

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.6. - С.141-144

## **ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА LipL32 ПАТОГЕННЫХ ЛЕПТОСПИР**

*<sup>1</sup> Каиргелды А.Г.,<sup>1</sup> Боровиков С.Н.,  
<sup>2</sup> Ескендинова С.З.,*

*<sup>2</sup>Национальный центр биотехнологии, г. Астана*

Постановка диагноза при лептоспирозе – сложный и многосторонний процесс. Лептоспиры, в отличие от большинства микроорганизмов других видов, трудно культивируются на питательных средах. Реакция микроагглютинации (РМА) является эталонной, наиболее широко применяемой при серологической диагностике лептоспироза («золотой стандарт»). Однако ее диагностические возможности ограничены проблемами стандартизации и идентичности воспроизводства живых культур актуальных серогрупп лептоспир, используемых в качестве антигена. В этой связи большое значение придается использованию биотехнологических подходов, позволяющих получать рекомбинантные антигены, что является не только экономически выгодным, но и исключает необходимость непосредственного контакта с возбудителями инфекций [1, 2].

Большинство последних зарубежных исследований по совершенствованию серологической диагностики лептоспироза основаны на использовании рекомбинантного антигена LipL32 – липопротеина наружной мембраны лептоспир. LipL32 вырабатывается лептоспирами на всех стадиях развития инфекции и является одним из наиболее узнаваемых иммунной системой, как человека, так и животных специфических антигенов лептоспир. Этот белок является иммунологически доминантным антигеном лептоспир, и антитела к нему формируются практически у всех зараженных лептоспирозом животных, в том числе у лептоспираносителей. Установлено, что антитела к LipL32, обнаруживаемые в сыворотках больных лептоспирозом на всех стадиях течения заболевания, обладают высокой специфичностью и не имеют кросс-реактивности. Первичная структура антигена LipL32, аннотированная в базе данных NCBI (GenBank) чрезвычайно консервативна для всех сероваров и серотипов патогенных лептоспир. Анализ нуклеотидной последовательности LipL32 патогенных лептоспир показал их полную идентичность. LipL32 является высококонсервативным белком для лептоспир из различных

географических регионов мира, что доказано исследованиями референтных сывороток методом иммуноблотинга [3, 4, 5].

Поскольку LipL32 является специфическим антигеном для патогенных *Leptospira*, данный антиген обладает большой диагностической ценностью для использования в разработке иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем на лептоспироз как ветеринарного, так и медицинского применения.

#### Материалы и методы исследования

С целью препаративной наработки рекомбинантного антигена LipL32 в культурах экспрессирующего штамма BL21(DE3), трансформированного экспрессирующей конструкцией *pET28/LipL32*, клетки *E. coli* культивировали на жидкой среде Лурия-Бертани (LB). Для выделения и очистки рекомбинантного белка *LipL32* клетки экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3), трансформированного конструкцией *pET28/LipL32* разрушали ультразвуком (22kHz, 4 раза по 20 секунд). Рекомбинантный антиген очищали на колонке HisTrap («Amersham», США) с использованием хроматографической системы AktaFPLC («Amersham», США).

Электрофорез рекомбинантного антигена проводили в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по методу V. Laemmli et al. (1970) на аппарате для постановки вертикального электрофореза («Bio-Rad», США) [6]. Перенос электрофоретически разделенных белков на нитроцеллюлозную мембрану с последующей иммунной детекцией проводили по методу Towbin P.

Полученные экспериментальные данные. Нарработку культуры экспрессирующего штамма *E. coli* BL21(DE3), трансформированного генетической конструкцией *pET28/LipL32* – продуцента рекомбинантного антигена *LipL32* проводили на жидкой среде Лурия-Бертани (LB). Для выделения и очистки рекомбинантного белка *LipL32* клетки штамма-продуцента разрушали ультразвуком. В экспериментах варьировали концентрацию индуктора экспрессии IPTG (0,1 мМ – 0,5 мМ) и время инкубации культуры с индуктором – 2 ч, 4 ч, 6 ч и в течение ночи. Наибольший выход рекомбинантного белка получен при 0,5 мМ IPTG и инкубации культуры с индуктором в течение 6 часов. Экспериментально обнаружено, что в данных условиях происходит усиленный синтез рекомбинантного белка с молекулярной массой 32 кДа с концентрацией 2,5 мг/мл. Очищенные препараты рекомбинантного антигена LipL32 с молекулярной массой 32 кДа получены с использованием колонки HisTrap хроматографической системы Ni-NTA Agarose. Анализ нативного препарата рекомбинантного антигена *LipL32* патогенных лептоспир электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS показал наличие белковой полосы с молекулярной массой 32 кДа.

Иммунохимическая активность и специфичность рекомбинантного антигена *LipL32* исследована методом иммуноблотинга, обладающего высокой информативностью и достоверностью получаемых результатов. Необходимость выявления специфических антител к рекомбинантному

антигену *LipL32* патогенных лептоспир на фоне многократного избытка неспецифических антител в поликлональной сыворотке требует использования оптимального разведения сыворотки крови для снижения влияния сывороточных белков на результаты иммунной детекции. Так, при разведении сывороток 1:100-1:250 наблюдалась наиболее высокая неспецифическая сорбция балластных белков на поверхности нитроцеллюлозной мембраны. Разведение 1:500 позволило частично исключить негативное влияние неспецифических иммуноглобулинов сыворотки крови. В дальнейшем для иммунной детекции электрофоретически перенесенного рекомбинантного антигена *LipL32* на нитроцеллюлозной мембране использовали рабочее разведение 1:1000, при котором достигнуто полное снижение фонового уровня испытуемых сывороток. В качестве гомологичных позитивных сывороток использовали коммерческие групповые агглютинирующие лептоспирозные кроличьи сыворотки (ФГУП «Армавирская биофабрика», РФ) к 15 серогруппам патогенных лептоспир. В качестве гетерологичных негативных сывороток были использованы кроличьи бруцеллезные моноспецифические сыворотки, а также сыворотки крови здоровых кроликов. Пероксидазную реакцию визуализировали, используя методику усиленной хемилюминесценции. На всех иммуноблотах рекомбинантного антигена *LipL32* со всеми гомологичными лептоспирозными сыворотками к 15 патогенным серогруппам лептоспир четко представлена серопозитивная фракция белка с молекулярной массой 32 кДа. Специфичность детекции рекомбинантного антигена *LipL32* подтверждена отсутствием взаимодействия с сывороткой здорового кролика, а также с гетерологичными моноспецифическими бруцеллезными сыворотками.

Аналитическая чувствительность рекомбинантного антигена *LipL32* определена с использованием вышеупомянутых гомологичных и гетерологичных образцов сывороток крови. Визуализирующая способность иммунного комплекса «антиген-антитело» характеризовалась появлением серо-фиолетовых точек на поверхности полосок нитроцеллюлозной мембраны (5×45 мм) с точечно нанесенным раствором рекомбинантного антигена *LipL32* в двукратном разведении. В случае отрицательного результата носитель оставался бесцветным. Чувствительность антигена *LipL32* с использованием агглютинирующих лептоспирозных кроличьих сывороток к 15 патогенным серогруппам лептоспир составила 6-12 нг/мл. О высокой специфичности системы свидетельствует отсутствие как ложноотрицательных (все точки положительного контроля визуализированы в ходе определения), так и отсутствие ложноположительных (отсутствие связывания с отрицательными контролями) результатов.

Определение чувствительности и специфичности испытуемой тест-системы проводили путем сравнительного анализа результатов тестирования гомологичных коммерческих гипериммунных кроличьих лептоспирозных сыворотках различных серогрупп и гетерологичных образцах сывороток

крови в ИФА и реакции микроагглютинации (РМА), которая является классическим тестом серологической диагностики лептоспироза животных.

Антитела в сыворотке крови всех серопозитивных на лептоспироз животных по результатам РМА, также активно связывались с рекомбинантным антигеном *LipL32* в ИФА, что свидетельствует о высокой диагностической ценности используемого антигена. Высокий уровень специфической активности испытуемых позитивных гомологичных лептоспирозных сывороток подтвержден показателями титров сывороточных антител против рекомбинантного антигена *LipL32* в непрямом ИФА.

Установлено, что значения оптической плотности (ОП) позитивных гомологичных лептоспирозных сывороток в ИФА находятся в прямой зависимости от показателей их титров в РМА. Так, максимально зарегистрированные значения экстинкции – ОП 1,720-1,967 в ИФА отмечены при тестировании серогрупп лептоспирозных сывороток крови с максимальными титрами в РМА – 1:32000-1:64000. При этом фоновая активность гетерологичных образцов сывороток крови (негативных) при использовании рекомбинантного антигена *LipL32* – ОП 0,078-0,084 оказалась в двадцать раз ниже аналогичного показателя ОП, полученного на основе гомологичных сывороток.

Таким образом, полученные при тестировании в ИФА результаты подтверждают высокую специфичность и чувствительность рекомбинантного антигена *LipL32* патогенных лептоспир, что позволяет рекомендовать его использование в диагностике зараженных лептоспирозом животных.

### Список литературы

1. Barata M. da Rocha Leptospirosis: serological, immunological and microbiological studies //Doutor em Veterinárias. - Universidade Vila Real. – 2004. – 234 p.
2. Gupta A., Chand S., Chander V., Nandi S. Leptospirosis-Epidemiology, Pathogenesis and Control //Livestock Line. – 2012. – P. 9-18.
3. Земская М.С. Дифференциация лептоспир различных экологических групп на основе гена, кодирующего липопротеин наружной мембраны *LipL32*: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – Москва, 2009. – 117 с.
4. Pinne M. and Haake D. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies //PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, №1. – P. 38-44.
5. Behera K., Sabrinath T., Chaudhary P., Kumar A. Evaluation of recombinant LipL32 based latex agglutination test for serodiagnosis of porcine leptospirosis //Veterinary World. – 2014. – Vol. 7. – P. 17-21.
6. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 //Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.