

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 616. 932 (471)

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

### ЗИМОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОТЕАЗ VIBRIO CHOLERAЕ O1 И O139 СЕРОГРУПП

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»  
Роспотребнадзора (Иркутск)

**Цель.** Зимографический анализ водорастворимых протеаз *V. cholerae* eltor O1 и *V. cholerae* O139 серогрупп. **Материалы и методы.** Бактерии культивировали на казеин-дрожжевом агаре (рН 7,6) при 37 °С в течение одних суток и смывали физиологическим раствором. Бактериальную массу (концентрацией 10<sup>9</sup> кл./мл) обрабатывали стерильным раствором мочевины в конечной концентрации 4,5 М. После суточной экспозиции и определения стерильности полученного лизата нерастворимый в мочевины материал (клеточные оболочки) удаляли высокоскоростным центрифугированием. Надосадочную жидкость подвергали диализу, освобождали от нерастворимого в воде осадка центрифугированием и лиофильно высушивали. Протеазную активность определяли в диффузионном тесте в 1% агарозном геле, содержащем 0,5% желатина или 0,5% казеина. Спектр протеаз анализировали субстратным электрофорезом в блоках 8% полиакриламидного геля, импрегнированного в процессе полимеризации желатином или казеином (в конечной концентрации 0,1%), в присутствии додецилсульфата натрия. **Результаты.** После дифференциального центрифугирования мочевинового лизата клеток и диализа в исследуемых экстрактах остаются преимущественно внутриклеточные водорастворимые протеазы. Диффузионные тесты показали, что все препараты исследуемых штаммов холерного вибриона обладают протеазной активностью разной интенсивности. Смена субстрата в диффузионном тесте с желатина на казеин привела к общему уменьшению регистрируемых зон гидролиза, указывая, что казеин расщепляется менее активно в сравнении с желатином. Субстратный электрофорез показал, что белки, составляющие спектр водорастворимых протеаз холерного вибриона, извлекаемых мочевиной, обладают молекулярной массой, варьирующей в пределах от менее 30 кДа до более 120 кДа. Отмечаются штаммовые различия в количественной и качественной характеристике спектров растворимых протеаз. Выявлена зависимость характеристики профиля водорастворимых протеаз от используемого субстрата. При оценке спектров протеаз получено четкое подтверждение, что на гелях, импрегнированных желатином, электрофоретическая подвижность протеаз выше, чем в гелях, содержащих казеин. **Заключение.** Субстратный электрофорез препаратов бесклеточных лизатов холерного вибриона показал наличие нескольких водорастворимых протеаз, количественные и качественные межштаммовые различия, зависимость спектра активных протеаз от используемого субстрата.

**Ключевые слова:** субстратный электрофорез, мочевиновые экстракты, протеазы *V. cholerae*, зимография

### ZYMOGRAPHIC ANALYSIS OF WATER-SOLUBLE PROTEASES OF VIBRIO CHOLERAЕ O1 AND O139 SEROGROUPS

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

Anti plague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

**Aim.** Zymographic analysis of water-soluble proteases of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups. **Materials and methods.** Bacteria cultivated on a casein-yeast agar (pH 7,6) at 37 °C with during one twenty-four hours and washed off physiological solution. Bacterial mass (by the concentration of 10<sup>9</sup> cell./ml) was treatment by sterile solution of urea in an eventual concentration 4,5 M. After day's display and determination of sterility of got lysate insoluble in urea material (cell walls) was deleted by high-speed centrifugation. Supernatant liquid was exposed to the dialysis, released from insoluble in water sediment centrifugation and freeze dried out. Protease activity was determined in diffusion test in 1% agarose gel, containing 0,5% gelatin or 0,5% casein. The spectrum of proteases was analysed by a substrate electrophoresis in the blocks of 8% polyacrylamide gel, impregnated in the process of polymerization gelatin or casein (in an eventual concentration 0,1%), in presence the dodecylsulphate of sodium. **Results.** After differential centrifugation of ureal lysate of cells and dialysis there are mainly intracellular water-soluble proteases in the investigated extracts. Diffusion tests showed that all preparations of the investigated strains of *Vibrio cholerae* possessed protease activity of different intensity. Changing of substrate in diffusion test from gelatin to the casein resulted in the general diminishing of the registered areas of hydrolysis, specifying that a casein fissions less actively by comparison to gelatin. Substrate electrophoresis showed that proteins, making the spectrum of water-soluble proteases of *Vibrio cholerae* are extracted by urea, possessed molecular mass, varying within from less than 30 kDa to more than 120 kDa. Strains distinctions are marked in quantitative and high-quality description of spectrums of soluble proteases. Dependence of description of type of water-soluble proteases is educed on used substrate. At the estimation of spectrums of proteases clear confirmation is got, that on gels are impregnated by gelatin electrophoretic mobility of proteases is higher, than in gels, containing a casein. **Conclusion.** Substrate electrophoresis of preparations of cell-free lysates of *Vibrio cholerae* showed the presence of a few water-soluble proteases, quantitative and high-quality interstrain distinctions, dependence of spectrum of active proteases from of used substrate.

**Key words:** substrate electrophoresis, ureal extracts, proteases, *Vibrio cholerae*, zymography

## ВВЕДЕНИЕ

Протеазы, протеиназы или пептидазы, обнаруживаемые у всех живых организмов, гидролизуют пептидные связи в молекулах пептидов и белков, вызывая их полный или частичный гидролиз. У бактерий протеолитические ферменты могут локализоваться в цитоплазме (внутриклеточные), в поверхностных структурах (периплазме, наружной мембране грамотрицательных бактерий, S-слое) или секретироваться через клеточную оболочку во внешнюю среду (экстрацеллюлярные).

В течение долгого времени функции протеаз связывали исключительно с катаболизмом или перевариванием белков с образованием аминокислот, используемых в качестве питательных веществ. Однако в настоящее время установлено, что протеазам, катализирующим специфичный ограниченный протеолиз, присущ более широкий диапазон биологических функций. Согласно современным представлениям протеазы осуществляют посттрансляционную модификацию многих белков, модулируют белок-белковые взаимодействия, участвуют в образовании новых биоактивных молекул, генерировании, преобразовании и усилении молекулярных сигналов [9]. Протеазы многих болезнетворных микроорганизмов инактивируют антимикробные пептиды [13], участвуют в активации системы врожденного иммунитета организма хозяина, проявляют протективную и иммуномодулирующую активность [11, 12, 17]. Кроме того, некоторые из них выступают в качестве факторов вирулентности [7], что используется для разработки специальной, нацеленной на ингибирование этих гидролитических ферментов, терапии инфекционных болезней [18].

О важности протеаз свидетельствует тот факт, что около 1–5 % генома (в зависимости от вида организма) кодирует пептидазы или их гомологи [9, 15]. В частности, у хорошо изученного лабораторного штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 предполагается наличие в протеоме 155 различных протеаз, занесенных в базу данных MEROPS [15], функцию большинства из которых предстоит еще выяснить.

У *Vibrio cholerae* к настоящему времени охарактеризовано всего несколько протеаз. Среди последних гемагглютинин/протеаза, участвующая в активации холерного токсина, адгезии *V. cholerae* к эпителиоцитам тонкого кишечника и распространении инфекции через желудочно-кишечный тракт [16]; локализованная в поверхностных структурах PrtV-протеаза, ответственная за цитотоксический эффект [5]; YaeL-протеаза, связанная с деградацией регулятора вирулентности TsrP [10]. Показано наличие протеаз в наружной мембране [1–4] и культуральных фильтрах *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп [14, 17, 19]. Вместе с тем, остаются недостаточно изученными состав и свойства внутриклеточных протеаз холерного вибриона. Безусловно, дальнейшее изучение свойств и состава протеаз будет способствовать углубленному пониманию механизмов вирулентности и, возможно, обнаружению новых путей взаимодействия холерного вибриона с организмом хозяина. Одним из высокочувствительных

и наглядных способов детекции протеаз является метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем различные белковые субстраты (чаще всего желатин или казеин), получивший название «зимография» [8]. Зимография считается относительно простым, чувствительным и поддающимся количественному определению методом анализа протеаз в биологических образцах разного происхождения.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Зимографический анализ извлекаемых мочевой водорастворимых протеаз *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовано 18 штаммов *V. cholerae* eltor O1 серогруппы и 3 штамма *V. cholerae* O139 серогруппы разной эпидемической значимости, полученные из музея живых культур ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора. Первая группа представлена токсигенными (содержащими комплекс генетических детерминант патогенности – *ctxAB*, *tcpA* и *toxR*) штаммами *V. cholerae* eltor O1 (И-563; М-878; И-1263; И-1298; И-1330; И-1332; И-1337; И-1342) и *V. cholerae* O139 (И-11), изолированными от больных холерой и объектов окружающей среды во время вспышек холеры. Во вторую группу вошли нетоксигенные (у которых гены *ctxAB*, и *tcpA* не обнаружены) штаммы *V. cholerae* eltor (И-638; И-1299; И-1327; И-1369; И-1407; 2131; 2-01; 129-05-В) и штаммы *V. cholerae* O139 (И-5; И-16), выделенные из поверхностных водоемов в отсутствие эпидситуации по холере. Кроме того, в работу взяты клинические изоляты *V. cholerae* eltor (штаммы 1291 и 1292), выделенные во время вспышки холеры в девяностые годы прошлого столетия в Бразилии, характеризующиеся наличием гена *toxR* и отсутствием генов *ctxAB* и *tcpA*. Бактерии культивировали на казеин-дрожжевом агаре (рН 7,6) при 37 °С в течение одних суток и смывали физиологическим раствором. Бактериальную массу (в концентрации 10<sup>9</sup> кл./мл) обрабатывали стерильным 9 М раствором мочевины в соотношении 1:1. После суточной экспозиции и определения стерильности полученного лизата нерастворимый в мочевины материал (клеточные оболочки) удаляли высокоскоростным центрифугированием. Надосадочную жидкость подвергали диализу против проточной и дистиллированной воды, освобождали от образовавшегося осадка центрифугированием и лиофильно высушивали [3].

Протеазную активность определяли в диффузионном тесте в 1% агарозном геле, содержащем 0,5 % желатина (Serva) или 0,5 % казеина (Sigma), после обработки 20 % раствором трихлоруксусной кислоты по наличию зон просветления вокруг лунок на фоне мутного денатурированного субстрата. Протеазную активность препаратов оценивали в миллиметрах по ширине (от края лунки) зон гидролиза.

Субстратный электрофорез в блоках 8% полиакриламидного геля, импрегнированного в процессе

полимеризации желатином или казеином (в конечной концентрации 0,1 %), в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) проводили по методу С. Neussen и Е.В. Dowdle [6]. В качестве маркерных белков использовали смесь № 4 (Serva) и трипсин (Serva). О наличии протеаз в анализируемых образцах судили по появлению на электрофореграммах неокрашенных зон гидролиза на фоне окрашенного амидовым черным 10 В субстратного геля.

Статистическую обработку проводили общепринятыми методами, рассчитывая среднеарифметические величины и их ошибки.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве первого этапа идентификации состава и молекулярной массы водорастворимых протеаз холерного вибриона, извлекаемых из бактерий 4,5 М раствором мочевины, использован метод субстратного гель-электрофореза (зимография). Ранее нами было показано, что такая обработка живых микробных клеток холерного вибриона мочевиной позволяет получать ферментативно активные стерильные препараты лизатов холерного вибриона [3]. Диффузионные тесты в агарозе, содержащей желатин, показали, что в высоких концентрациях (> 2 М) мочевины полностью ингибирует активность извлекаемых протеаз, однако удаление мочевины в процессе диализа приводит к восстановлению их ферментативной активности. После отделения клеточных оболочек ультрацентрифугированием и диализом супернатанта против дистиллированной воды или забуференного физиологического раствора в исследуемых мочевиновых экстрактах (МЭ) остаются преимущественно внутриклеточные водорастворимые протеазы.

Результат диффузионного теста в содержащих белковый субстрат агарозных гелях показал, что все препараты МЭ исследуемых штаммов холерного вибриона обладают в той или иной степени желатиназной активностью (рис. 1). У токсигенных штаммов максимальным ее уровнем отличались МЭ из штаммов *V. cholerae eltor* O1 серовара Инаба М-878 и *V. cholerae eltor* O1 И-1263, образующие зону гидролиза шириной  $8,00 \pm 0,03$  мм, наименьшей активностью среди токсигенных штаммов обладали МЭ из *V. cholerae eltor* O1 И-1337 с зоной гидролиза –  $3,00 \pm 0,04$  мм и *V. cholerae eltor* O1 И-1330 с зоной гидролиза –  $1,00 \pm 0,03$  мм ( $p < 0,05$ ). Среди МЭ нетоксигенных штаммов более активными оказались препараты из штаммов *V. cholerae eltor* O1 2131 (зона гидролиза –  $6,00 \pm 0,04$  мм), *V. cholerae eltor* O1 129-05-В (зона гидролиза –  $6,00 \pm 0,03$  мм) и *V. cholerae eltor* O1 И-1369 (зона гидролиза –  $5,00 \pm 0,02$  мм), наименьшую протеолитическую активность среди МЭ нетоксигенных штаммов проявил препарат *V. cholerae eltor* O1 2-01 с шириной зоны гидролиза  $2,00 \pm 0,04$  мм ( $p < 0,05$ ). Использование в качестве субстрата вместо желатина казеина привело к общему уменьшению ширины регистрируемых в диффузионном тесте зон гидролиза, указывая тем самым, что протеазы холерного вибриона хуже расщепляют казеин, чем желатин.

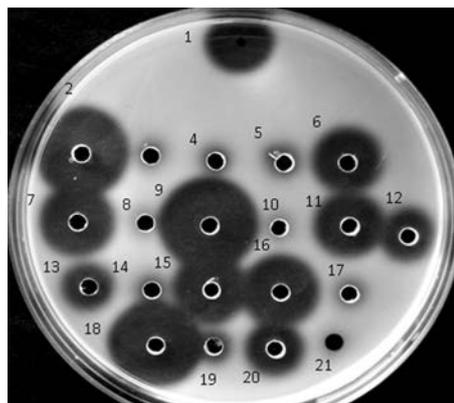
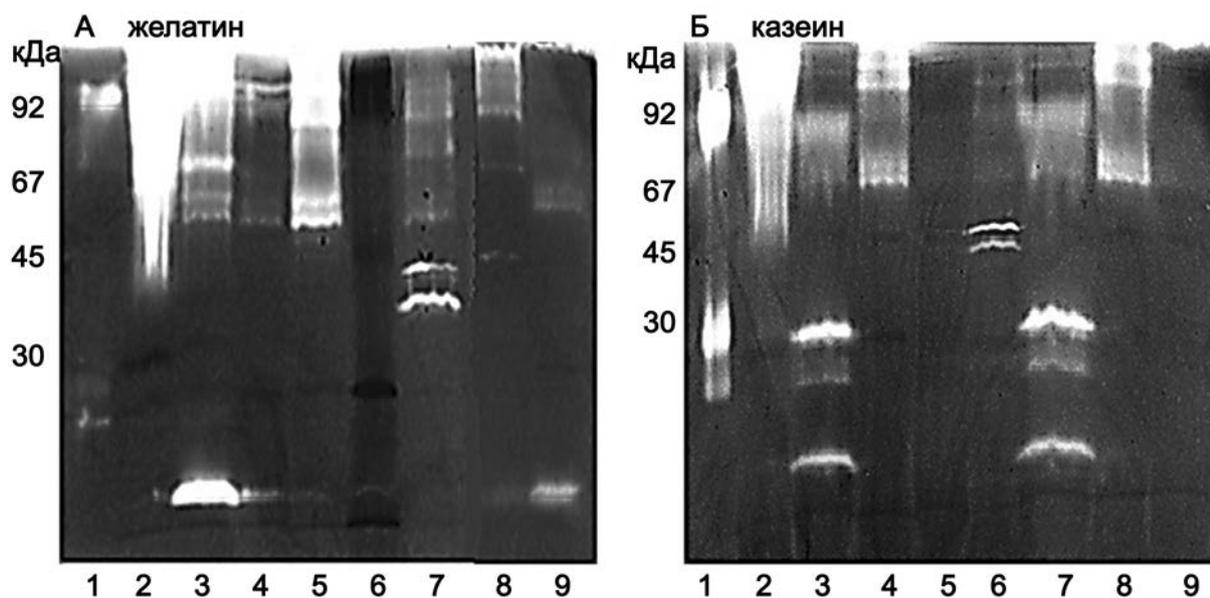


Рис. 1. Диффузионный тест мочевиновых экстрактов (МЭ) холерного вибриона в 1% агарозном геле с использованием в качестве субстрата 0,5% желатина. 1 – трипсин, 2 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 М-878, 3 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1330, 4 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 2-01, 5 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1337, 6 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 2131, 7 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369, 8 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1332, 9 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1263, 10 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1407, 11 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 129-05-В, 12 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 129-05-В, 13 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 2131, 14 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1337, 15 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 1369; 16 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 129-05-В; 17 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O139 И-16; 18 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 М-878, 19 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1337, 20 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 129-05-В, 21 – контроль растворителя.

Субстратный электрофорез водорастворимых протеаз мочевиновых экстрактов холерного вибриона показал, что молекулярная масса полипептидов с протеолитической активностью у разных штаммов варьирует в широких пределах от 30 до 120 кДа. В ряде случаев были обнаружены полипептиды с молекулярными массами менее и более указанных величин (рис. 2), точное определение размеров которых в указанных условиях проведения ДСН-электрофореза оказалось затруднительным. Препараты МЭ разных штаммов холерного вибриона отличаются по количеству и интенсивности зон гидролиза субстрата на электрофореграммах. При использовании в качестве субстрата желатина (рис. 2А) у препаратов МЭ из токсигенного штамма *V. cholerae eltor* М-878, клинического нетоксигенного штамма *V. cholerae eltor* 1291 и нетоксигенного штамма *V. cholerae eltor* И-1369 на зимограмме обнаружено 6 водорастворимых протеаз, у препарата МЭ из нетоксигенных штаммов *V. cholerae eltor* 129-05-В и *V. cholerae* O139 И-16 – 7, у препарата МЭ из нетоксигенных штаммов *V. cholerae eltor* 2131 и *V. cholerae eltor* 2-01 – 8 и 4, соответственно.

Спектр водорастворимых протеаз, выявляемых на зимограммах, в большинстве случаев зависел от применяемого субстрата. При использовании в качестве субстрата желатина зоны гидролиза были более выраженными в сравнении с казеиновым субстратом. При замене субстрата на казеин в полиакриламидном геле в некоторых случаях изменялось количество протеаз, либо их электрофоретическая подвижность (рис. 2А и Б, трек 3). Кроме того, установлено, что в



**Рис. 2.** Субстратный диск-электрофорез мочевиновых экстрактов (МЭ) с использованием в качестве субстрата: **А** – желатин, **Б** – казеин. **А:** 1 – трипсин, 2 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 М-878, 3 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 1291, 4 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 129-05-В, 5 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369, 6 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369, обработанный β-меркаптоэтанолом, 7 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 2131, 8 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O139 И-16, 9 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 2-01. **Б:** 1 – трипсин, 2 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 М-878, 3 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 1291, 4 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369, 5 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O139 И-16, 6 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 2131, 7 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 1291, 8 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369, 9 – препарат МЭ *V. cholerae eltor* O139 И-16.

гелях, импрегнированных желатином, электрофоретическая подвижность протеаз выше, чем в гелях, содержащих казеин.

При обработке препарата МЭ, приготовленного из штамма *V. cholerae eltor* O1 И-1369 (ctx-), редуцирующим агентом β-меркаптоэтанолом происходит изменение полипептидного спектра и уменьшение количества активных протеаз (рис. 2 А треки 5, 6).

Таким образом, использование зимографической техники позволяет разделять и визуализировать водорастворимые протеазы холерного вибриона на электрофореграммах в соответствии с их молекулярными массами и сродством к белковым субстратам. После электрофоретического разделения (в денатурирующих (в присутствии ДСН) и в невосстанавливающих (без β-меркаптоэтанолола) условиях) и удаления ДСН с помощью Тритона X-100, последующей инкубации в буфере, содержащем CaCl<sub>2</sub>, протеазы частично ренатурируют, гидролизуют субстрат, что приводит к образованию неокрашенных зон на фоне окрашенного белковыми красителями полиакриламидного геля. Одним из положительных моментов данного способа является отделение протеаз от их ингибиторов в случае их присутствия в анализируемых образцах. Тем не менее, при образовании мультимерных комплексов в отсутствие восстанавливающих агентов возможны затруднения, как в определении количества активных протеаз, так и их молекулярных масс.

Необходимо отметить, что зимография нашла широкое применение для анализа состава протеаз различных организмов. Однако эта техника довольно редко используется для изучения протеаз холерного вибриона. Тем не менее, с помощью желатиновой зимографии

у различных штаммов *V. cholerae* было обнаружено несколько протеаз в культуральных бесклеточных супернатантах [14, 19] и наружной мембране [4], но пока без их идентификации, хотя субстратный электрофорез позволяет проводить дальнейшую характеристику выявляемых протеаз посредством реэлектрофореза и пептидного картирования индивидуальных зон гидролиза.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Субстратный электрофорез препаратов бесклеточных мочевиновых экстрактов холерного вибриона показал наличие нескольких водорастворимых протеаз, выявил количественные и качественные различия в составе протеаз у разных штаммов, а также зависимость спектра активных протеаз от используемого субстрата. Препараты мочевиновых экстрактов обладают большей протеолитической активностью в сравнении с ранее изученными препаратами наружных мембран холерного вибриона [4] и отличаются более сложным протеазным спектром, что, вероятно, связано с их большей метаболической активностью. Описанная методика обработки микробной массы мочевиной позволяет получать высокоактивные препараты водорастворимых ферментов, пригодные для дальнейшего фракционирования и изучения протеаз, в том числе их связи с вирулентностью холерного вибриона.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Наружные мембраны холерного вибриона как потенциальный компонент химической вакцины / Е.Ю. Марков [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1995. – № 2. – С. 86–89.

2. Плазминоген-активирующая способность холерного вибриона и участие мембранного белка OmpT в этом процессе / Е.С. Шипко [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. – 2012. – № 4. – С. 17–19.
3. Получение высокоиммуногенного препарата наружных мембран *Vibrio cholerae eltor* / Е.Ю. Марков [и др.] // Журн. инфекционной патологии. – 1998. – Т. 5, № 4. – С. 42–48.
4. Протеазный спектр наружных мембран *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп / В.Б. Николаев [и др.] // Журн. инфекционной патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 41–44.
5. A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grazing / K. Vaitkevicius [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, N 24. – P. 9280–9285.
6. 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.
7. Ingmer H., Brøndsted L. Proteases in bacterial pathogenesis // Res. Microbiol. – 2009. – Vol. 160, N 9. – P. 704–710.
8. Lantz M. S., Ciborowski P. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases // Methods Enzymol. – 1994. – Vol. 235. – P. 563–594.
9. López-Otin C., Bond J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, N 45. – P. 30433–30437.
10. Matson J., DiRita V.J. Degradation of the membrane-localized virulence activator TcpP by the YaeL protease in *Vibrio cholerae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102, N 45. – P. 16403–16408.
11. Nelson D.C., Garbe 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.
12. Potempa J., Pike R. Corruption of innate immunity by bacterial proteases // J. Innate Immun. – 2009. – Vol. 1, N 2. – P. 70–87.
13. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37 / A. Schmidtchen, I. M. Frick, E. Andersson [et al.] // Mol. Microbiol. – 2002. – Vol. 46, N 1. – P. 157–168.
14. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae* / J. Zhu [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99, N 5. – P. 3129–3134.
15. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database // Nucl. Acids Res. – 2010. – Vol. 38, Database issue. – P. D227–D233.
16. Shinoda S. Proteases produced by *Vibrio cholerae* and other pathogenic vibrios: pathogenic roles and expression // Epidemiological and Molecular Aspects on Cholera / Eds. T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya. – New York : Springer, 2011. – P. 245–258.
17. Stewart-Tull D.E., Bleakley C.R., Galloway T.S. Characteristics of *Vibrio cholerae* proteinases: potential, candidate vaccine antigens // Vaccine. – 2004. – Vol. 22, N 23–24. – P. 3026–3034.
18. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects // Nat. Rev. Drug. Discov. – 2006. – Vol. 5, N 9. – P. 785–789.
19. Vance R.E., Zhu J., Mekalanos J.J. A constitutively active variant of the quorum-sensing regulator LuxO affects protease production and biofilm formation in *Vibrio cholerae* // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71, N 5. – P. 2571–2576.

**Сведения об авторах**

**Козлов Станислав Николаевич** – младший научный сотрудник биохимического отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8(3952) 22-01-38; сот. тел.: 89834022839; e-mail: ejime@mail.ru)

**Николаев Валерий Борисович** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

**Марков Евгений Юрьевич** – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий биохимическим отделом ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

**Урбанович Людмила Яковлевна** – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора