

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.175-178

## **НАРАБОТКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА PpiC CAMPYLOBACTER FETUS**

*Аббасова Г.М.,  
Зайдуллина Г. Б., Айтмагамбетова М. С.*

Диагноз на кампилобактериоз, как и при других инфекционных заболеваниях животных, устанавливают на основании клинических, эпизоотологических, патологоанатомических и лабораторных методов исследования. Основное значение в постановке диагноза на кампилобактериоз принадлежит лабораторным анализам. Объектами лабораторного исследования при кампилобактериозе крупного рогатого скота могут являться: у быков – сперма, препуциальная слизь, смывы; у коров - выделения из половых органов, плод, плацента, молоко, лимфатические узлы тазовой полости, фекалии, желчь; у телят – кровь в период диареи, а также фекалии, желчь, желудок, кишечник. Доставленный в лабораторию патологический материал подвергается различным методам исследования по определенному плану, включающему микроскопию нативных мазков, бактериологическое и биохимическое исследования, постановку биопробы, серологические исследования и идентификацию возбудителя.

Серологическую диагностику проводят путем постановки классических реакций: РА, РСК (РДСК) и методом флуоресцирующих антител. У крупного рогатого скота обычно РА ставят с влажной слизью (РАВС), у овец - с сывороткой крови. Для постановки РА необходимы: агглютинирующие моноспецифические сыворотки, нормальная сыворотка, исследуемая суспензия (антиген), стандартный антиген [1]. Кроме того, используются современные тесты, такие как иммуноферментный анализ и иммунохроматографический анализ [2, 3].

В настоящее время для диагностики инфекционных заболеваний широко используют рекомбинантные антигены, которые получают молекулярно-генетическими методами. Полученный штамм-продуцент может длительное время синтезировать стандартный по всем параметрам антиген, который можно использовать в различных иммунологических реакциях для диагностики того или иного заболевания [4].

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали нуклеотидную последовательность ДНК, кодирующую иммуногенный белок PpiC *Campylobacter fetus*, синтезированную в лаборатории прикладной генетики Национального центра биотехнологии Республики Казахстан.

Трансформация плазмидной ДНК в компетентные клетки *E. coli*. В пробирку объемом 1,5 мл вносили 50 мкл клеток *E. coli* BL-21 и добавляли плазмидный вектор в количестве 3 мкл, ставили на лед и культивировали 30 мин. Затем пробирку вновь переносили на водяную баню (42 °С) для теплового шока клеток, в течение 50 сек. Далее пробирки вновь переносили на лед и инкубировали 3 мин. После этого в каждую из пробирок добавляли по 950 мкл среды LB и инкубировали в течение 1 ч при 37°С. Центрифугировали пробирки с клетками при 1 000 об/мин и отбирали по 900 мкл супернатанта из каждой. Осадок ресуспендировали в 100 мкл оставшейся среды и переносили полученный объем трансформированных компетентных клеток в чашки Петри с LB агаром, содержащие селективный антибиотик. Осадок клеток равномерно распределяли по поверхности агара с помощью микробиологических шариков. Чашки Петри инкубировали при температуре 37°С в течение 14-16 ч.

Культивирование штаммов-продуцентов. К 100 мл приготовленной LB среды добавляли 100 мкл соответствующего антибиотика и 2 мл инокулята, культивировали в термостате на мешалке в течение 3 часов. По истечении этого времени колбу с клетками бактерий ставили на 10 минут в лед для охлаждения, после того, как среда немного остынет, добавляли реагент IPTG (ускоряет процесс экспрессии рекомбинантного продукта) и продолжали культивировать колбы при постоянном перемешивании в течение 28 часов при 25°С.

Отработка оптимальных параметров культивирования. В качестве индуктора при отработке оптимальных параметров культивирования *E.coli* использовали 1М IPTG в объеме 100 мкл на 250 мл культуральной среды. При определении оптимальной температуры для экспрессии нарабатываемого белка, культивирование проводили при 20, 25, 30 и 37°С. При определении времени оптимального для экспрессии антигена, клеточную суспензию отбирали через 24, 28, 32, 36 и 40 часов. По истечении данного времени колбы вынимали из термостата, отбирали 1 мл среды с клетками в центрифужные пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировали 3 мин. при 3тыс. об/мин. Супернатант отбирали, клетки хранили при -20°С. Оставшуюся массу клеток разливают в пробирки по 50 мл и центрифугируют 10 мин. при 5 тыс. об/мин. Супернатант отбирают, клетки хранят при -70°С.

Наработка рекомбинантного антигена PpiC *Campylobacter fetus*. Дальнейший этап включал отработку основных параметров культивирования трансформированных клеток. Для этого нами выбраны два основных режима культивирования бактериальной массы – температура и время. В начале эксперимента получали необходимое количество инокулята путем инокулирования посевным материалом питательной среды в объеме 2 мл. Для культивирования определялась температура и различные временные отрезки, при которых учитывали максимальный выход рекомбинантного продукта. Так индукцию проводили при температурных режимах – 15°С, 25°С, 30°С, и 37°С. А временные отрезки при культивировании клеточных культур составляло 24, 28, 32, 36 и 40 часов. В качестве индуктора

экспрессии использовали *IPTG*. При индукции *IPTG* происходит эффективный биосинтез рекомбинантного белка, который накапливается в клетках, как в растворимой форме, так и в виде телец включения.

ИФА проводили по следующей схеме: полученный антиген, в концентрации 10 мкг/мл, адсорбировали в ячейках планшета для иммунологических реакций в объеме 0,1 мл, выдерживали 8ч при 4°C. Блокировали свободные участки носителя путем внесения 0,1 мл 5% раствора обезжиренного сухого молока и инкубировали планшет 1 час при 37°C. Ячейки планшета отмывали 3 раза забуференным физиологическим раствором (ЗФР) с 0,05% содержанием твин-20 и 3 раза ЗФР. В ячейки вносили образцы положительной и отрицательной сывороток, проводили титрование на два ряда планшета, начиная с 1:100 и выдерживали 1 час при 37°C. Планшет отмывали, а затем вносили раствор специфического конъюгата в разведении 1:10000 и инкубировали 1 час при 37°C.

Основные результаты. На первом этапе проведена работа по изучению оптимальной температуры культивирования бактериальной массы. Первый температурный показатель, который был отработан – это температура 15°C. Бактериальные клетки штаммов-продуцентов культивировали в колбах, содержащих 100 мл питательной среды *LB* на шейкере (150 об/мин) при 37°C. Спустя 3 часа осуществляли индукцию синтеза целевого белка путем внесения *IPTG* и продолжали культивирование с учетом необходимого времени. По прошествии времени культивирования колбы с клетками вынимали из термостата и отделяли бактерии от культуральной среды путем центрифугирования. Проводили сбор бактериального осадка, супернатант утилизировали, предварительно обезвредив соответствующим дезинфицирующим раствором. Осадок бактериальных клеток освобождали от остаточного количества питательной среды и лизировали с помощью лизирующего буфера. Полученную гомогенную смесь разделяли центрифугированием на растворимую и не растворимую фракцию. Полученный супернатант, содержащий рекомбинантный продукт, анализировали денатурирующим электрофорезом и иммуноблотингом по вышеуказанной методике.

Проявление изучаемого рекомбинантного продукта проводили путем использования специфических сывороток. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что оптимальным временем культивирования бактериальных клеток при температуре 15°C является продолжительность 28 часов. При данном температурном режиме мы наблюдаем максимальный выход рекомбинантного продукта, но концентрация получаемого продукта при этом температурном режиме является очень низкой, о чем говорит очень низкий уровень сигнала положительной реакции на мембране.

Следующий температурный режим, который был взят в качестве испытуемого – это 25°C. Временные отрезки при культивировании клеточных культур, как и в предыдущем варианте, составляли 24, 28, 32, 36 и 40 часов. В качестве индуктора экспрессии использовали *IPTG*. Выделение изучаемого белка проводили по вышеуказанной методике с помощью

лизирующего буфера. Образцы анализировали с помощью электрофореза и иммуноблотинга, детектировали антиген с помощью специфических сывороток. При культивировании бактериальных клеток в температурном режиме 25°C, три временных отрезка (24, 28, и 32 часа) показали одинаковый выход рекомбинантного белка. В ходе данного эксперимента, было установлено, что при данном температурном режиме наиболее оптимальным является продолжительность культивирования 24 ч, это объясняется тем, что данный временной отрезок позволяет получать максимальное количество рекомбинантного продукта при минимальных затратах времени, электроэнергии и эксплуатации оборудования. К тому же, при культивировании бактериальной массы в течение более 32 часов происходит деградация изучаемого белка и прекращение экспрессии рекомбинантного продукта.

Следующим этапом работы было проведение аналогичного предыдущим экспериментам опыта, время культивирования штаммов *E.coli* составляло 30°C. Для выхода целевого белка, проводили лизирование клеток при помощи лизирующего буфера. Для разделения белков проводили постановку электрофореза по вышеописанной методике. В результате выяснили, что оптимальным временем культивирования трансформированных штаммов *E.coli* для получения рекомбинантного белка при 30°C является 32 часа. На начальных временных отрезках экспрессия рекомбинантного антигена не наблюдается. При культивировании более 32 часов происходит спад в экспрессии искомого белка. Таким образом, при данном температурном режиме культивирование в течение 32 часов является наиболее оптимальным временным отрезком.

Следующий температурный режим, который был нами изучен это 37°C. Временные отрезки культивирования бактериальных клеток так же, как и в предыдущих экспериментах составили 24, 28, 32, 36, и 40 часов. При культивировании бактериальных клеток при температуре 37°C, концентрация экспрессируемого белка находится на очень низком уровне и детектирование его практически не возможно. Поэтому можно сделать вывод, что данный температурный режим не подходит для культивирования бактериальных клеток с целью получения рекомбинантного белка.

Проанализировав выход рекомбинантного белка при всех изучаемых температурных режимах и временных отрезках, можно сделать вывод, что наиболее высокие концентрации антигена образуются при культивировании бактериальных клеток в течение 24 часов при 25°C, скорость перемешивания 120 rpm, концентрация *IPTG* – 0,001M.

Для анализа антигенности рекомбинантных белков провели постановку непрямого варианта ИФА с использованием специфических сывороток. В качестве позитивного контроля брали положительную сыворотку, а отрицательного контроля – сыворотку здорового животного. Результаты ИФА оценивали с помощью фотометра «Expert 96» (Австрия) при длине волны 450 нм. Положительная реакция характеризовалась окрашиванием жидкости (раствора субстрата) после внесения стоп-реагента.

Полученный результат показывает, что использование рекомбинантных антигенов позволяет выявлять специфические антитела при разведении сыворотки 1:12800 с оптической плотностью 1,2 ОЕ. При использовании негативной сыворотки получен отрицательный результат. Эти данные позволяют сделать вывод, что полученные нами рекомбинантные антигены обладают высокой антигенностью и могут быть использованы для детекции специфических антител.

Таким образом, полученная генетическая конструкция может служить стабильным источником получения рекомбинантного антигена *PpiC Campylobacter fetus*, который в свою очередь обладает высокой активностью и специфичностью и может быть востребован при разработке диагностических препаратов против данного заболевания.

### Список литературы

1. Инструкция по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза. – М., 1989. – С. 40-51.
2. Gürtürk K, Ekin IH, Aksakal A, Solmaz H. Detection of Campylobacter antibodies in sheep sera by a Dot-ELISA using acid extracts from c. fetus ssp. fetus and c. jejuni strains and comparison with a complement fixation test // J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. – 2002. – Vol. 49 (3). – P. 146-151.
3. Zhao H, Liu H, Du Y, Liu S, Ni H, Wang Y, Wang C, Si W, Yang J, Ling J. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against Campylobacter fetus in cattle. // Res Vet Sci. – 2010. – Vol. 88 (3). – P. 446-451.
4. Longbottom D, Fairley S, Chapman S, Psarrou E, Vretou E, Livingstone M. Serological Diagnosis of Ovine Enzootic Abortion by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Recombinant Protein Fragment of the Polymorphic Outer Membrane Protein POMP90 of *Chlamydophila abortus*. /Journal of clinical microbiology, Nov. 2002, p. 4235–4243 Vol. 40, No. 11.

Научный руководитель: к.б.н., доцент Боровиков С.Н.