплификация гена stx1B
6	1BRev	TTAACGAAAAATAACTTCGCTGAATC	26	
7	1BFor	TCCGCGGATTGTGCTAAAGGT	21	Амплификация гена stx2B
8	1BRev	TTAGTCATTATTAAGTGCCTTC	24	

Для ПЦР использовали высокоточную ДНК-полимеразу PhusionHotStartII (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию проводили с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler (BioRad, США) В реакцию вносили 200 нг тотальной ДНК *E. coli* O157:H7 в качестве матрицы и запускали амплификацию при следующих параметрах: первоначальная денатурация в течение 1 мин при 98°C, далее 30 циклов: 10 с при 98°C, 15 с при 55°C и 1 мин при 72°C. Финальная элонгация длилась 2 мин. Затем продукты реакций очищали от полимеразы при помощи микроцентрифужных колонок QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). У полученных ДНК наращивали одиночные 3'-остатки дезоксиаденозина (А) с помощью Taq-полимеразы в присутствии dATP и снова очищали на колонках QIAquick.

Далее гены субъединиц шига-токсинов первого и второго типов клонировали в вектор pET SUMO с помощью набора Champion pETSUMO Protein Expression System (Invitrogen, США) по технологии TA-клонирования. Введение плазмид в химически компетентные клетки *E. coli* OneShot Mach1-T1R (Invitrogen) проводили по протоколу, описанному в руководстве. Затем проводили скрининг отдельных колоний методом ПЦР для анализа наличия вставок и их верной ориентации в векторе. Колонии амплифицировали с помощью Taq ДНК-полимеразы и соответствующих вставке генспецифических прямых праймеров (1AFor, 2AFor, 1BFor, 2BFor) и обратного праймера, отжигающегося в области T7-терминатора T7 Reverse (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'), при следующих условиях: первоначальная денатурация в течение 3 мин при 95°C с последующими 23 циклами по 30 с при 95°C, 30 с при 55°C и 1 мин при 72°C. По результатам анализа отбирали клоны, которые использовали при проведении дальнейшей работы. Полученные плазмиды получили обозначение pET SUMO-stx1A, pET SUMO-stx1B, pET SUMO-stx2A, pET SUMO-stx2B.

Секвенирование плазмидной ДНК выполнила компания ЗАО «Евроген Ру» (Москва, РФ). Анализ полученных результатов для подтверждения корректности встраивания последовательностей экспрессионных конструкторов производили по алгоритму BLAST.

**Экспрессия и очистка белка.** Отобранные плазмиды встраивали посредством электротрансформации в электрокомпетентные микробные клетки *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (Novagen, США).

Таблица 2. Идентифицированные пептиды белка rStx1A методом тандемной масс-спектрометрии

Peptide	Uniq	Score, %	Mass	Length
V.DVRGIDPEEGRFN.N	Y	100,0	1502,7113	13
R.GIDPEEGRFN.N	Y	99,9	1132,5149	10
D.VRGIDPEEGRFN.N	Y	99,9	1387,6843	12
V.DVRGIDPEEGR.F	Y	99,9	1241,6000	11
V.DVRGIDPEEGRF.N	Y	99,9	1388,6683	12
R.GIDPEEGRF.N	Y	99,9	1018,4719	9
F.RTTLDDLSGR.S	Y	99,9	1132,5836	10
R.FADFSHVTFPGTT.A	Y	99,9	1425,6565	13
L.M(+15.99)IDSGTGDNL.F.A	Y	99,9	1184,5020	11
F.SHVTFPGTT.A	Y	99,9	945,4556	9
F.SHVTFPGT.T	Y	99,9	844,4079	8
D.PEEGRFN.N	Y	99,9	847,3824	7
V.RGIDPEEGRFN.N	Y	99,9	1288,6160	11
A.SDEFFPSM(+15.99)C(+57.02)PADGR.V	Y	99,9	1483,5708	13
R.TTLDDLSGR.S	Y	99,9	976,4825	9
R.QIQRGF.R	Y	99,9	747,4028	6
S.HVTFPGTT.A	Y	99,9	858,4236	8
R.GIDPEEGR.F	Y	99,9	871,4035	8
Y.RFADFSHV.T	Y	99,9	977,4719	8
R.TGM(+15.99)QINR.H	Y	99,9	834,4018	7
L.FAVDVR.G	Y	99,9	705,3809	6
F.SHVTFPGTTA.V	Y	99,9	1016,4927	10
R.M(+15.99)ASDEFFPSM(+15.99)C(+57.02)PADGR.V	Y	99,9	1701,6433	15
T.LDDLSGR.S	Y	99,9	774,3871	7
S.VLPDYHGQ.D	Y	99,9	927,4450	8
L.M(+15.99)IDSGTGDNL.F	Y	99,9	1037,4336	10
L.LM(+15.99)IDSGTGDNL.F	Y	99,9	1150,5176	11
F.RTTLDDL.S	Y	99,8	832,4290	7
L.RFRQIQ.R.G	N	99,8	1002,5835	7
L.LM(+15.99)IDSGTGDNL.F.A	Y	99,8	1297,5861	12
G.IDPEEGRFN.N	Y	99,8	1075,4934	9
Y.VDSLNVIR.S	Y	99,8	914,5185	8
F.SHVTFPG.T	Y	99,7	743,3602	7

Штаммы *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущие экспрессионные плазмиды pET SUMO-stx1A, pET SUMO-stx1B, pET SUMO-stx2A, pET SUMO-stx2B, выращивали в питательной среде для автоиндукции ZYM-5052 [7], содержащей 30 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола.

Культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих по 200–250 мл среды в каждой, при вращении на ротационном шейкере (200 об./мин) в течение 24 ч при температуре культивирования 30°C. Собранные центрифугированием осадки клеток замораживали для хранения в кельвинаторе при 80°C.

Бактериальные осадки ресуспендировали в буфере А, содержащем 25 мМ трис-НСl, рН 8,6; 150 мМ NaCl, 0,2% твин-20 и 2% глицерина. Клетки лизировали и проводили мягкую

Таблица 2. Окончание

I.DPEEGRF.N	Y	99,6	848,3664	7
F.ADFSHV.T	Y	99,4	674,3024	6
H.NKILW.D	Y	99,4	672,3959	5
L.NWGRLS.S	N	99,4	731,3715	6
R.VAGISR.T	Y	99,2	601,3547	6
Q.DSVRVG.R	Y	99,2	631,3289	6
F.NNLRLIV.E	Y	97,7	840,5181	7
Q.DSVRVGR.I	Y	97,5	787,4301	7
Y.LDLM(+15.99)SH.S	Y	97,4	730,3320	6
D.SLNVIR.S	Y	97,4	700,4232	6
L.RLIVE.R	Y	96,4	628,3908	5
F.YRFADF.S	Y	96,4	817,3759	6
Y.RFADF.S	Y	96,2	654,3125	5
L.NWGRL.S	N	96,2	644,3394	5
R.FRQIQ.R.G	N	92,0	846,4824	6
Y.TTLQR.V	N	90,7	617,3497	5
F.RQIQ.R.G	N	90,3	699,4140	5
L.RLIVER.N	Y	90,3	784,4919	6
R.LIVER.N	Y	89,9	742,4337	6
R.LIVER.N	Y	89,9	628,3908	5
F.NNLRL.I	Y	89,8	628,3657	5
M.LRFVT.V	N	86,0	634,3802	5
R.M(+15.99)ASDEFFPSM(+15.99)C(+57.02)PADGRVR.G	Y	86,0	1956,8127	17
R.FRQIQ.R	N	85,8	690,3813	5
A.SDEFFPSM(+15.99)C(+57.02)PADGRVR.G	Y	85,0	1738,7402	15
S.SVLPDYHGQ.D	Y	84,1	1014,4771	9
N.NLRLIV.E	Y	83,4	726,4752	6
M.TAEDVDTL.N	Y	79,5	975,4760	9
L.RFRQIQ.R	N	74,6	846,4824	6
E.ALRF.R.Q	N	73,8	661,4023	5
Y.RFADFS.H	Y	63,8	741,3445	6
L.RLIVER.N	Y	50,9	898,5348	7
T.TSYLDLMS.H	Y	46,2	928,4212	8
T.AVTLSGDSSYT.T	Y	33,2	1099,5033	11

Y – уникальные пептиды, N – не уникальные пептиды.

обработку ультразвуком (Bandelin SONOPULS HD 2200, Германия) на льду до полного разрушения клеток. Клеточный дебрис осаждали на центрифуге при 48000 g в течение 15 мин, 4°C.

Очистку целевых белков из осветленных лизатов проводили с использованием хроматографа Amersham Biosciences ÄKTA FPLC (Швеция).

Осветленный лизат наносили на предварительно уравновешенную буфером А колонку с сорбентом cOmpete His-Tag (Roche, Швейцария). Проскок собирали и отбирали пробу для анализа. Белки элюировали буфером Б: 25 мМ трис-НСl, рН 8,6; 150 мМ NaCl, 200 мМ имидазола, 0,2% твин-20 и 2% глицерина. Пиковые фракции анализировали с помощью вертикального электрофореза в 10–12%-м полиакриламид-

**Таблица 3. Идентифицированные пептиды белка rStx2A методом tandemной масс-спектрометрии**

Peptide	Uniq	Score, %	Mass	Length
S.VINHTPPGSYF.A	Y	99,9	1230,6033	11
R.ISNVLPEYR.G	Y	99,9	1089,5818	9
R.ISNVLPEYRGEDGVR.V	Y	99,9	1702,8638	15
N.VLPEYRGE.D	Y	99,9	961,4869	8
R.ISNVLPEYRGE.E	Y	99,9	1146,6033	10
E.YRGEDGVRVG.R	Y	99,9	1106,5469	10
S.VINHTPPGSY.F	Y	99,9	1083,5349	10
R.ISNVLPEYRGED.G	Y	99,9	1390,6729	12
L.SETAPVYTM(+15.99).T	Y	99,9	1013,4376	9
S.NVLPEYRGEDGVRVG.R	Y	99,9	1658,8375	15
R.ISNVLPEYRGE.D	Y	99,9	1275,6459	11
R.ISNVLPEYRGEDGVRVGR.I	Y	99,9	2015,0548	18
N.HTPPGSYF.A	Y	99,9	904,4079	8
V.YTM(+15.99)TPGDVDTL.N	Y	99,9	1340,6169	12
A.LSETAPVY.T	Y	99,9	878,4385	8
I.NHTPPGSYF.A	Y	99,9	1018,4508	9
V.YTM(+15.99)TPGDVDTL.L	Y	99,9	1227,5330	11
R.ISNVLPEYRGEDG.V	Y	99,9	1447,6943	13
S.NVLPEYRGE.D	Y	99,9	1075,5298	9
N.VLPEYRGEDGVRVG.R	Y	99,9	1544,7947	14
R.ISNVLPEYRGEDGVRVG.R	Y	99,9	1858,9536	17
T.M(+15.99)TPGDVDTL.N	Y	99,9	1076,5060	10
F.THISVPGVT.T	Y	99,9	909,4919	9
N.VLPEYR.G	Y	99,9	775,4228	6
E.YRGEDGVR.V	Y	99,9	950,4570	8
S.NVLPEYRGED.G	Y	99,9	1190,5568	10
F.THISVPGVTT.V	Y	99,9	1010,5397	10
A.RFDHLR.L	Y	99,9	842,4511	6
R.GEDGVRVG.R	Y	99,9	787,3824	8
Q.ITGDRPVIK.I	Y	99,8	997,5920	9
E.YRGEDGVRVGR.I	Y	99,8	1262,6479	11
I.NHTPPGSY.F	Y	99,8	871,3824	8
Y.TM(+15.99)TPGDVDTL.N	Y	99,8	1177,5537	11
R.SGM(+15.99)QISR.H	Y	99,8	793,3752	7
R.FDHLRLIIE.Q	Y	99,8	1154,6448	9
Y.FAVDIR.G	Y	99,8	719,3966	6
R.FDHLR.L	Y	99,8	686,3500	5
T.HISVPGVT.T	Y	99,8	808,4443	8
Q.ALSETAPVYT.M	Y	99,8	1050,5233	10
Y.QARFD.H	Y	99,8	635,3027	5
F.SDFTHISVPGVT.T	Y	99,8	1258,6194	12
S.NVLPEYRGEDGVR.V	Y	99,8	1502,7477	13
A.LSETAPVYT.M	Y	99,8	979,4862	9
N.HTPPGSY.F	Y	99,8	757,3395	7
Y.TM(+15.99)TPGDVDTL.L	Y	99,7	1064,4696	10
T.GDRPVIK.I	Y	99,4	783,4603	7
Y.FAVDIRG.L	Y	99,4	776,4180	7

**Таблица 3. Окончание**

D.FTHISVPGVT.T	Y	99,4	1056,5604	10
N.VLPEYRGEDGVR.V	Y	99,4	1388,7048	12
F.DHLRLIIE.Q	Y	99,4	1007,5764	8
F.YRFSDF.T	Y	99,3	833,3708	6
F.SDFTHI.S	Y	99,3	718,3286	6
L.NWGRIS.N	N	98,9	731,3715	6
L.RLIIEQ.N	Y	98,8	770,4650	6
F.SDFTHIS.V	Y	98,8	805,3606	7
Y.SREFTIDFSTQ.Q	Y	98,6	1329,6201	11
N.VLPEYRGED.G	Y	98,4	1076,5138	9
G.DRPVIK.I	Y	98,2	726,4388	6
A.RFDHLR	Y	98,1	686,3500	5
R.GEDGVRVGR.I	Y	98,1	943,4835	9
V.INHTPPGSY.F	Y	98,0	984,4665	9
R.FRQIQR.E	N	95,5	846,4824	6
S.NVLPEYRGEDG.V	Y	95,3	1247,5781	11
Q.REFRQA.L	Y	94,6	805,4194	6
M.TPGDVDTL.N	Y	94,2	929,4706	9
E.DGVRVG.R	Y	94,0	601,3184	6
L.RFRQIQR.E	N	93,9	1002,5835	7
L.RLIIE.Q	Y	93,7	642,4064	5
A.SRAVLR.F	Y	93,6	700,4344	6
L.RFRQIQR	N	93,6	846,4824	6
V.INHTPPGSYF.A	Y	93,5	1131,5349	10
G.RISFN.N	Y	89,6	635,3391	5
T.M(+15.99)TPGDVDTL.L	Y	89,6	963,4219	9
Y.RFSDF.T	Y	89,2	670,3074	5
F.DHLRL.I	Y	88,0	652,3657	5
A.LSETAPVYTM(+15.99).T	Y	87,2	1126,5216	10
E.YRGEDGVRV.G	Y	86,8	1049,5254	9
R.FRQIQR	N	83,5	690,3813	5
N.SIRTE.I	Y	80,5	604,3180	5
Y.RGEDGVRVG.R	Y	73,4	943,4835	9
P.EYRGEDGVRVG.R	Y	73,2	1235,5894	11
E.DGVRVGR.I	Y	72,6	757,4194	7
A.VLRFV.T	Y	72,2	632,4009	5
R.TEISTPL.E	Y	72,0	759,4014	7
T.GDRPVIK.I.N	Y	72,0	896,5443	8
S.LNSIRT.E	Y	71,2	702,4024	6
E.ALRFV.Q	N	65,6	661,4023	5
R.QIQREFR.Q	Y	62,8	975,5250	7
A.ALERSGM(+15.99)QIS.R	Y	37,3	1106,5389	10
R.ISNVLPEYRGEDGVRV.G	Y	37,0	1801,9323	16
N.VLPEYRGEDG.V	Y	36,4	1133,5353	10
V.TVTAEL.R	N	36,1	703,3752	7
S.NVLPEYRGE.E	Y	35,2	946,4872	8
V.NEESQPEC(+57.02)QIT.G	Y	35,0	1333,5457	11
Y.QARFDHLR.L	Y	34,7	1041,5468	8

Y – уникальные пептиды, N – не уникальные пептиды.

ном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с добавлением SDS по методу Лэммли (SDS-PAGE).

Далее проводили гель-фильтрационную очистку на уравновешенной буфером А колонке Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, США) для удаления низкомолекулярных веществ. На основании данных электрофореза определяли фракции, в которых содержались белки интереса.

Полученный раствор белка инкубировали с протеазой SUMO (1 мкг/мл и 10X SUMO Protease Buffer) и DTT (дитиотреитол 1 мкг/мл) при 30°C в течение 2 ч и повторно наносили на колонку с сорбентом cOplete His-Tag. Белки интереса содержались в проскоке. Остаток элюировали буфером Б, содержащим 200 мМ имидазола. Пиковые фракции анализировали с помощью SDS-PAGE в 12–15%-м ПААГ.

Проходную фракцию подвергали диализу против буфера HEPES (50 мМ HEPES, pH 7,0; 150 мМ NaCl, 80 мМ сахарозы) в течение ночи. Чистоту полученных белков анализировали с помощью электрофореза в 15%-м ПААГ в денатурирующих условиях.

Концентрацию очищенного белка измеряли при помощи спектрофотометра Smart Spec Plus (BioRad Laboratories, США) при длине волны 250–350 нм, используя бычий сывороточный альбумин (BCA) в качестве стандарта.

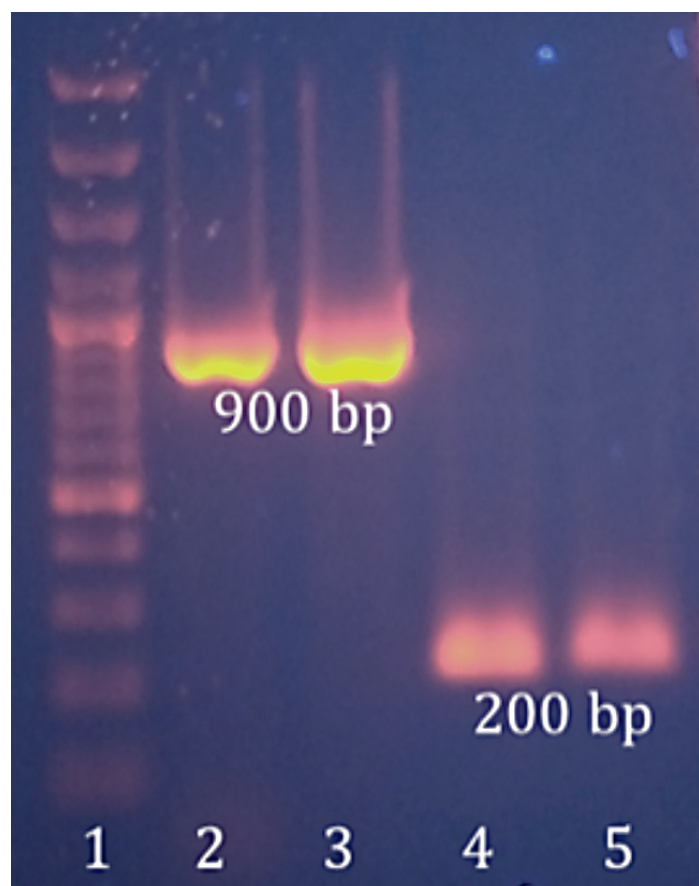


Рис. 1. Амплификация генов субъединиц шига-токсинов *E. coli*: дорожка 1 – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); дорожка 2 – 1 мкл конечного продукта ПЦР гена *stx1A* (желаемая длина ДНК – 879 п.н.); дорожка 3 – 1 мкл конечного продукта ПЦР гена *stx2A* (желаемая длина ДНК – 891 п.н.); дорожка 4 – 1 мкл конечного продукта ПЦР гена *stx1B* (желаемая длина ДНК – 207 п.н.); дорожка 5 – 1 мкл конечного продукта ПЦР гена *stx2B* (желаемая длина ДНК – 210 п.н.).

Также для определения концентрации использовали инфракрасный спектрофотометр Direct Detect (Millipore, США). Систему заранее откалибровали с использованием раствора BCA в HEPES.

Чистоту полученных рекомбинантных белков проверяли электрофоретически в 12%-м и 15%-м ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим (R-250), молекулярную массу полученных полос сравнивали с коммерческим маркером молекулярных масс.

**Масс-спектрометрический анализ белков.** Разделение пептидов проводили на нанопотоковом хроматографе Easy nLC 1000 (Thermo Scientific, США), соединенном с масс-спектрометром высокого разрешения Orbitrap Elite ETD (Thermo Scientific, Германия). Параметры хроматографии: колонка, набитая в лабораторных условиях (диаметр 75 мкм, длина 150 мм), заполнена фазой Aeris 3,6 мкм WIDEPORЕ XB-C18 (Phenomenex, США). Буферы для градиента А: вода mQ, 0,1% муравьиной кислоты. Фаза В: 80% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты. Разделение проводили в профиле элюции с 5% В до 60% В в течение 120 мин. Скорость потока элюента 250 нл/мин. Панорамный масс-спектр записывали с разрешением 60 000 на 400 m/z, спектры фрагментации с разрешением 15 000 на 400 m/z. Фрагментацию ионов проводили в автоматическом режиме с использованием метода HCD (фрагментация, активированная соударениями в высокоэнергетической ячейке). Все измерения проводили при следующих условиях: напряжение на входном капилляре – 1,8 кВ, температура входного капилляра – 200°C, нормализованная энергия активации для HCD – 28,0, ширина изоляции целевого иона – 2 m/z. Анализ масс-спектрометрических данных проводили с помощью коммерческой программы PeaksStudio 7.5.

## Результаты и обсуждение

Для продукции шига-токсинов использовали прокариотическую систему экспрессии *E. coli*. С использованием праймеров получили четыре фрагмента ДНК, содержащие последовательности генов с молекулярными массами около 900 п.н. (*stx1A*, *stx2A*) и 200 п.н. (*stx1B*, *stx2B*) (рис. 1).

Продукты ПЦР клонировали по технологии ТА-клонирования в вектор экспрессии pETSUMO. Рекомбинантные плазмиды, содержащие встроенные последовательности генов *stx1A*, *stx1B*, *stx2A* и *stx2B*, трансформировали в клетки *E. coli* OneShot Mach1-T1R. Данный штамм характеризуется ускоренным ростом, минимальной неспецифической рекомбинацией генов целевых белков и обеспечивает чистые препараты ДНК при выделении. Наличие в трансформантах плазмид, несущих гены субъединиц Stx-белков в правильной ориентации, определяли путем посева трансформантных клеток *E. coli* на среду с антибиотиком. Отобранные клоны использовали для выделения экспрессионных белковых конструкторов с целью дальнейшей верификации (рис. 2).

Количество нуклеотидных пар оснований соответствовало ожидаемым значениям для *stx1A* и *stx2A* (около 1100) и для *stx1B* и *stx2B* (около 400). Плазмиды секвенировали по Сэнгеру с праймеров SUMO Forward (5' AGATTCTTGTACGAC

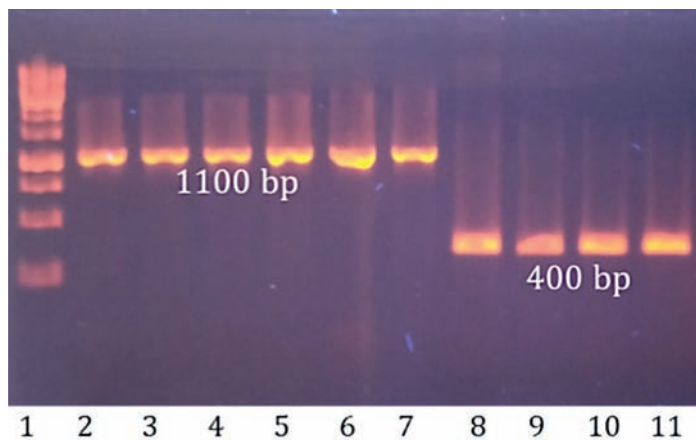


Рис. 2. ПЦР-анализ ДНК колоний трансформантов, несущих плазмиды с генами субъединиц шига-токсинов *E. coli*: дорожка 1 – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), дорожки 2–4 представляют собой продукты ПЦР гена субъединицы *stx1A* в плазмиде рETSUMO (желаемая длина ДНК – 1028 п.н.), дорожки 5–7 – продукты ПЦР гена субъединицы *stx2A* в плазмиде рETSUMO (желаемая длина ДНК – 1040 п.н.), дорожки 8, 9 – продукты ПЦР гена субъединицы *stx1B* в плазмиде рETSUMO (желаемая длина ДНК – 356 п.н.), дорожки 10, 11 – продукты ПЦР гена субъединицы *stx2B* в плазмиде рETSUMO (желаемая длина ДНК – 359 п.н.).

GGTATTAG 3') и T7 Reverse, проверили рамки считывания, а соответствие последовательностей референсным значениям подтвердили с использованием программы BLAST.

Выделение и очистку белков проводили при низких температурах, так как это позволяет сократить денатурирующие воздействия, возникающие из-за конформационной лабильности белков. Бактериальные осадки ресуспендировали и лизировали клетки, дополнительно подвергая ультразвуковой обработке для более полного разрушения клеточных стенок и максимального выхода белка.

Очистку лизата, осветленного центрифугированием, проводили на колонке с Ni-сефарозой, удерживающей белки, имеющие полигистидиновую метку. Преимущества данного сорбента заключаются в высокой емкости и дешевизне. Добавлением в систему элюирующего буфера отслеживали снятие белка с колонки по хроматограмме. Полученный раствор белка дополнительно очищали методом гель-фильтрации, обеспечивающей удаление низкомолекулярных веществ, в том числе имидазола (рис. 3).

По результатам электрофоретического разделения установили, что полученные His-SUMO-rStx1A, His-SUMO-rStx1B, His-SUMO-rStx2A и His-SUMO-rStx2B соответствуют своим молекулярным массам. После инкубирования с протеазой происходило отщепление полигистидиновой метки и полипептида SUMO. Повторная хроматография на никелевой колонке позволила получить высокоочищенные от посторонних примесей рекомбинантные белки rStx1A, rStx1B, rStx2A, rStx2B, полностью соответствующие своим молекулярным массам (рис. 4).

Конечный выход очищенных рекомбинантных белков из каждого литра культуры в среде ZYM-5052 составил: 1,7 мг для rStx1A; 1,9 мг для rStx2A; 2,5 мг для rStx1B и 2,7 мг для rStx2B.

Идентификация субъединиц шига-токсинов методом хромато-масс-спектрометрии на приборе Orbitrap Elite

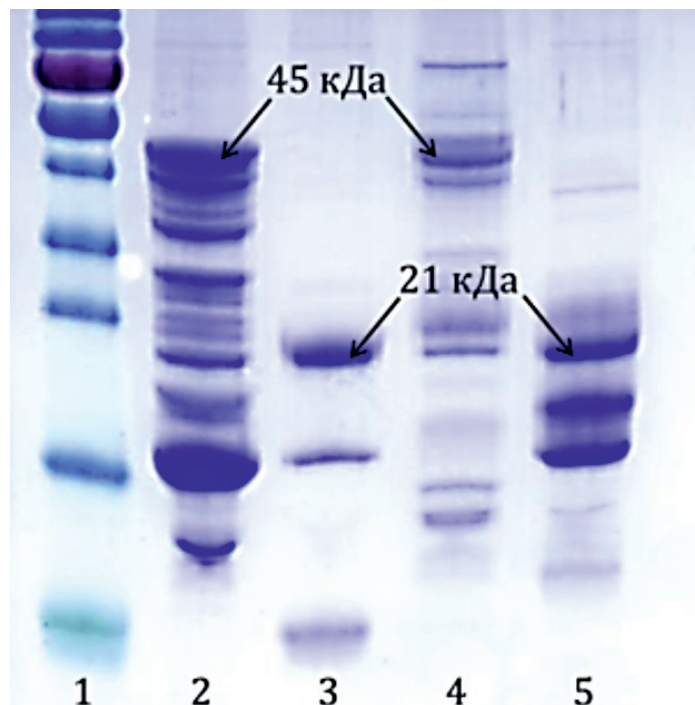


Рис. 3. Анализ рекомбинантных субъединиц Stx-белков, очищенных на колонке с сорбентом cOmpete His-Tag, с помощью SDS-PAGE в 12%-м ПААГ: дорожка 1 – маркер молекулярной массы белка PageRuler Prestained Protein Ladder; дорожка 2 – пик элюирования His-SUMO-rStx1A; дорожка 3 – пик элюирования His-SUMO-rStx1B; дорожка 4 – пик элюирования His-SUMO-rStx2A; дорожка 5 – пик элюирования His-SUMO-rStx2B.

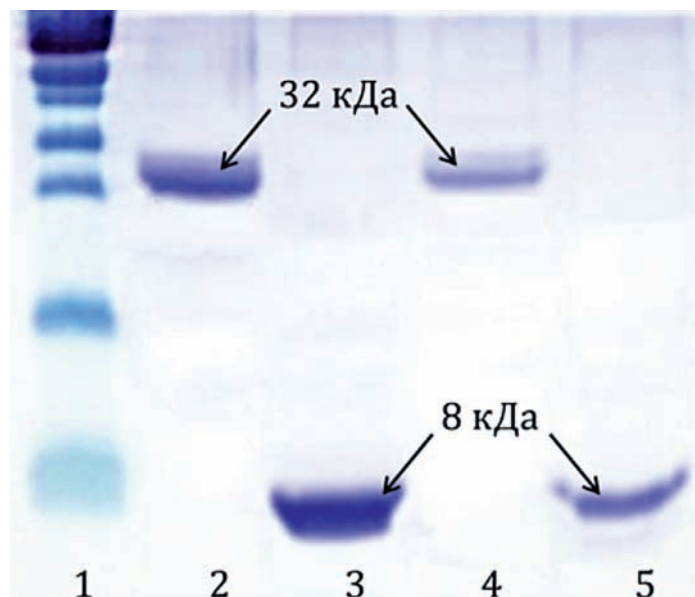


Рис. 4. Анализ рекомбинантных субъединиц Stx-белков с помощью SDS-PAGE в 15%-м ПААГ после расщепления SUMO-протеазой: дорожка 1 – маркер молекулярной массы белка PageRuler Prestained Protein Ladder; дорожка 2 – пик «проскока» белка rStx1A; дорожка 3 – пик «проскока» белка rStx1B; дорожка 4 – пик «проскока» белка rStx2A; дорожка 5 – пик «проскока» белка rStx2B.

(Thermo Scientific, Германия) определила 67 пептидов белка rStx1A с суммарным покрытием последовательности белка 56% (рис. 5).

Из этих идентифицированных пептидов 57 являются уникальными (табл. 2), т.е. последовательности этих пептидов

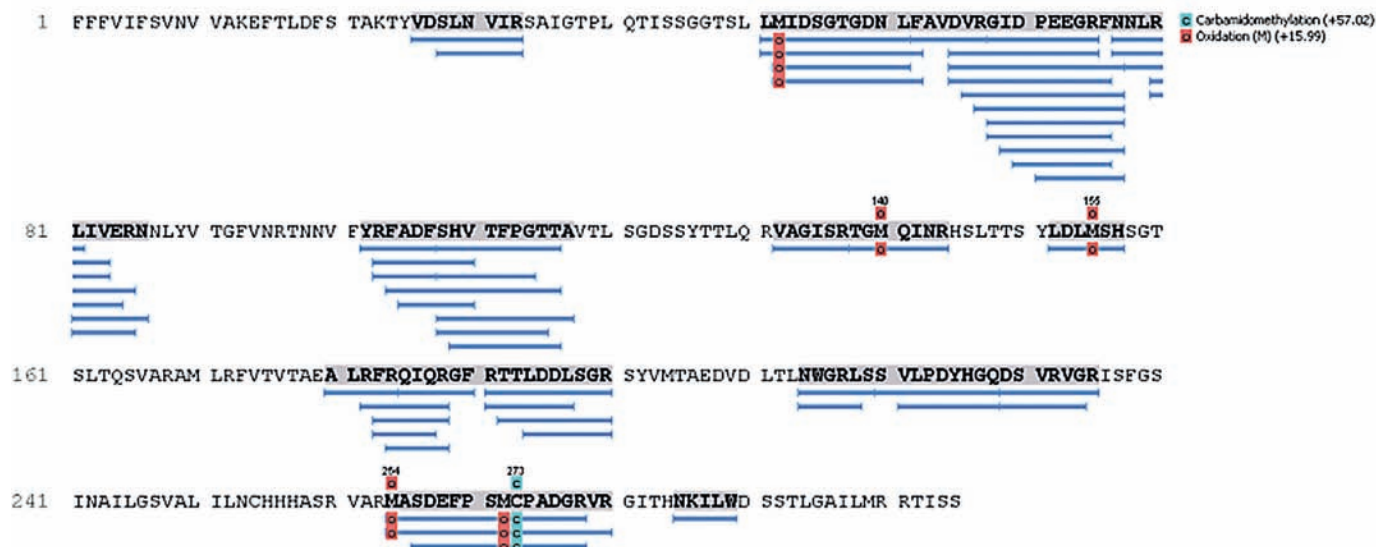


Рис. 5. Графическое изображение результатов идентификации белка rStx1A методом тандемной масс-спектрометрии. Отрезками под текстом последовательности белка представлены пептиды, идентифицированные при масс-спектрометрическом анализе. Буквами на отрезках указаны модификации ряда аминокислот – окисление метионина и модифицированный йодацетамидом цистеин.

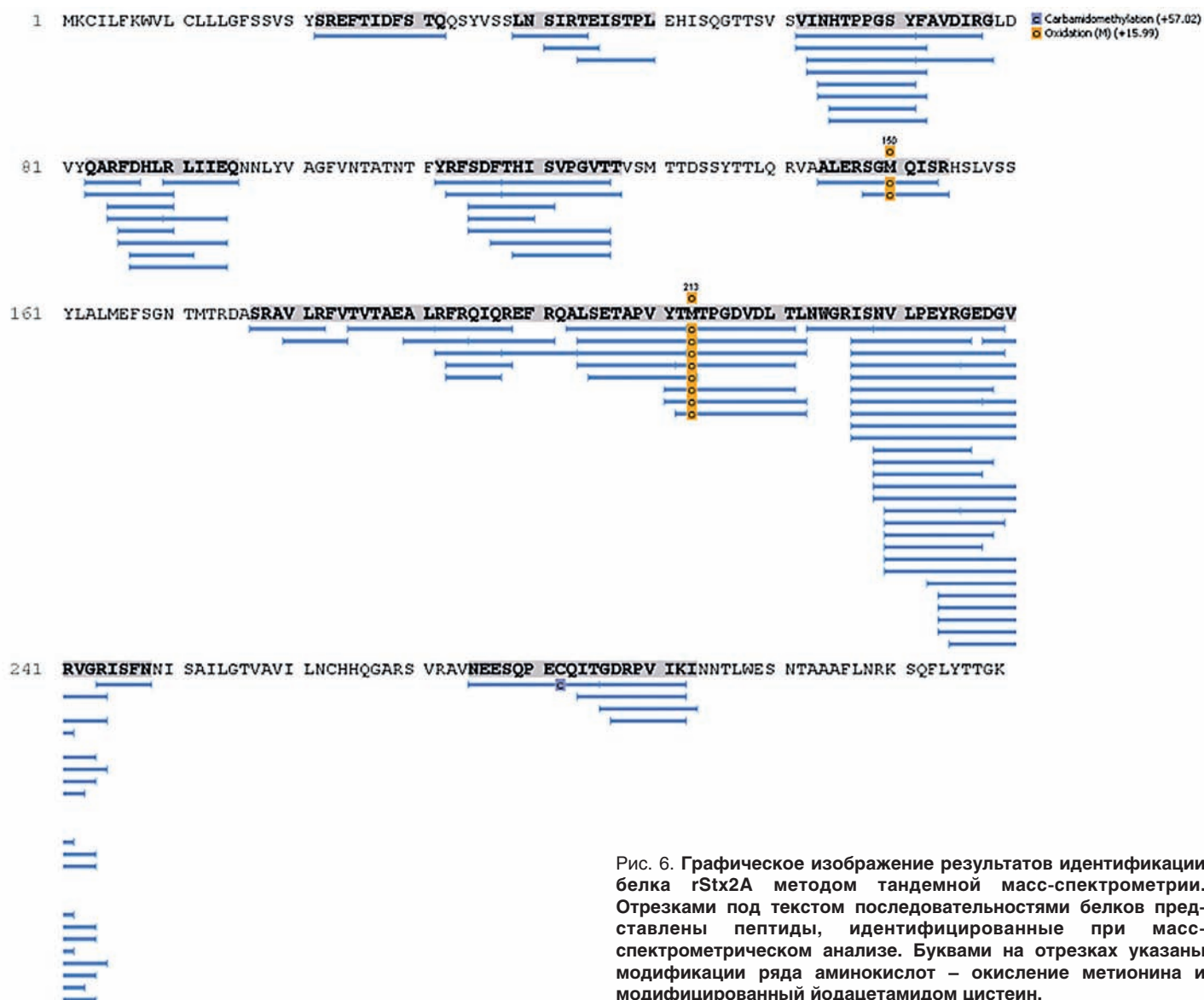


Рис. 6. Графическое изображение результатов идентификации белка rStx2A методом тандемной масс-спектрометрии. Отрезками под текстом последовательностями белков представлены пептиды, идентифицированные при масс-спектрометрическом анализе. Буквами на отрезках указаны модификации ряда аминокислот – окисление метионина и модифицированный йодацетамидом цистеин.

не встречаются ни в каких других белках, экспрессируемых в бактериях.

Для белка rStx2A определили 95 пептидов, из них 82 уникальных (табл. 3). При этом суммарное покрытие последовательности белка составило 54% (рис. 6).

Для получения функционально активных рекомбинантных белков на основании анализа генетических особенностей шига-токсинов, синтезируемых разными штаммами *E. coli*, выбрали потенциально эффективный в качестве продуцента штамм *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS. Выбор был обоснован наличием в целевых генетических последовательностях большого количества кодонов, синтез которых затруднен в обычной прокариотической системе экспрессии. *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS характеризуется наличием тРНК для кодонов AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, которые редко используются в *E. coli* дикого типа, что обеспечивает усиление экспрессии гетерологичных белков. Кроме того, *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS содержит плазмиду pLysS, которая продуцирует лизоцим фага T7, дополнительно ингибирующий транскрипцию T7-управляемых гетерологичных генов, что задерживает синтез токсичных для клеток-продуцентов белков до начала индукции.

Для экспрессии rStx1A, rStx2A, rStx1B и rStx2B применяли среду ZYM-5052. Данная среда позволяет поддерживать pH благодаря содержанию в ней фосфатного буфера и не требует добавления индуктора изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид, т.к. является аутоиндукционной [8]. В результате полученные культуры клеток имели высокую плотность и высокий выход рекомбинантного белка, учитывая сложность получения Stx-белков. Для предотвращения агрегации продуцируемых клетками субъединиц шига-токсинов проводили снижение температуры при культивировании, что также обеспечивало уменьшение количества гидрофобных взаимодействий, активизацию шаперонов, способствующих конформационному сворачиванию экспрессируемых белков, а также способствовало индукции биосинтеза протеаз теплового шока, образующихся при сверх экспрессии белков интереса [9].

Выборенный плазмидный вектор pETSUMO характеризуется наличием сильного промотора РНК-полимеразы бактериофага T7, стабильностью продукции потенциально токсических белков за счет низкого уровня копийности плазмид, наличием последовательностей, кодирующих 6 гистидинов, обеспечивающих очистку белков, и полипептида SUMO, выступающим эффективным катализатором фолдинга белка. Полипептид SUMO позволяет выделять белок из цитоплазмы в растворимой форме, что ускоряет и облегчает процесс получения белков интереса. В последующем полипептид SUMO отщепляется протеазой, при этом сохраняется нативная первичная последовательность целевого рекомбинантного белка. В результате выбранной стратегии получили высокоочищенные рекомбинантные Stx-белки, что подтвердили методом электрофореза. Идентичность рекомбинантных белков Stx1A, Stx2A, Stx1B, Stx2B подтвердили методом масс-спектрометрии.

В процессе проведения масс-спектрометрического анализа выявили наиболее часто повторяющиеся последовательности протеинов rStx1A, rStx2A, которые могут быть использованы при разработке базы для экспресс-идентификации шига-токсинов.

## Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания по НИОКР 1.1.14.

## Financial support

The work was performed within the framework of the state assignment for R&D 1.1.14.

## Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Литература

1. Terajima J, Izumiya H, Hara-Kudo Y, Ohnishi M. Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* and Foodborne Disease: A Review. *Food Saf (Tokyo)*. 2017 Jun 3; 5(2):35-53. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2016029
2. Keir LS. Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015 Jun;29(3):525-39. DOI: 10.1016/j.hoc.2015.01.007
3. Карцев НН, Светоч ЭА. Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика шига-токсин продуцирующих *Escherichia coli*. *Бактериология*. 2018;3(1):7-12. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-7-12
4. Kavaliauskiene S, Dyve Lingelem AB, Skotland T, Sandvig K. Protection against Shiga Toxins. *Toxins (Basel)*. 2017 Feb 3;9(2):44. DOI: 10.3390/toxins9020044
5. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*. 2014;2(4):10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
6. Russo LM, Melton-Celsa AR, Smith MJ, O'Brien AD. Comparisons of native Shiga toxins (Stxs) type 1 and 2 with chimeric toxins indicate that the source of the binding subunit dictates degree of toxicity. *PLoS One*. 2014 Mar 26;9(3):e93463. DOI: 10.1371/journal.pone.0093463
7. Tu W, Cai K, Gao X, Xiao L, Chen R, Shi J, et al. Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system. *Protein Expr Purif*. 2009 Oct;67(2):169-74. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.005
8. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*. 2005 May;41(1):207-34. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016
9. Хайруллин РФ, Киямова РГ, Ризванов АА. Экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*. Казань: Изд-во Казан. ун-та; 2018, 142 с.

## References

1. Terajima J, Izumiya H, Hara-Kudo Y, Ohnishi M. Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* and Foodborne Disease: A Review. *Food Saf (Tokyo)*. 2017 Jun 3; 5(2):35-53. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2016029
2. Keir LS. Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015 Jun;29(3):525-39. DOI: 10.1016/j.hoc.2015.01.007
3. Kartsev NN, Svetoch EA. Epidemiology, properties and laboratory diagnostics of *E. coli*-producing shiga-toxins. *Bacteriology*. 2018;3(1):7-12. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-7-12 (In Russian).
4. Kavaliauskiene S, Dyve Lingelem AB, Skotland T, Sandvig K. Protection against Shiga Toxins. *Toxins (Basel)*. 2017 Feb 3;9(2):44. DOI: 10.3390/toxins9020044
5. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*. 2014;2(4):10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
6. Russo LM, Melton-Celsa AR, Smith MJ, O'Brien AD. Comparisons of native Shiga toxins (Stxs) type 1 and 2 with chimeric toxins indicate that the source of the



- binding subunit dictates degree of toxicity. PLoS One. 2014 Mar 26;9(3):e93463. DOI: 10.1371/journal.pone.0093463
7. Tu W, Cai K, Gao X, Xiao L, Chen R, Shi J, et al. Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system. Protein Expr Purif. 2009 Oct;67(2):169-74. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.005
8. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. 2005 May;41(1):207-34. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016
9. Khairullin RF, Kiyamova RG, Rizvanov AA. Expression of recombinant proteins in *E. coli*. Kazan: Kazan, 2018, 142 p. (In Russian).

#### Информация об авторах:

Марьин Максим Александрович, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 31-1915  
E-mail: marin@obolensk.org

Рогозин Метхун Мадибронович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 31-1915  
E-mail: rogozin666@yandex.ru

Сури́н Алексе́й Константи́нович, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 36-0065  
E-mail: alexey\_surin@mail.ru

Коломбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью (ученый секретарь) ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 36-0069  
Email: kolombet@obolensk.org

Фирсто́ва Викто́рия Вале́рьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; профессор факультета биологической безопасности ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А»  
Телефон: (4967) 31-1915  
E-mail: firstova@obolensk.org

#### Information about authors:

Maxim A. Maryin, Researcher Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 31-1915  
E-mail: marin@obolensk.org

Metkhun M. Rogozin, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 31-1915  
E-mail: rogozin666@yandex.ru

Alexey K. Surin, PhD (Physical and Mathematical Sciences), Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0065  
E-mail: alexey\_surin@mail.ru

Lubov V. Kolombet, PhD, DSc (Biological Science), Scientific Secretary, Head of Science Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0069  
Email: kolombet@obolensk.org

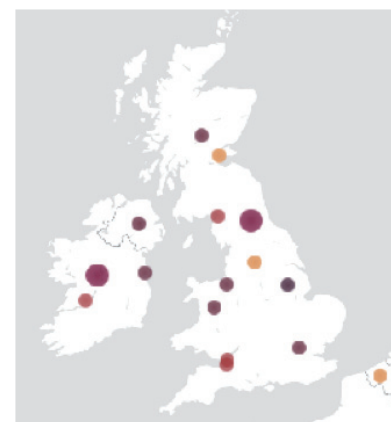
Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Science), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор; Professor of the Faculty of Biological Safety, Pushchino State Institute of Natural Science  
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 31-1915  
E-mail: firstova@obolensk.org

## НОВОСТИ НАУКИ

### 19,2 миллиона фунтов стерлингов выделено на проект межправительственного надзора в целях защиты здоровья населения

Межведомственная проектная группа, занимающаяся надзором за патогенами в сельском хозяйстве, продовольствии и окружающей среде (PATH-SAFE), крупной программой надзора за патогенами, получила государственное финансирование проекта в рамках второго раунда Фонда общих результатов Казначейства Ее Величества.

Финансирование будет направлено на поддержку трехлетнего проекта по развитию пилотной национальной сети эпиднадзора с использованием новейших технологий секвенирования ДНК и отбора проб окружающей среды для улучшения обнаружения и отслеживания патогенов пищевого происхождения и патогенов, устойчивых к противомикробным препаратам, во всей агропродовольственной системе – от фермы до вилки. Сердцем этой «виртуальной» сети станет новая база данных, которая позволит анализировать, хранить и обмениваться данными о последовательностях и источниках патогенов, собранными по всей Великобритании как правительством, так и общественными организациями.



£19.2 million for cross-government surveillance project to protect public health | Food Standards Agency [Электронный ресурс].  
URL: [https://www.food.gov.uk/news-alerts/news/ps192-million-for-cross-government-surveillance-project-to-protect-public-health?utm\\_campaign=674700\\_July%20Newsletter&utm\\_medium=email&utm\\_source=ClearCourse%20on%20Behalf%20of%20Microbiology%20Society&dm\\_t=0,0,0,0](https://www.food.gov.uk/news-alerts/news/ps192-million-for-cross-government-surveillance-project-to-protect-public-health?utm_campaign=674700_July%20Newsletter&utm_medium=email&utm_source=ClearCourse%20on%20Behalf%20of%20Microbiology%20Society&dm_t=0,0,0,0) (дата обращения: 08.12.2021).