

УДК 616–002.5+577.27

РЕКОМБІНАНТНИЙ ХИМЕРНИЙ ПРОТЕЇН MPV63–MPV83 — ПЕРСПЕКТИВНИЙ АНТИГЕН ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Т. А. Редчук
Н. В. Короткевич
А. А. Кабернюк
О. С. Олійник
А. Ю. Лабинцев
С. І. Романюк
Д. В. Колибо
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: rtakyiv@gmail.com

MPV63 і MPV83 — потенційно важливі для серологічної діагностики туберкульозу протеїни *Mycobacterium bovis*, що заслуговують на особливу увагу завдяки своїм імунобіологічним властивостям. Шляхом об'єднання послідовностей генів *mpb63* та *mpb83* *M. bovis* отримано експресійний вектор та відповідний химерний протеїн MPV63–MPV83, який може бути очищений за допомогою металоафінної хроматографії.

Дослідження антигенних властивостей одержаного рекомбінантного протеїну в експериментах з використанням сироваток кролів, імунізованих антигенами MPV63 і MPV83, показали не лише відповідність антигенної структури злитого протеїну та його складових, а й можливість досягти вищого рівня сигналу в ІЕА з використанням химерної конструкції, ймовірно, завдяки кращим сорбційним властивостям.

Нами також було визначено рівень антитіл проти злитого протеїну MPV63–MPV83 в сироватках крові умовно здорових, імунізованих вакциною БЦЖ, експериментально заражених різними видами мікобактерій (*M. bovis*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*) та хворих на лейкоз корів. Результати цих експериментів свідчать, що високий рівень антитіл проти злитого протеїну MPV63–MPV83 спостерігався лише у тварин, заражених *M. bovis*. Отже, одержаний нами генетично злитий протеїн MPV63–MPV83 в перспективі може бути використаний при розробленні імуноензимних тест-систем для діагностики туберкульозу великої рогатої худоби.

Ключові слова: рекомбінантний злитий протеїн, MPV83, MPV63, *Mycobacterium bovis*, антигенні властивості, імунодіагностика, туберкульоз, велика рогата худоба.

Бактерії роду *Mycobacterium* здатні інфікувати надзвичайно широкий спектр організмів. Туберкульоз великої рогатої худоби (ВРХ) є захворюванням, що має велике поширення у світі. Геном *M. bovis* — збудника туберкульозу ВРХ значною мірою подібний до генома збудника туберкульозу людини — *M. tuberculosis* [1, 2]. Туберкульоз ВРХ, як і туберкульоз людини, частіше трапляється в країнах, що розвиваються, хоча завдає відчутної шкоди і в розвинених країнах [3–5]. Окрім того, що туберкульоз ВРХ призводить до значних економічних збитків, він також становить загрозу для здоров'я людей, оскільки існує ймовірність передачі інфекції від тварини до людини [6–8].

Головним способом діагностики туберкульозу ВРХ у ветеринарній практиці є туберкулінова шкірна проба. Але на сьогодні цей тест не дає змоги однозначно визначити інфіковане поголів'я, оскільки використання туберкуліну часто призводить до виявлення неспецифічних перехресних реакцій, зумовлених контактом із сапрофітними видами мікобактерій або вакциною БЦЖ [9, 10].

Підвищення специфічності діагностики туберкульозу ВРХ потребує застосування принципово нових діагностичних підходів, одним з яких є використання коктейлів високоспецифічних рекомбінантних протеїнів як компонентів препаратів для шкірної проби або серодіагностичних тест-систем [9].

Однак збільшення кількості компонентів діагностикуму автоматично підвищує його вартість, що є небажаним. Тому метою нашої роботи було отримати генетично злитий протеїн МРВ63–МРВ83, що складається з послідовностей двох діагностично важливих антигенів — *M. bovis* МРВ63 та МРВ83, одержаних нами раніше [11], і дослідити його антигенні властивості, а також можливість використання у складі імуноензимних тест-систем для діагностики туберкульозу ВРХ.

Матеріали і методи

Злитий ген *trpb63–trpb83* було отримано за допомогою процедури SOE–ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції зі з'єднанням через кінці, що перекриваються), описаної нижче. Плазміди, що містять фрагменти *trpb63* і *trpb83*, сконструювали на основі вектора для експресії рЕТ24а (Merck, Німеччина). Рекombінантний протеїн експресували в клітинах *E. coli* Rosetta (DE3). Злитий протеїн було виділено за допомогою металоафінної хроматографії. Для дослідження антигенних властивостей злитого протеїну застосовано метод непрямого імуноензимного аналізу та сироватки кролів, імунізованих за класичною схемою [12].

У роботі також використано сироватки крові ВРХ від 91 тварини, а саме: 29 — від молодих тварин; 19 — від дорослих тварин з умовно благополучного щодо туберкульозу стада; 27 — від експериментально заражених різними видами мікобактерій та імунізованих вакциною БЦЖ тварин; 27 — від тварин зі стада, неблагополучного щодо лейкозу (остання група досліджена з метою виключення можливості рестрації перехресних реакцій). Зразки сироваток для аналізу були люб'язно надані академіком НААН України В. О. Бусолом (Національний університет біоресурсів і природокористування України) та член-кор. НААН України А. І. Завгороднім (Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»).

Об'єднання ДНК-послідовностей методом SOE–ПЛР. Послідовності генів *trpb83* та *trpb63* ампліфікували згідно з описаною раніше схемою ПЛР, використовуючи як матрицю одержані нами рекombінантні конструкції [11]. Для отримання конструкції, що містила злитий ген *trpb83–trpb63*, застосовували процедуру SOE–ПЛР. Необхідне для процедури подовження ампліфікованих

фрагментів *trpb83* та *trpb63* проводили, використовуючи подовжені праймери з такими послідовностями: 5' АТС АТТ GTG GTG AGC TTC АТС TGT GCC GGT GGC АТС АГТ ACC 3' — для подовження фрагмента *trpb83* та 5' GGT АСТ GAT GCC ACC GGC АСА GAT GAA GCT САС САС ААТ GAT 3' — для подовження фрагмента *trpb63*. Щоб об'єднати отримані продукти, проводили 5 циклів ПЛР, які склалися з таких етапів: денатурації (15 с за температури 95 °С), відпалювання (3 хв за температури 55 °С), елонгації (40 с за температури 72 °С).

Після об'єднання додавали праймери 5' GGA TCC GAC ACC CTC AAC GGC GGC GAG 3' та 5' TCA GCT CGA GCG GCT CCC AAA TCA GCA GAT 3' і виконували 10 циклів ампліфікації одержаного об'єднаного продукту в такому температурному режимі: 94 °С — 30 с; 52 °С — 45 с; 72 °С — 45 с. Отриманий об'єднаний ген клоновано у векторі для експресії рЕТ24а+.

Виділення злитого протеїну. Культуру трансформованих клітин підрощували до OD 0,4–0,6, індукували експресію протеїну додаванням ізопропіл-D-тіогалактопіранозиду (IPTG) (Sigma-Aldrich, США) до кінцевої концентрації 1 мМ, а потім інкубували протягом 3 год за умов інтенсивної аерації та температури 30 °С.

Рекombінантний протеїн виділяли за допомогою одностадійної металоафінної хроматографії на колонках Ni-NTA superflow (Qiagen, Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника.

Імуноензимний аналіз (ІЕА). Антитіла проти антигенів мікобактерій виявляли за допомогою непрямого ІЕА. На кожному етапі всі розчини вносили в об'ємі 100 мкл на лунку та інкубували протягом 1 год при 37 °С, після чого тричі промивали лунки дистильованою водою. На першому етапі в 96-лункові плоскодонні планшети вносили розчин антигену (5 мкг/мл) у фосфатному буферному розчині (PBS). Після промивання додавали 1% -й розчин сухого знежиреного молока в PBS. Далі вносили розчини сироваток, розведені 1 до 800 (сироватки кролів) або 1 до 200 (сироватки корів) у твін-фосфатному буфері (ТФБ). Антитіла до антигенів *M. bovis* проявляли за допомогою кон'югата антитіл кози проти імуноглобулінів корови з пероксидазою (Sigma-Aldrich, США) у ТФБ. Потім у лунки планшета додавали розчин ортофенілєндіаміну 0,5 мг/мл, що містив 0,013% пероксиду водню.

Реакцію зупиняли, вносячи через 15 хв 2 М розчин сірчаної кислоти по 50 мкл у лунку.

Далі проводили вимірювання оптичної густини за довжини хвилі 490 нм.

Результати та обговорення

Першим етапом отримання химерного протеїну був синтез відповідної ДНК, що містила послідовності генів *trb63* та *trb83*. Для синтезу такої ДНК спочатку було підібрано олігонуклеотидні праймери, що містили фрагменти послідовностей обох генів, і за допомогою стандартної процедури ПЛР отримали подовжені послідовності генів *trb63* та *trb83*, які перекривалися. Ці продукти об'єднали у послідовність розміром 811 п.н. за допомогою методу SOE-ПЛР.

Описані в літературі протоколи ампліфікації після об'єднання ДНК-фрагментів найчастіше передбачають 15–25 циклів синтезу (приклад розглянуто у [13]). Однак з використанням зазначеної схеми отриманий нами зразок був сильно забруднений неспецифічними продуктами ампліфікації (рис. 1, А).

Найчастіше для зменшення кількості неспецифічних продуктів ампліфікації підбирають оптимальну концентрацію іонів Mg^{2+} , але в нашому випадку варіювання концентрації іонів Mg^{2+} у межах від 1,5 до 2,5 мМ не впливало на кількість неспецифічного продукту (рис. 1, В).

Подальші дослідження виявили пряму залежність кількості неспецифічно синтезо-

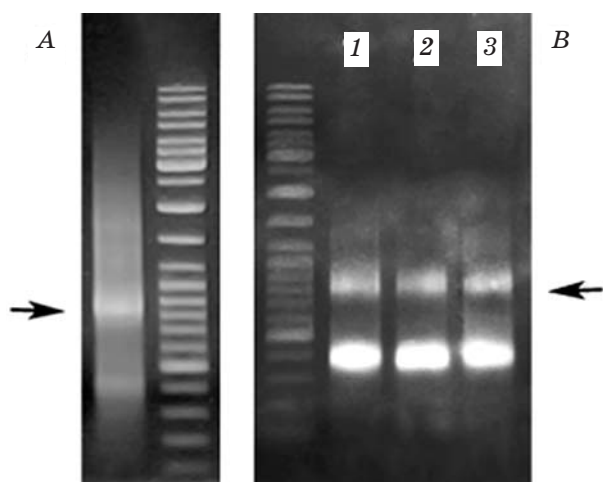


Рис. 1. Результати об'єднання фрагментів *trb63* та *trb83* шляхом SOE-ПЛР з використанням 25 циклів синтезу (А) та різної концентрації іонів Mg^{2+} (В).

Стрілками вказано положення цільового продукту, а цифрами позначено концентрацію іонів Mg^{2+} : 1 — 1,5 мМ; 2 — 2,0 мМ; 3 — 2,5 мМ

ваних продуктів від кількості ПЛР-циклів у процедурі ампліфікації фрагмента після злиття (рис. 2, В). З електрофореграми видно, що за однакової кількості нанесеного матеріалу у пробах 2 і 3 (18 та 25 циклів ампліфікації відповідно) значно менша кількість неспецифічних продуктів міститься у пробі 2. Імовірно, що зі збільшенням кількості циклів ампліфікації відбувається накопичення неспецифічних продуктів. Тому використання в подальших експериментах 10 циклів ПЛР для ампліфікації дало змогу істотно зменшити забруднення зразка неспецифічними продуктами (рис. 2, А).

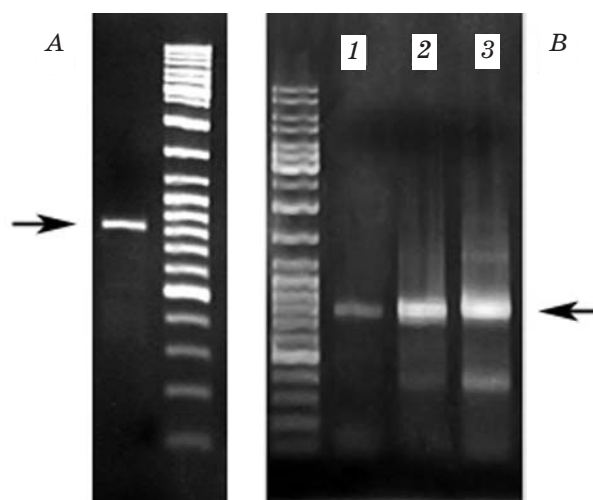


Рис. 2. Результати об'єднання фрагментів *trb63* та *trb83* шляхом SOE-ПЛР з використанням різної кількості циклів синтезу:

А, В1 — 10 циклів; В2 — 18 циклів; В3 — 25 циклів. Стрілками вказано положення цільового продукту

Отриманий завдяки методу SOE-ПЛР фрагмент ДНК клонували у векторі для експресії рЕТ24(a)+ (Novagen, Німеччина). Після експресії одержаної конструкції застосовували стандартну процедуру виділення з наступним одностадійним очищенням за допомогою металоафінної хроматографії та діалізом проти PBS. Молекулярну масу досліджуваного за допомогою електрофорезу продукту розраховували за допомогою програми TotalLab (Nonlinear Dynamics Ltd, США). Визначена молекулярна маса (33,55 кДа) виявилася близькою до очікуваної (30,97 кДа) (рис. 3).

На наступному етапі роботи за допомогою ІЕА досліджували антигенні властивості отриманого злитого протеїну й оцінювали перспективи його використання для діагностики туберкульозу ВРХ.

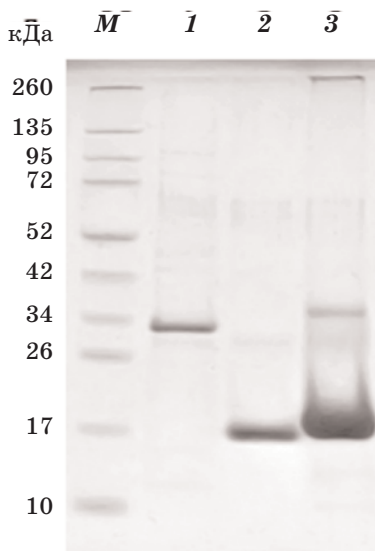


Рис. 3. Електрофореграма зразків МРВ63 (2), МРВ83 (3) та злитого протеїну МРВ63–МРВ83 (1). М — маркери молекулярної маси

Насамперед для перевірки відповідності між антигенними властивостями одержаного злитого протеїну МРВ63–МРВ83 та його складовими МРВ63 і МРВ83 визначали здатність злитого протеїну МРВ63–МРВ83 взаємодіяти із сироватками кролів, імунізованих МРВ63 або МРВ83. Результати цих експериментів подано на рис. 4.

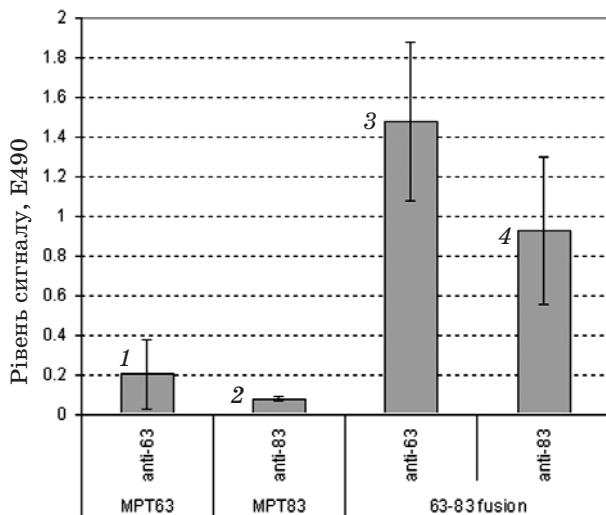


Рис. 4. Результати розпізнавання рекомбінантних антигенів МРВ63 (1), МРВ83 (2), МРВ63–МРВ83 (3, 4) сироватками кролів, імунізованих рекомбінантним антигеном МРВ63 (1, 3) або МРВ83 (2, 4).

На стовпцях показано стандартне відхилення для кожної сироватки. 63–83 fusion — злитий протеїн МРВ63–МРВ83

Наведені дані свідчать про те, що злитий протеїн МРВ63–МРВ83 здатен взаємодіяти як із сироватками кролів, імунізованих МРВ63, так і з сироватками кролів, імунізованих МРВ83. Це означає, що антигенна структура складових рекомбінантного протеїну МРВ63–МРВ83 не порушилась у результаті злиття. А відповідність між антигенними властивостями рекомбінантних і природних протеїнів МРВ63 та МРВ83 було продемонстровано нами раніше. Отже, отриманий злитий протеїн за своєю антигенною структурою є аналогом природних протеїнів МРВ63 та МРВ83 *M. bovis* і теоретично може бути використаний під час створення тест-систем для діагностики туберкульозу ВРХ.

Крім того, виявилось, що сигнал в ІЕА для злитого протеїну МРВ63–МРВ83 більш ніж удвічі перевищував сигнал для окремих рекомбінантних антигенів МРВ63 та МРВ83. Відомо, що ефективність фізичної сорбції протеїнових молекул на твердому носіїві (у даному разі — лунки полістирольного планшета) залежить від низки параметрів, у тому числі від молекулярної маси протеїну [14]. Значно вищий сигнал при розпізнаванні поліклональними антитілами злитого протеїну, очевидно, зумовлений його більшою молекулярною масою, а отже, й кращими сорбційними властивостями порівняно з окремими рекомбінантними антигенами.

Таким чином, використання в тест-системах злитого антигену МРВ63–МРВ83 дозволяє не лише зменшити собівартість отримання діагностичних антигенів у процесі виробництва тест-систем, але й забезпечує вищий сигнал в ІЕА, що може бути важливим для досягнення високих показників чутливості імунодіагностики туберкульозу ВРХ.

На наступному етапі нами проведено дослідження рівня антитіл проти злитого протеїну МРВ63–МРВ83 в сироватках крові корів. Для цього за допомогою ІЕА визначили рівні антитіл проти злитого протеїну МРВ63–МРВ83 в сироватках крові чотирьох груп: молоді тварини; дорослі тварини з умовно благополучного щодо туберкульозу стада; експериментально заражені різними видами мікобактерій (*M. bovis*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*) або імунізовані вакциною БЦЖ тварини; тварини зі стада, неблагополучного щодо лейкозу.

Отримані результати наведено на рис. 5, з якого видно, що рівень антитіл до злитого протеїну у групах 1, 2, 4 був низьким, за поодинокими винятками. Рівень антитіл до

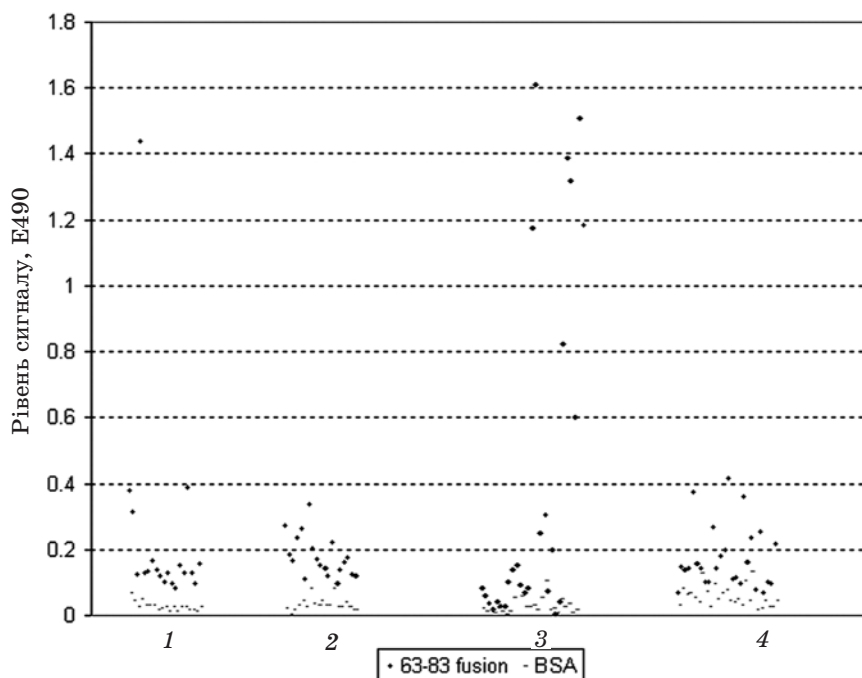


Рис. 5. Рівні антитіл до злитого протеїну МРВ63–МРВ83 в сироватках крові ВРХ з різних груп:
 1 — молодняк ВРХ;
 2 — дорослі тварини з умовно благополучного щодо туберкульозу стада;
 3 — експериментально заражені різними видами мікобактерій або імунізовані вакциною БЦЖ тварини;
 4 — тварини зі стада, неблагополучного щодо лейкозу.
 63–83 fusion — злитий протеїн МРВ63–МРВ83. Кожна точка на діаграмі відповідає одному зразку сироватки

контрольного антигену (BSA — сироваткового альбуміну бика) у всіх випадках був близький до нуля.

Оскільки в групу 3 увійшли тварини, експериментально заражені кількома видами *Mycobacterium* — *M. bovis*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, а також імунізовані вакциною БЦЖ, одержані результати ІЕА щодо рівнів антитіл проти злитого протеїну МРВ63–МРВ83 було проаналізовано в контексті індивідуального статусу досліджених тварин.

M. intracellulare, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* — надзвичайно широко розповсюджені види мікобактерій. *M. intracellulare* є представником групи *M. avium-intracellulare* (MAI), який трапляється у системах водопостачання, у пилу, бруді й може бути виділений з прісної та морської води в усьому світі. Усі ці види рідко спричиняють захворювання на туберкульоз, здебільшого в імунодефіцитних пацієнтів або тварин [15, 16]. Однак наявність великої кількості спільних антигенів зі збудником туберкульозу є причиною того, що сенсibilізація цими мікобактеріями заважає діагностиці з використанням туберкуліну або інших комплексних антигенів. Тому перевірка можливості виникнення перехресних реакцій з антигенами *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*

і *M. fortuitum* є важливим етапом пошуку рекомбінантних антигенів для підвищення ефективності діагностики туберкульозу ВРХ.

На рис. 6 наведено діаграму рівнів антитіл проти злитого протеїну МРВ63–МРВ83 у сироватках крові ВРХ, інфікованої різними видами мікобактерій.

З рис. 6 випливає, що в групі тварин з визначеним щодо туберкульозу статусом високий рівень антитіл проти злитого протеїну МРВ63–МРВ83 спостерігався лише у тварин, експериментально заражених *M. bovis*. У тварин, заражених непатогенними *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* та проімунізованих *M. bovis* BCG, виявили лише незначну кількість таких антитіл.

Таким чином, отриманий нами генетично злитий протеїн МРВ63–МРВ83 у перспективі може бути використаний при розробленні високоспецифічних імуноензимних тест-систем для діагностики туберкульозу ВРХ. Враховуючи ідентичність у збудників туберкульозу ВРХ і людини антигенів МРВ63 та МРВ83, а також схожий характер розвитку імунологічних реакцій під час захворювання [17], вважаємо за доцільне в майбутньому оцінити перспективність використання цього антигену для діагностики туберкульозу людини.

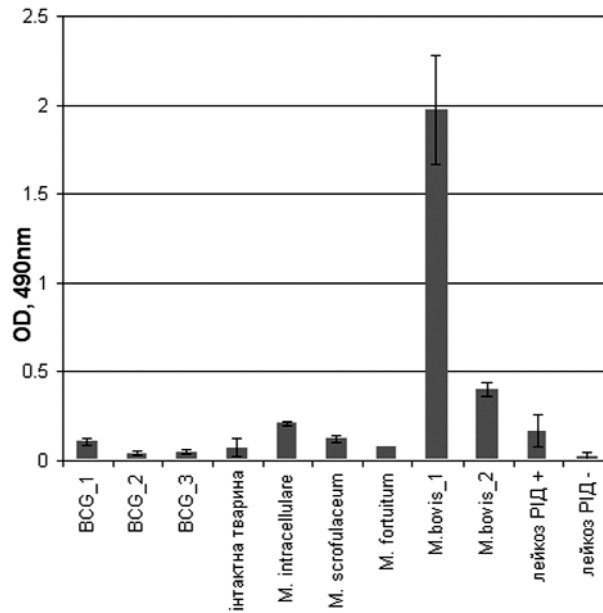


Рис. 6. Рівень антитіл до злитого протеїну МРВ63–МРВ83 в сироватках крові корів, імунізованих вакциною BCG, інфікованих різними видами мікобактерій або хворих на лейкоз, порівняно зі здоровими тваринами. На стовпцях показано стандартне відхилення

ЛІТЕРАТУРА

1. Cole S. T., et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // *Nature*. — 1998. — V. 393, N 6685. — P. 537–544.
2. Garnier T. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — V. 100, N 13. — P. 7877–7882.
3. Chalmers J. W. T., Jamieson A. F., Rafferty P. An outbreak of bovine tuberculosis in two herds in South West Scotland — veterinary and human public health response // *J. Public Health*. — 1996. — V. 18, N 1. — P. 54–58.
4. Gibson A. L. et al. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — V. 42, N 1. — P. 431–434.
5. Lari N. et al. Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy // *Ibid.* — 2006. — V. 44, N 11. — P. 4218–4221.
6. Ojo O. et al. *Mycobacterium bovis* strains causing smear-positive human tuberculosis, Southwest Ireland // *Emerg. Infect. Dis.* — 2008. — V. 14, N 12. — P. 1931–1934.
7. Daborn C. J., Grange J. M. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis // *Br. Vet. J.* — 1993. — V. 149, N 5. — P. 405–417.
8. Sunder S. et al. Human-to-Human Transmission of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis* in Immunocompetent Patients // *J. Clin. Microbiol.* — 2009. — V. 47, N 4. — P. 1249–1251.
9. Gennaro Maria B. L. Immunologic Diagnosis of Tuberculosis // *Clin. Infect. Dis.* — 2000. — V. 30, N 3. — P. S243–S246.
10. Скрыпник А. Применение молекулярно-генетических методов для изучения видового соотношения микобактерий, изолированных в Украине от реагировавшего на туберкулин КРС // *Ветеринарная патология*. — 2007. — № 4. — С. 111–117
11. Редчук Т. А., Олійник О. С., Кабернюк А. А. та ін. Клонування та експресія білків *Mycobacterium bovis* МРВ63 і МРВ83 в клітинах *Escherichia coli* // *Доп. НАН України*. — 2007. — № 9. — С. 161–166.
12. Harlow E., Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. — Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. — P. 726.
13. Vallejo A. N., Pogulis R. J., Pease L. R. In vitro synthesis of novel genes: mutagenesis and recombination by PCR // *PCR Methods Appl.* — 1994. — V. 4, N 3. — P. S123–S130.
14. Вербов В. Н. Принципы твердофазного иммуноферментного анализа // *Труды института имени Пастера*. — 1998. — № 64. — С. 3–27.
15. Palomino J. C., Leao S. C., Ritacco V. *Tuberculosis 2007. From basic science to patient care*. — Belgium, Brazil, Argentina: Bourcillier Kamps, 2007. — P. 687.
16. Воробьев А. А. *Микробиология и иммунология*. — М.: Медицина, 1999. — 464 с.
17. Van Rhijn I. et al. Bovine tuberculosis as a model for human tuberculosis: advantages over small animal models // *Microb. Infect.* — 2008. — V. 10, N 7. — P. 711–715.

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ХИМЕРНЫЙ
ПРОТЕИН МРВ63–МРВ83 —
ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АНТИГЕН
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА**

*Т. А. Редчук, Н. В. Короткевич,
А. А. Кабернюк, Е. С. Олейник,
А. Ю. Лабынцев, С. И. Романюк,
Д. В. Колибо, С. В. Комисаренко*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: rtakyiv@gmail.com

МРВ63 и МРВ83 — потенциально важные для серологической диагностики туберкулеза протеины *Mycobacterium bovis*, заслуживающие особого внимания благодаря своим иммунобиологическим свойствам. Путем объединения последовательностей генов *mpb63* и *mpb83* *M. bovis* получен экспрессирующий вектор и соответствующий химерный протеин МРВ63–МРВ83, который может быть очищен с помощью металлоаффинной хроматографии.

Изучение антигенных свойств полученного рекомбинантного протеина в экспериментах с использованием сывороток кроликов, иммунизированных антигенами МРВ63 и МРВ83, показало не только соответствие антигенной структуры слитого протеина и его составляющих, но и возможность достичь более высокого уровня сигнала в ИЭА с использованием химерной конструкции, вероятно, благодаря лучшим сорбционным свойствам.

Также нами был определен уровень антител против слитого протеина МРВ63–МРВ83 в сыворотках крови условно здоровых, иммунизированных вакциной БЦЖ, экспериментально зараженных различными видами микобактерий (*M. bovis*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*) и больных лейкозом коров. Результаты этих экспериментов показали, что высокий уровень антител против слитого протеина МРВ63–МРВ83 наблюдался лишь у животных, зараженных *M. bovis*. Таким образом, полученный нами генетически слитый протеин МРВ63–МРВ83 в перспективе может быть использован при разработке иммуноэнзимных тест-систем для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота.

Ключевые слова: рекомбинантный слитый протеин, МРВ83, МРВ63, *Mycobacterium bovis*, антигенные свойства, иммунодиагностика, туберкулез, крупный рогатый скот.

**RECOMBINANT CHIMERA PROTEIN
MPB63–MPB83 AS PERSPECTIVE
ANTIGEN FOR DIAGNOSTICS
OF TUBERCULOSIS**

*T. A. Redchuk, N. V. Korotkevich,
A. A. Kaberniuk, O. S. Oliinyk,
A. J. Labyntsev, S. I. Romaniuk,
D. V. Kolibo, S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: rtakyiv@gmail.com

Proteins of *Mycobacterium bovis* MPB63 and MPB83 are perspective candidates for development of serological test-systems to detect tuberculosis. We have obtained expression vector carrying sequences of genes *mpb63* and *mpb83* in single open reading frame and the corresponding chimeric protein MPB63–MPB83, that can be purified by metal-affinity chromatography.

Experiments using sera from rabbits immunized with antigens MPB63 and MPB83 showed not only match the antigenic structure of the fused protein and its constituent parts, but also the opportunity to achieve a higher level of signal in ELISA using chimeric construction, probably due to the better adsorption properties.

Also, we have determined the level of antibodies against the fusion proteins MPB63–MPB83 in sera of healthy, immunized with BCG, experimentally infected with different types of mycobacteria (*M. bovis*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*) and leukaemic cattle. The results of these experiments testified that only the animals infected with *M. bovis* showed high levels of antibodies against the fusion protein MPB63–MPB83. Thereby, we have obtained genetically fused protein MPB63–MPB83 which could be used to develop ELISA test systems for diagnosis of bovine tuberculosis.

Key words: recombinant fusion protein, MPB83, MPB63, *Mycobacterium bovis*, antigenic properties, immunodiagnosics, tuberculosis, cattle.