

А.У. Исабек, Э.Т. Тайлакова, Г.О. Шыныбекова, В.М. Строчков, О.В. Червякова

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
пгт. Гвардейский, Жамбылская область, Казахстан
(E-mail: isabekova_aisha@mail.ru)

Экспрессия и очистка белка IalB *Brucella* spp.

В последние годы наблюдается заметное распространение особо опасных инфекционных болезней, которые наносят большой экономический ущерб животноводству. Важнейшим и перспективным методом борьбы с инфекционными болезнями является иммунопрофилактика. Используемые в настоящее время вакцины для профилактики бруцеллеза требуют своего принципиального изменения и совершенствования. Одно из перспективных направлений при разработке безопасных и эффективных средств профилактики — использование протективных антигенных белков *Brucella* spp. Целью данных исследований являлось получение рекомбинантного белка IalB *Brucella* spp. методом бактериальной экспрессии в *Escherichia coli*. В результате проведенных исследований ген, который кодирует инвазивный белок IalB, был амплифицирован с геномной ДНК *Brucella suis* и клонирован в бактериальный экспрессирующий вектор рЕТ28b (+). Отработаны оптимальные условия экспрессии целевого гена в клетках *E. coli*, штамм ER2566 и условия очистки рекомбинантного белка — методом металл-аффинной хроматографии. Степень очистки белка составила не менее 95 %. При иммунизации рекомбинантным белком IalB в организме мышей вырабатываются антитела, которые детектируются в иммуноферментном анализе. Полученный рекомбинантный белок будет использован для разработки профилактических препаратов против бруцеллеза животных.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, клонирование, экспрессия, бруцеллез, антитела.

Введение

Бруцеллез является бактериальной болезнью, наносящей большой экономический ущерб животноводству. Объединенный комитет экспертов ФАО информирует о повсеместном распространении бруцеллеза сельскохозяйственных животных [1, 2]. В Казахстане бруцеллез регистрируется практически у всех видов сельскохозяйственных и домашних животных (крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, северные олени, маралы, лошади, верблюды, яки, буйволы, зебу, собаки). Эпизоотологически и экономически наиболее значимым является бруцеллез крупного рогатого скота [3–6].

Важнейшим и перспективным методом борьбы с инфекционными болезнями является иммунопрофилактика. Против бруцеллеза в разное время было предложено значительное количество инактивированных и живых вакцин. Наибольшее признание во всем мире получила живая вакцина против бруцеллеза из аттенуированного агглютиногенного штамма *B. abortus* 19, которая широко применялась в СССР, США и многих других странах мира. Существенным недостатком этих вакцин является наличие в крови иммунизированных животных антител, выявляемых в серологических реакциях, принятых для диагностики бруцеллеза, затрудняющих определение эпизоотического статуса животных по бруцеллезу [7, 8].

Таким образом, задача создания эффективной и безопасной вакцины против бруцеллеза остается актуальной. В связи с этим постоянно проводятся исследования по конструированию новых и совершенствованию протективных свойств имеющихся вакцин, как для людей, так и для животных. Перспективным направлением разработки эффективных вакцин против инфекционных заболеваний является создание аттенуированных рекомбинантных векторов, осуществляющих доставку в организм протективных антигенов, с которыми связано формирование профилактического или лечебного эффекта вакцинации [9].

На сегодняшний день было выявлено свыше 10 защитных белков *Brucella*. Как известно, инвазивный белок IalB (ВМЕ1 1584) также является протективным антигеном *Brucella*, который локализован в цитоплазматической мембране. Данный белок идентичен с основным фактором вирулентности *Bartonella bacilliformis*, который играет основную роль в инфицировании эритроцитов человека [10, 11].

Целью данных исследований являлось получение рекомбинантного белка IalB *Brucella* spp. методом бактериальной экспрессии в *E. coli*.

Материалы и методы

Конструирование экспрессирующего вектора и создание штамма-продуцента E. coli. Нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок IalB, амплифицировали с геномной ДНК *B. suis*, штамм 1330 — с использованием праймеров (FP-tctagatctagcctccctgcccgg, RP-acggctgcaccttggtcaatgctg) и клонировали в экспрессирующий вектор pET28b(+) (Novagen) по сайтам BamHI — SalI. Корректность полученной конструкции подтверждали секвенированием. Затем вектор pET28/Bru-IalB трансформировали в компетентные клетки *E. coli* штамм ER2566 (NEB).

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка. Клетки *E. coli*, штамм ER2566, трансформированные вектором pET28/Bru-IalB, выращивали в среде LB-кан50 (содержание канамицина 50 мкг/мл) при 37 °C на шейкере (250 об/мин) до OD600 = 0,6–0,8, затем добавлением ИПТГ до конечной концентрации 1 mM индуцировали экспрессию целевого гена. Индуцированную культуру инкубировали в течение 4 ч при тех же условиях. Затем клетки собирали центрифугированием и хранили при –70 °C до использования. Растворимость рекомбинантного белка определяли с использованием реагента B-PER® Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Для очистки рекомбинантного белка осадок клеток ресуспендировали в буфере (100 mM Трис HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % ДОХ) из расчета 15 мл на 1 г сырого клеточного осадка. К полученной суспензии добавляли лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл. Лизис клеток осуществляли путем двукратного замораживания (–70 °C) — оттаивания (+37 °C) суспензии. Фракцию растворимых белков получали центрифугированием лизата клеток при 10000× g в течение 20 мин. Очистку белка проводили методом металл-аффинной хроматографии с использованием HisPur™ Cobalt Superflow Agarose (Thermo Scientific, США) в нативных условиях согласно протоколу производителя. Электрофоретический анализ полипептидов проводили в 12 % ДСН-ПААГ в денатурирующих редуцирующих условиях по Laemmli [12]. Для визуализации белков использовали окрашивание Coomassie G-250. По интенсивности окрашивания белковых полос определяли чистоту целевого белка.

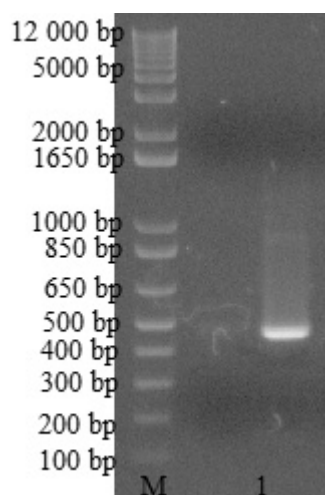
Иммунизация мышей. В исследовании использовали беспородных белых мышей (самки, 6–8 недель, масса 18–20 г). Очищенный белок соединяли с адьювантом Montanide Gel 01 (SEPPIC) в соотношении 9:1 (об./об.). Конечная концентрация белка составила 180 мкг/мл. Иммунизацию проводили подкожно трехкратно в дозе 25 мкг белка. Забор крови проводили из хвостовой вены. Сыворотки тестируют в ИФА на наличие антител. Период наблюдения — 36 дней.

Иммуноферментный анализ. Для постановки ИФА 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария) сенсibilизировали рекомбинантным белком IalB. С этой целью в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл карбонат-бикарбонатного буфера, содержащего 2 мкг/мл рекомбинантного белка IalB. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4 °C. Затем планшеты трехкратно отмывали буфером TBST (150 mM NaCl, 20 mM трис-HCl, pH 7,5, 0,1 % твин-20) и блокировали, внося в каждую лунку по 100 мкл блокирующего буфера (150 mM NaCl, 20 mM трис-HCl, pH 7,5, 5 % обезжиренное сухое молоко). Двукратные разведения исследуемых сывороток вносили по 100 мкл в лунки планшета, инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. После трехкратной отмывки в лунки планшета вносили конъюгаты антимышинных IgG с щелочной фосфатазой (Sigma, США) в разведении 1:5000 и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Планшеты отмывали трехкратно и вносили по 100 мкл субстрата для щелочной фосфатазы (pNPP) (Sigma, США), инкубировали 30 мин. Оптическую плотность (ОП) измеряли с использованием микропланшетного ридера ImmunoChem-2100 при длине волны 405/630 нм. Титром считали наибольшее разведение сыворотки, в которой оптическая плотность специфической сыворотки в два и более раз превышала таковую нормальной сыворотки.

Результаты исследований

Амплификацию нуклеиновой последовательности гена IalB проводили методом ПЦР в объеме 50 мкл: 5 мкл 10× буфера, 1 мкл 10 mM смеси дНТФ, по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 2,5 ед. Taq-полимеразы, 1 мкг ДНК, воды до 50 мкл. Температурный режим: 94 °C — 2 мин; 30 циклов 94 °C — 30 с, 50 °C — 1 мин, 68 °C — 1 мин; 68 °C — 7 мин.

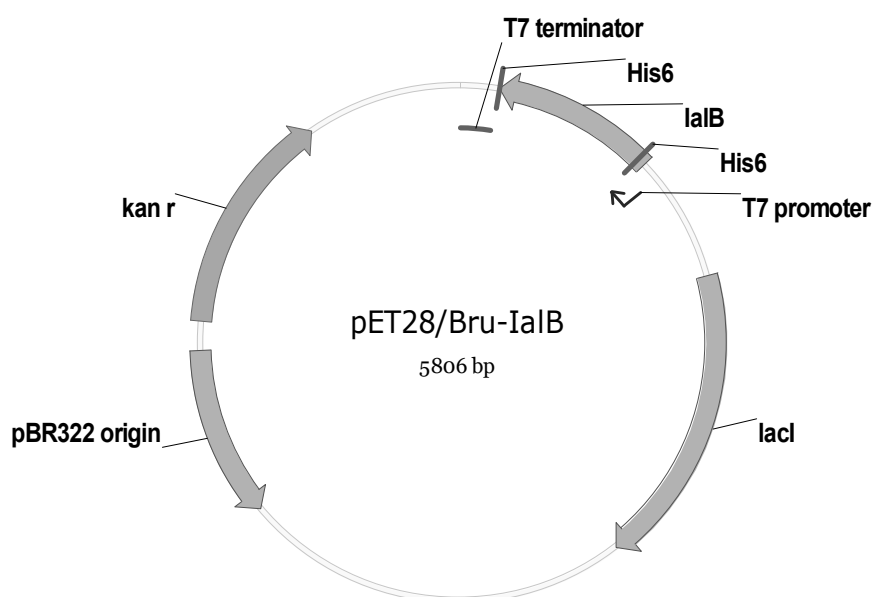
В результате ПЦР получили продукт размером приблизительно 490 п.о. (рис. 1). Расчетный размер гена IalB составляет 489 п.о.



M — маркер размера фрагментов ДНК; *I* — ПЦР-продукт (ген *IalB*)

Рисунок 1. Электрофоретический анализ продуктов амплификации гена *IalB*

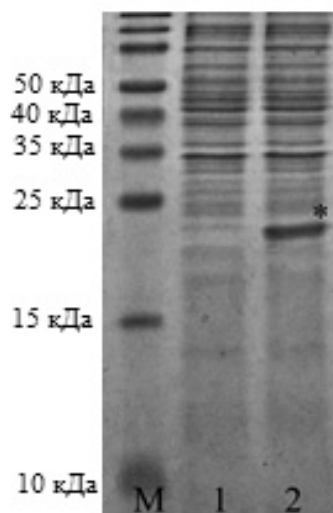
Аmplified DNA fragment was cloned into the plasmid expression vector pET28b(+). The resulting recombinant plasmid contained the nucleotide sequence of the *IalB* protein under the control of the T7 promoter. The amino acid sequence at the N- and C-termini has histidine tags His6 (fig. 2).



pBR322 origin — сайт начала репликации; *kan r* — ген устойчивости к канамицину;
lacI — ген репрессора лактозного оперона; *T7 promoter* — промотор фага;
T7, T7 terminator — терминатор транскрипции фага;
T7, IalB — встроенный рекомбинантный ген;
IalB, His6 — последовательность, кодирующая гексагистидиновый таг

Рисунок 2. Карта плазмиды pET28/Bru-IalB

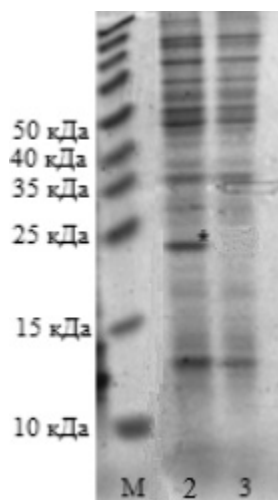
The resulting recombinant plasmid was transformed into *E. coli* strain ER2566. Induction of the target gene expression with IPTG led to the production of a protein product of approximately 21 kDa, which corresponded to the calculated molecular weight of the recombinant protein (fig. 3).



M — маркер молекулярного веса белков; *1* — лизат клеток до индукции экспрессии; *2* — лизат клеток после индукции экспрессии, рекомбинантный белок IalV обозначен звездочкой

Рисунок 3. Электрофоретический анализ полипептидов клеточных лизатов *E. coli*

С целью выбора условий очистки рекомбинантного белка IalV определили его растворимость при экспрессии в клетках *E. coli*. Как видно из рисунка 4, целевой белок накапливается в клетке в растворимой форме.

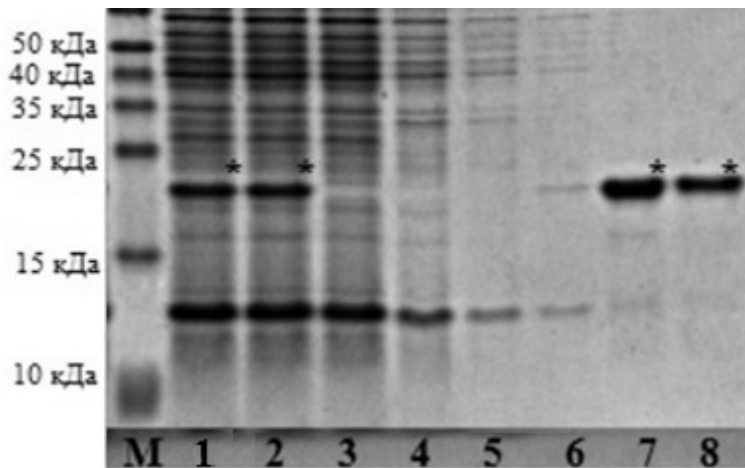


M — маркер молекулярного веса белков; *2* — растворимая фракция белков; *3* — нерастворимая фракция белков (включения)

Рисунок 4. Определение растворимости целевого белка

Металл-аффинная хроматография является высокоспецифичным и надежным методом очистки рекомбинантных белков вследствие относительно высокого сродства и специфичности некоторых металлов к эпитопу, содержащему шесть или более остатков гистидина [13]. При создании генетической конструкции для экспрессии целевого гена в состав нуклеотидной последовательности были включены участки, кодирующие гексагистидиновые таги (рис. 2). Это позволило использовать для очистки целевого белка метод металл-аффинной хроматографии. Очистку белка проводили в нативных условиях.

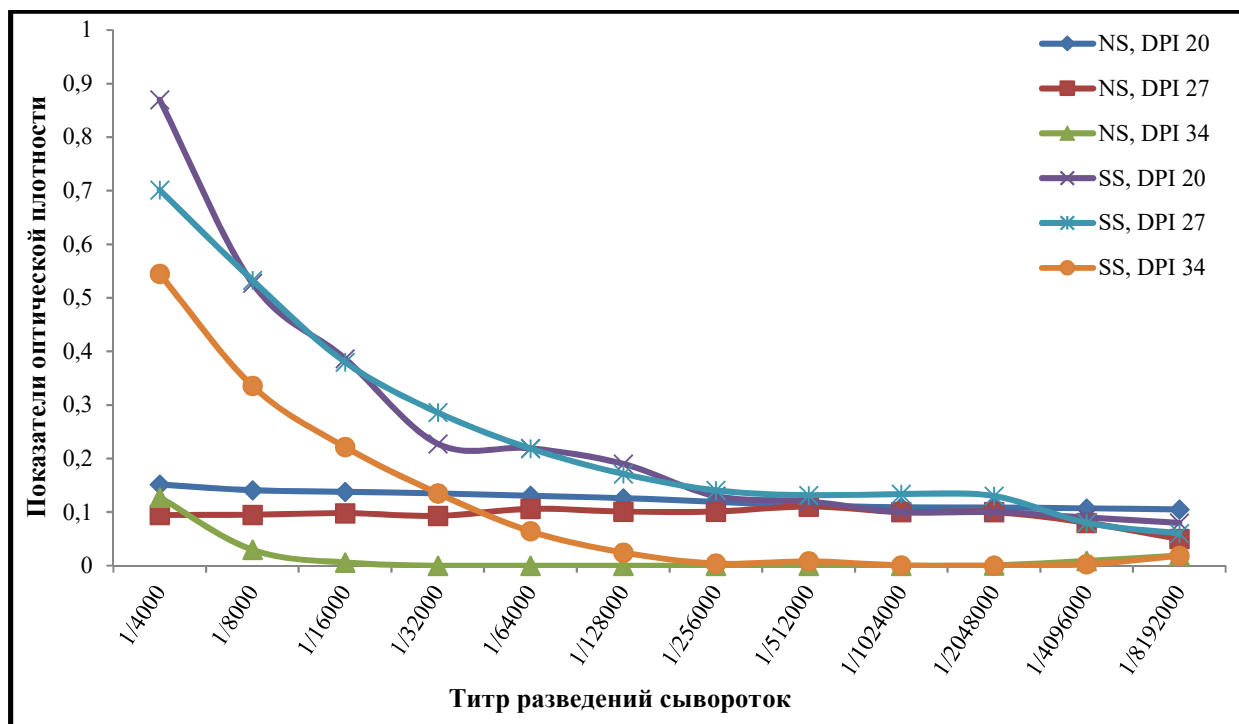
Из рисунка 5 (дорожки 8, 9) видно, что использованный метод очистки позволил получить препараты рекомбинантного белка с чистотой не менее 95 %.



M — маркер молекулярного веса белков; *1* — клеточный лизат; *2* — клеточный лизат после фильтрации; *3* — проскок через колонку; *4–6* — промывки; *7–8* — элюирование белка

Рисунок 5. Электрофоретический анализ белковых фракций в процессе очистки целевого белка IalB

Также нами была проведена оценка способности рекомбинантного белка IalB стимулировать гуморальный иммунный ответ. Для этого мыши были иммунизированы препаратом рекомбинантного белка с адьювантом. Наличие антител к целевому белку определяли в динамике начиная с 20-х суток после первой иммунизации.



NS — нормальная сыворотка; *SS* — специфическая сыворотка; *DPI 20* — 20 суток после иммунизации; *DPI 27* — 27 суток после иммунизации; *DPI 34* — 34 суток после иммунизации

Рисунок 6. Результаты иммуноферментного анализа

В результате было установлено, что рекомбинантный белок IalB вызывает в организме животных выработку специфических антител. Максимальный титр антител в сыворотке крови животных в ИФА отмечен на 20-е сутки с начала иммунизации и составил 1:64 000.

Выводы

В результате проведенных исследований была создана генетическая конструкция для экспрессии белка IalB в клетках *E. coli*. Отработаны оптимальные условия экспрессии и очистки целевого рекомбинантного белка. Степень очистки белка составила не менее 95 %. При иммунизации рекомбинантным белком IalB в организме мышей вырабатываются антитела, детектируемые в иммуноферментном анализе. Полученные рекомбинантный белок IalB и специфическая сыворотка к нему будут использованы при разработке профилактических препаратов против бруцеллеза животных.

Список литературы

- 1 Иванов Н.П. Инфекционные болезни животных / Н.П. Иванов, К.А. Тургенбаев // Общая эпизоотология. — 2013. — № 1. — С. 47.
- 2 Иванов Н.П. Бруцеллез животных и меры борьбы с ним: учеб. пос. / Н.П. Иванов. — Алматы: Атамұра, 2007. — 610 с.
- 3 Ашетов И.К. Мониторинг и анализ эпизоотической ситуации по бруцеллезу КРС в РК за 2007–2012 годы / И.К. Ашетов, А.Е. Ешмухаметов, И.Н. Ашетов. — Алматы, 2012. — С. 79–86.
- 4 Ибрагимов П.Ш. Мониторинг эпизоотической ситуации по особо опасным болезням животных в Республике Казахстан, анализ и ожидаемый прогноз заболеваний за 2007–2012 годы: учеб.пос. / П.Ш. Ибрагимов. — Астана, 2013. — 74 с.
- 5 Еспембетов Б.А. Анализ эпизоотической ситуации по бруцеллезу животных в Казахстане за 2013 год / Б.А. Еспембетов, Н.С. Сырым, Н.Н. Зинина // Вестн. Алтайского гос. ун-та. — 2017. — № 11. — С. 25–29.
- 6 Еспембетов Б.А. Мониторинг и анализ эпизоотической ситуации бруцеллеза животных в Казахстане за 2011–2015 гг. / Б.А. Еспембетов, Н.С. Сырым, Н.Н. Зинина // Вестн. Ульянов. гос. с.-хоз. акад. — 2017. — № 1. — С. 92–96.
- 7 Аракелян П.К. Оптимизация мероприятий при бруцеллезе сельскохозяйственных животных в современных условиях / П.К. Аракелян, С.К. Димов // Ветеринария. — 2013. — № 4. — С. 23–27.
- 8 Саяпина Л.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций / Л.В. Саяпина, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир // Проблемы особо опасных инфекций. — 2016. — № 2. — С. 107–110.
- 9 de Figueiredo P. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions / P. de Figueiredo, T.A. Ficht, A. Rice-Ficht, C.A. Rossetti, L.G. Adams // American Society for Investigative Pathology. — 2015. — No. 185(6). — P. 1505–1517.
- 10 Crasta O.R. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes / O.R. Crasta, O. Folkerts, Z. Fei, S.P. Mane, C. Evans, S. Martino-Catt, B. Bricker, G. Yu, L. Du, B.W. Sobral // PLoS ONE. — 2008. — Vol. 3(5). — P. 21–93.
- 11 Commander N.J. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes / N.J. Commander, S.A. Spencer, B.W. Wren, A.P. MacMillan // Vaccine. — 2007. — P. 43–54.
- 12 Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
- 13 Hochuli E. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent / E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber // Biotechnology. — 1988. — Vol. 6. — P. 1321–1325.

А.У. Исабек, Э.Т. Тайлакова, Г.О. Шыныбекова, В.М. Строчков, О.В. Червякова

***Brucella spp.* IalB ақуызының экспрессиясы және тазалау әдісі**

Соңғы жылдары мал шаруашылығына үлкен зиян келтіретін аса қауіпті жұқпалы аурулардың елеулі таралуы байқалады. Жұқпалы аурулармен күресудің ең маңызды және перспективті тәсілі — иммунды түрде алдын алу. Бруцеллез ауруын алдын алу үшін қазіргі уақытта қолданылатын вакциналар түбегейлі өзгеруді және жақсартуды талап етеді. Қауіпсіз және тиімді алдын алу құралдарды дамытудағы болашақта қажет бағыттардың бірі — *Brucella spp.* антигенді ақуыздарды қолдану. Жұмыстың мақсаты — *Escherichia coli* негізінде бактериалық экспрессия әдісін пайдалана отырып, *Brucella spp.* IalB рекомбинантты ақуызын алу болып табылады. Зерттеулер нәтижесінде инвазивті IalB ақуызын кодтайтын ген *Brucella suis* геномдық ДНҚ-мен амплифицирленіп, кейін бактериялық экспрессияланатын рЕТ28b (+) векторына клондалды. Рекомбинантты ақуызды металл-аффинді хроматография әдісімен тазартудың және *E. coli* жасушасының ER2566 штаммында тұтас генді экспрессиялаудың тиімді жағдайы таңдалып алынды. Ақуызды тазарту дәрежесі кем дегенде 95 % құрады. IalB рекомбинантты ақуызбен иммундау кезінде зертханалық тышқандардың ағзасында иммуноферментті талдауда анықталатын антиденелер пайда болатыны көрсетілді. Алынған рекомбинантты ақуыз малдардың бруцеллезіне қарсы профилактикалық препараттарды әзірлеу үшін қолданылатын болады.

Клт сөздер: рекомбинантты ақуыз, клондау, экспрессия, бруцеллез, антиденелер.

A.U. Isabek, E.T. Tailakova, G.O. Shynybekova, V.M. Stochkov, O.V. Chervyakova

Expression and purification of protein IalB *Brucella* spp.

In recent years, there has been a noticeable spread of highly dangerous infectious diseases that cause great economic damage to livestock. The most important and promising method of combating infectious diseases is immunoprophylaxis. Currently used vaccines for the prevention of brucellosis require their fundamental changes and improvements. One of the promising areas in the development of safe and effective means of prevention is the use of protective antigenic proteins *Brucella* spp. The purpose of this research was to obtain recombinant protein IalB *Brucella* spp. by bacterial expression in *Escherichia coli*. As a result of the research, the gene encoding the invasive IalB protein is amplified from *Brucella suis* genomic DNA and cloned into the bacterial expression vector pET28b (+). The optimal conditions for the expression of the target gene in *E. coli* cells, strain ER2566 and purification of the recombinant protein by metal affinity chromatography were developed. The degree of protein purification was at least 95 %. When immunization with recombinant protein IalB in the body of mice antibodies is produced that is detected in the enzyme immunoassay. The resulting recombinant protein will be used to develop prophylactic drugs against animal brucellosis.

Keywords: recombinant protein; cloning; expression, brucellosis, antibodies.

References

- 1 Ivanov, N.P. (2013). Infektsionnye bolezni zhivotnykh [Infectious animal diseases]. *Obshchaia epizootologiya — General epizootology*, 1, 47 [in Russian].
- 2 Ivanov, N.P. (2007). Brutsellez zhivotnykh i mery borby s nim [Animal brucellosis and control measures]. Almaty: Atamura [in Russian].
- 3 Asetov, I.K. (2012). Monitorinh i analiz epizooticheskoi situatsii po brutsellezu KRS v RK za 2007–2012 hody [Monitoring and analysis of the epizootic situation for cattle brucellosis in Kazakhstan for 2007–2012]. Almaty [in Russian].
- 4 Ibragimov, P.Sh. (2013). Monitorinh epizooticheskoi situatsii po osobo opasnym bolezniam zhivotnykh v Respublike Kazakhstan, analiz i ozhidaemyi prognoz zabolevanii za 2007–2012 hody [Monitoring of the epizootic situation of especially dangerous animal diseases in the Republic of Kazakhstan, analysis and expected disease prognosis for 2007–2012]. Astana [in Russian].
- 5 Espembetov, B.A. (2017). Analiz epizooticheskoi situatsii po brutsellezu zhivotnykh v Kazakhstane za 2013 hod [Analysis of the epizootic situation on animal brucellosis in Kazakhstan for 2013]. *Vestnik Altaiskoho gosudarstvennogo universiteta — Bulletin of the Altai State University*, 11, 25–29 [in Russian].
- 6 Espembetov, B.A. (2017). Monitorinh i analiz epizooticheskoi situatsii brutselleza zhivotnykh v Kazakhstane za 2011–2015 hh. [Monitoring and analysis of the epizootic situation of animal brucellosis in Kazakhstan for 2011–2015]. *Vestnik Uliyanovskoi gosudarstvennoi selskokhoziaistvennoi akademii — Bulletin of the Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 1, 92–96 [in Russian].
- 7 Arakelian, P.K. (2013). Optimizatsiia meropriiatii pri brutselleze selskokhoziaistvennykh zhivotnykh v sovremennykh usloviakh [Optimization of measures for brucellosis of farm animals in modern conditions]. *Veterinariia — Veterinary science*, 4, 23–27 [in Russian].
- 8 Saiapina, L.V. (2016). Sovremennoe sostoianie vaktsinoprofilaktiki osobo opasnykh infektsii [The current state of vaccination of especially dangerous infections]. *Problemy osobo opasnykh infektsii — Problems of especially dangerous infections*, 2, 107–110 [in Russian].
- 9 de Figueiredo, P., Ficht, T.A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C.A., & Adams, L.G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions. *American Society for Investigative Pathology*, 185, 6, 1505–1517.
- 10 Crasta, O.R., Folkerts, O., Fei, Z., Mane, S.P., Evans, C., Martino-Catt, S., Bricker, B., Yu, G., Du L., & Sobral, B.W. (2008). Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. *PLoS ONE*, 3, 5, 21–93.
- 11 Commander, N.J., Spencer, S.A., Wren, B.W., & MacMillan, A.P. (2007). The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. *Vaccine*, 43–54.
- 12 Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage 4. *Nature*, 227, 680–685.
- 13 Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R., Stuber, D. (1988). Vol. 6. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology*, 6, 1321–1325.