

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.178-180

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА OMP19 BRUCELLA ABORTUS

Каирова Ж.К., Торемурат Ж.М.

Бруцеллез - зоонозная, хронически протекающая инфекционная болезнь сельскохозяйственных животных, характеризуется массовыми абортами, задержкой последов, уменьшением продуктивности животных. Бруцеллез представляет собой мировую проблему, как для здравоохранения, так и для сельского хозяйства [1]. Болезнь регистрируется во многих странах мира, и среди стран СНГ Казахстан занимает второе место после Киргизии по заболеваемости людей бруцеллезом. Своевременная диагностика позволяет снизить численность больных животных бруцеллезом [2].

Особенности клинического течения бруцеллеза, тенденции к хронизации процесса, его полиморганотропность и сменяемость поражения, обуславливающих полиморфизм клинических проявлений, осложняет своевременную диагностику и дифференциацию его форм. В связи с этим, возникает необходимость в развитии и совершенствовании методов диагностики данного заболевания. В настоящее время для диагностики бруцеллеза используются классические серологические тесты как РСК, РА, РБП, а также в последнее время применяется твердофазный ИФА-тест [3].

Для достижения точных результатов во время постановки ИФА-теста необходимо изучить вопрос о возможности использования рекомбинантных белков в качестве антигенов, так как, липополисахариды (ЛПС) проявляют ложноположительные реакции. В связи с этим эффективнее использовать рекомбинантные белки внешней мембраны (БВМ) для диагностики бруцеллеза. БВМ определяют не только родовую, но и видовую специфичность бруцелл [4-8].

Целью настоящей работы явилось получение рекомбинантного белка Omp19 *Brucella abortus* для использования в серологической диагностике бруцеллеза.

Последовательность, для амплификации Omp19 брали с базы данных GenBank NCBI. В качестве матрицы использовали геномную ДНК *B. abortus*. Ген, кодирующий Omp19 *B. abortus* амплифицировали с помощью двух раундов ПЦР с использованием полимеразы Phusion (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). В первом раунде использовали следующие праймеры: 5'-TGAGAAATGCGCAAATGGAGAA-3' и

5'-TGCGCATCTGCCGAAATCAT-3'. Во втором раунде ПЦР использовали праймеры: 5'-CCATGGGAATTTCAAAAGCAAGTCT-3' (*NcoI*) и

5'-CTCGAGTCAGCGCGACAGCGTCA-3' (*XhoI*). Матрицей во втором раунде служил ПЦР продукт первого раунда. Температура отжига праймеров в первом раунде - 55°C, во втором - 60°C. ПЦР продукт анализировали в 1% агарозном геле на камере для горизонтального электрофореза. Полученный продукт с ожидаемым размером около 550 пар оснований вырезали из геля и

выделяли с помощью набора Gel Extraction Kit (Invitrogen, Карлсбад, США), в соответствии с наставлениями производителя. Далее с помощью Tag полимеразы (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) проводили аденилирование ДНК и лигирование в pGEM-T вектор. Лигазной смесью трансформировали хемокомпетентные клетки *E. coli* DH5 α . Секвенирование клонированного продукта ПЦР осуществляли на автоматическом анализаторе ДНК ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США) с использованием набора BigDye 3.1.

Таким образом, в результате проведенной работы была получена последовательность ДНК, кодирующая ген *Omp19* *B. abortus*.

Далее полученный ген будет клонирован в экспрессионный вектор pET32a и трансформирован в клетки *E. coli* BL21(DE3) [9]. Будут отработаны оптимальные условия экспрессии рекомбинантного белка. Очистка *Omp19* будет осуществляться методом металл-афинной хроматографии с использованием колонок HisTrap Columns (GE Healthcare Life Sciences, Кардифф, Великобритания), основанной на связывании никеля с гистидином.

После получения рекомбинантного белка будут проведены работы по определению его диагностической ценности в серологической диагностике бруцеллеза животных.

Список литературы

1. Б. Толысбаев, А.Булашев, Қ.Бияшев, Н.Шоқанов. Мал дәрігерлік микробиология. – Алматы: «Алатау», 1992. – Б.247-254.
2. Иванов Н.И. Бруцеллез // Ж.АгроЭлем. – 2010. – №2(7). – С.40-47.
3. Плотникова Э.М., Салмаков К.М., Иванов А.В. Иммуномониторинг бруцеллеза животных // Ж.Ветеринария (РФ). – 2010. – №5. – С.26-30.
4. Aitbay K.Bulashev, Zhanbolat A.Suranshiev, Aibek Kh.Zhumalin, Kanat A.Tursunov. Evaluation of brucella antigens in serological diagnosis of brucellosis. International Journal of Advances in Science Engineering and Technology, ISSN: 2321-9009, Vol-4, Iss-3, Spl. Issue-1 Aug.-2016.
5. Moriyon, I., and I. Lopez-Goni. 1998. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Int. Microbiol. 1:19-26.
6. Hannah Leah Tadeja Simborio, Jin Ju Lee, Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Huynh Tan Hop, Lauren Togonon Arayan, Wongi Min, Hu Jang Lee, Han Sang Yoo, Suk Kim. 2015. Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis. Microbial Pathogenesis. 83-84, P. 41-46.
7. Belzer C.A., Tabatabai L.B., Deyoe B.L. Differentiation by Westen blotting of immune responses of cattle vaccinated with *Brucella* strain 19 or infected experimentally or naturally with virulen *Brucella abortus*. // Vet.Microbiol. – 1991. – Vol.27, – P.79-90.
8. Anne Tibor, Be'atrice Decelle, and Jean-Jacques Letesson. Outer Membrane Proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. Are Lipoproteins. Infection and Immunity, Sept. 1999, p. 4960–4962. Vol. 67, No. 9.
9. Farahi, F., Asli, E., Mobarez, AM.,Khoramabadi, N., Bakhtiari, A. 2012. ecombinant *Brucella abortus* outer membrane protein 19 (rOmp19) significantly stimulates splenic lymphocytes of immunized BALB/c mice. Vol. 6, p.4128-4131.