

Т. А. Редчук, О. С. Олійник, А. А. Кабернюк, Д. О. Буркальова,  
С. І. Романюк, Д. В. Колибо, академік НАН України  
С. В. Комісаренко

## Клонування та експресія білків *Mycobacterium bovis* MPB63 і MPB83 у клітинах *Escherichia coli*

*Gene fragments mpb83 and mpb63 from Mycobacterium bovis BCG were amplified using PCR. Plasmids containing mpb63 and mpb83 fragments have been constructed using the expression vector pET24a (Novagen). Expression of recombinant proteins was obtained in E. coli Rosetta (DE3) cells under control of strong T7 promoter. Lysates were analyzed by immunoblotting with anti HisTag conjugate. His-Tag fusion proteins were purified with batch metal affinity chromatography under denaturative conditions. Results are expected to lay groundwork for the further development of improved diagnostic tools or vaccines against human and bovine tuberculosis.*

Туберкульоз — одне з найпоширеніших у світі інфекційних захворювань. Щорічно від нього помирають понад двох мільйонів людей. Останніми роками зростання захворюваності на туберкульоз значно ускладнене в зв'язку з появою полірезистентних штамів збудників туберкульозу [1]. Крім того, актуальною стала проблема туберкульозу у сільськогосподарських тварин, і зокрема, великої рогатої худоби (ВРХ). Так, у ряді робіт доведено можливість передачі інфекції людині від ВРХ внаслідок вживання непастеризованого молока [наприклад, 2]. Навіть при мінімізації ризику передачі інфекції людині (за рахунок пастеризації молока і своєчасного вибраковування зараженого поголів'я) туберкульоз ВРХ призводить до істотних фінансових втрат.

Невід'ємною частиною боротьби з розвитком туберкульозу є розробка підходів в діагностиці, які б сприяли швидкому і ефективному виявленню його збудника. Методи, що існують на сьогодні в клінічній практиці, засновані на виявленні в мокроті пацієнтів кислотостійких бактерій та на їх ідентифікації. Такі тести характеризуються недостатньою ефективністю [3].

Одним з найпоширеніших альтернативних варіантів діагностики є тести на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [4]. Проте слід зазначити, що методи діагностики, які базуються на ПЛР, не позбавлені недоліків. Зокрема, існує ряд проблем, пов'язаних з можливістю контамінації та крос-контамінації клінічних зразків, а також детектування мікобактерій у випадку, коли вони не здатні викликати захворювання, тому лікування не потрібне [5]. Інша негативна риса цієї діагностики — наявність інгібіторів полімеразної реакції в клінічних зразках [6].

Тому, на сьогодні актуальним напрямом стала серодіагностика туберкульозу. Такий підхід (з урахуванням його специфічності) вигідно відрізняється швидкістю від існуючих у клінічній практиці методів. До переваг серодіагностики також відносять простоту і низьку вартість [7]. Крім того, деякі роботи відзначають протективні властивості антитіл до антигенів мікобактерій [8 тощо], що також підвищує цінність інформації про рівень гуморальної імунної відповіді, отриманої в серодіагностичних тестах.

Одним із критично важливих елементів розробки серологічних тест-систем є вибір компонента, що використовується як антиген. МРВ63 є секреторним білком, який значно збільшує його діагностичну значущість. Згідно з літературними даними, антитіла до нього не мають перехресну активність стосовно антигенів *Mycobacterium avium* та близького дуже поширеного в навколишньому середовищі виду [9]. МРВ83 в бактеріальних клітинах експонований на поверхні, що визначає високу вірогідність появи антитіл до цього антигену. Крім того, рівень його експресії в клітинах штаму, що використовується для вакцинації (*Mycobacterium bovis* BCG), нижче, ніж в клітинах патогенних штамів. Це дозволяє використовувати його для диференціації відповіді на вакцинацію та прогресуючу інфекцію [10].

Таким чином, клонування названих вище антигенів є високоперспективним, зважаючи на гостру потребу системи охорони здоров'я у вакцинах і діагностичних тестах нового покоління.

**Матеріали і методи. Виділення геномної ДНК *Mycobacterium bovis*.** 0,1 г ліофілізованих клітин *Mycobacterium bovis* BCG ресуспендували в 300 мкл буфера STET (8% сахароза, 5% TRITON X-100, 50 mM TrisHCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, pH 8,0) і додавали 30 мкл суміші RNaseA з ліцозомом (10 мг/мл ліцозим, 10 мг/мл РНКаз) кип'ятили на водяній бані і охолоджували по 2 хв 3 рази. Центрифугували 15 хв при  $g = 8000$ . З супернатанта екстрагували білок фенолом, насиченим буфером STET, після чого осаджували ДНК ізопропанолом (1 об'єм ізопропанолу на 1 об'єм отриманого розчину), промивали етанолом, розчиняли в 20 мкл води.

**Полімеразна ланцюгова реакція.** Фрагмент гену *mpb63* ампліфікували за допомогою 2 пар праймерів. Перша пара (forward 5' AGGGACCAATGAAGCTCA 3' і reverse 5' TCTACGGCTCCCAAATCA 3') характеризувалася максимальною специфічністю, тоді як друга (forward 5' CTGAGGATCCATGAAGCTCACCACAATGAT 3' і reverse 5' TCAGCTCGAGCGGCTCCCAAATCAGCAGAT 3') обмежувала необхідний фрагмент, не містила в послідовності стоп-кодону гена (для отримання злитого з полгістидиновим тагом білка) і несла сайти рестрикції *Bam*HI і *Xho*I (підкреслені). Фрагмент *mpb83* був ампліфікований за допомогою однієї пари праймерів (forward 5' GGATCCGACACCCTCAACGGCGGCGAG 3' і reverse 5' CTCGAGCTGTGCCGGTGGCATCAGTACC 3'). Праймери мали ті самі сайти рестрикції. ПЛР суміш в обох випадках містила кожний з dNTP в концентрації 200 мкМ, MgCl<sub>2</sub> в концентрації 1,5 мМ, Taq полімерази (2,5 units, Sigma, США), по 15 pmole кожного праймера, геномну ДНК (~ 1–10 нг). Кінцевий об'єм суміші становив 30 мкл. Реакцію проводили на термоциклері 2720 Thermal Cycler (Applied biosystems, США) за схемою: 30 циклів (де цикл — денатурація — 93° 30 с, відпалювання — 57° 30 с, синтез 72° 75 с).

**Клонування.** Отримані продукти ПЛР і векторні ДНК обробляли рестриктазами *Bam*HI і *Xho*I (Fermentas, Литва), змішували у співвідношенні ~ 1 : 1 (в мольних концентраціях). У складі лігазної суміші була T4 ДНК лігаза (2,5 юніта, Fermentas, Литва) і буфер до T4 ДНК лігази того самого виробника. Лігування проводили протягом ночі при 22 °С. Отриманою ДНК трансформували компетентні клітини штаму *Escherichia (E). coli* Rosetta (DE3) за допомогою електропоратора Eppendorf Electroporator 2510 (Німеччина). Вольтаж 1800 V, час імпульсу ~ 5 мс. Відібрані клони піддавали рестрикційному аналізу за допомогою *Bam*HI і *Xho*I, а при клонуванні *mpb63* також *Ara*I. Вставки були секвеновані за допомогою ABI Prism 3130 (Applied biosystems, США) у відділенні молекулярної діагностики Української лабораторії якості і безпеки продукції агропромислового комплексу Національного аграрного університету.

**Експресія і очищення білка.** Дані конструкції дозволяли отримати фрагменти білків, злиті з полігістидиновим тагом (на С-кінці). Це дало змогу очистити rMPB63 і rMPB83 методом хроматографії в об'ємі в денатуруючих умовах на NiNTA агарозі (Sigma) з лізату клітин.

Експресію проводили під контролем лактозного оперона в штамі *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen). Підрошені протягом ночі клітини інокулювали в свіже 2YT середовище, що містить глюкозу (2%), і дорощували при 37 °С до оптичної густини 0,4–0,6 при довжині хвилі 600 нм. Після цього середовище міняли на рівний об'єм середовища 2YT, що містить індуктор експресії IPTG в концентрації 1 мМ. Інкубували 3 год при струшуванні (200 об./хв) і при 30 °С. Проінкубовану культуру центрифугували при  $g = 6000$  5 хв при 4 °С. Осад 100 мл культури лізували в 1 мл лізуючого розчину (50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> рН 8,0, 0,3 М NaCl, 8 М сечовина) і обробляли ультразвуковим дезінтегратором LABSONIC M (Sartorius, ФРН) тричі по 20 с, до просвітлення розчину, після чого знову центрифугували ( $g = 12000$ , 15 хв). Супернатант (1 мл) змішували з сорбентом (50 мкл, заздалегідь урівноваженим у розчині, що містив 8 М сечовину, 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> рН 8,0, 0,5 М NaCl). Інкубували протягом години, періодично струшуючи, при 4 °С. Центрифугували при  $g = 4000$  3 хв, супернатант виливали. Тричі промивали осад розчином, що містив 8 М сечовину, 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> рН 8,0, 0,5 М NaCl, 10 мМ імідазол. Елюювали тричі по 100 мкл розчином, що містив 8 М сечовину, 20 мМ Tris рН 7,5, 100 мМ NaCl, імідазол 250 мМ.

**Імуноблоттінг.** Імуноблоттінг проводили методом напівсухого перенесення. Буфер для перенесення містив Tris 25 мМ, гліцин 192 мМ, 0,1 SDS, MetOH 20%. Нітроцелюлоза після перенесення протягом години при 37 °С блокувалася знежиреним молоком (5%) в PBS. Проявляли кон'югатом Monoclonal Anti-Polyhistidine clone His-1 (Sigma) в розведенні 1/2000. Перед проявкою кон'югат блокували 0,2% BSA (1 год при 37 °С). Як фарбник використовували діамінобензидин (DAB): змішували розчини 1 мл 0,3% NiCl<sub>2</sub> (у буфері Tris HCl 50 мМ, рН 7,6) і DAB — 6 мг в 9 мл того самого буфера. До суміші додавали H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 10 мкл. Смужки виявляються протягом кількох секунд, після чого нітроцелюлозу промивали в дистильованій воді.

**Результати і обговорення.** Нами було отримано рекомбінантні конструкції на основі вектора для експресії рЕТ24а, що містять фрагменти генів *mpb63* і *mpb83*, ампліфіковані з геномної ДНК *Mycobacterium bovis* (рис. 1).

Рестрикційний аналіз підтвердив наявність у конструкції фрагментів очікуваного розміру (рис. 2).

Секвенування конструкцій продемонструвало ідентичність отриманих послідовностей відповідним послідовностям у базі даних, а також підтвердило наявність відкритої рамки зчитування, що включає фрагменти генів і необхідні таги. Було відзначено заміну L (109) на Р у MPB63, яка може бути обумовленою як поліморфізмом гена, так і помилками полімерази Taq при перебігу ПЛР. Розв'язання цього питання вимагає подальших досліджень. Також було відзначено дуплікацію нуклеотидної послідовності sense праймера в конструкції з фрагментом *mpb83*, яка, імовірно, є наслідком утворення на праймері вторинної структури типу шпильки (hairpin loop). Вказані заміни в нуклеотидних послідовностях не призвели до зсуву рамки зчитування. Отримані конструкції використовували для експресії і отримання рекомбінантних білків. Білки з лізата були очищені шляхом металоафінної хроматографії в об'ємі (рис. 3).

Як показано у ряді робіт, MPB63 і MPB83 є високоімуногенними білками мікобактерій [9, 11, 12]. Тому, за нашими припущеннями, використання отриманих нами їх рекомбі-

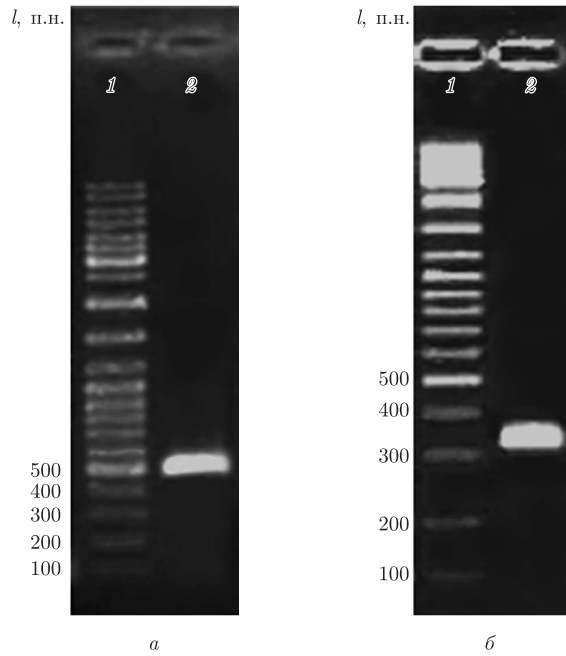


Рис. 1. Продукти ПЛР з гену *mpb63* (а) та *mpb83* (б):  
 1 — маркери молекулярної маси; 2 — електрофореграма продукту ПЛР

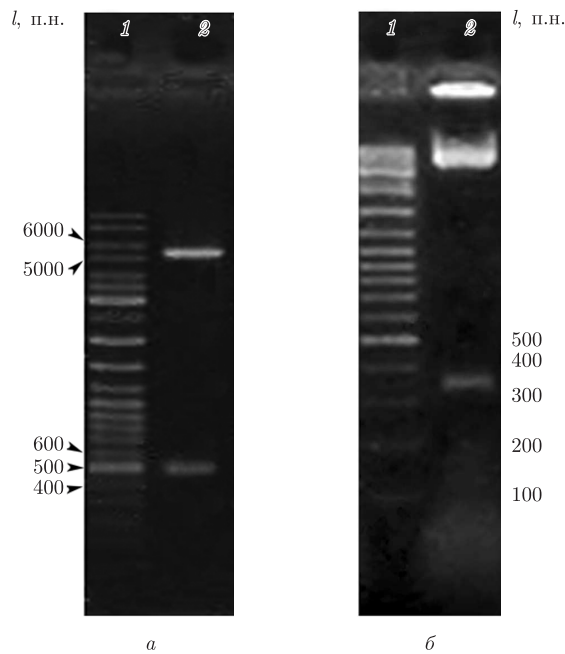


Рис. 2. Результат рестрикційного аналізу отриманих генетичних конструкцій на базі рЕТ24а+, що містили фрагменти генів *mpb63* (а) та *mpb83* (б):  
 1 — маркери молекулярної маси; 2 — електрофореграма рестрикційного аналізу

нантних аналогів може дозволити не тільки поліпшити якість діагностики, а й обійти ряд вузьких місць при розробці технології промислового отримання компонентів протитуберкульозних діагностикумів і вакцин.

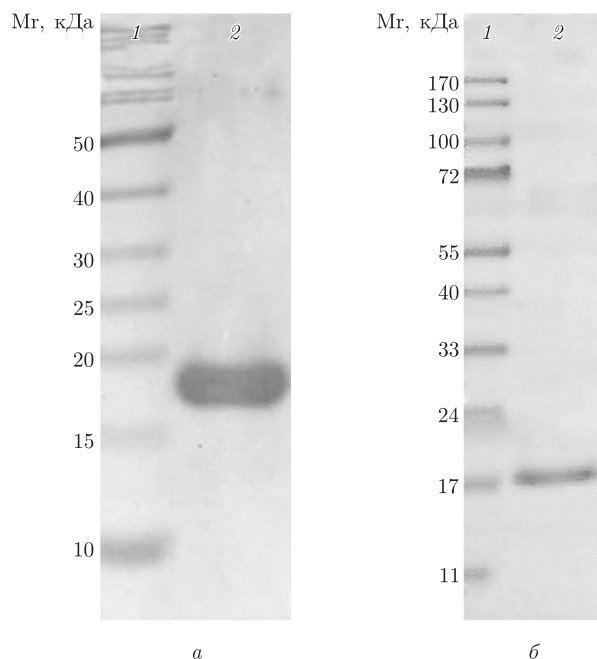


Рис. 3. Результат електрофоретичного аналізу очищених рекомбінантніх аналогів білків МРВ83 (а) та МРВ63 (б):

1 — маркери молекулярної маси; 2 — електрофореграма продукту очистки

Зокрема, зважаючи на рекомендації Належної виробничої практики, для виробництва вакцини БЦЖ і роботи з живими мікроорганізмами, що використовуються у виробництві препаратів туберкуліну, необхідно застосовувати лише спеціальні приміщення і обладнання. Персонал, який працює на такому виробництві підлягає систематичному рентгенологічному обстеженню.

Для більш безпечних продуктів, що виробляються із застосуванням технології рекомбінантних ДНК, пропонуються менш жорсткі вимоги до обладнання виробничих приміщень. Також допускається їх одночасне (конкурентне) виробництво в одній зоні з використанням закритих систем біоферментаторів (Good Manufacturing Practices (GMP) for Schedule D Drugs — Part 1 — Biological Drugs).

З покращенням діагностування туберкульозу отримані нами рекомбінантні аналоги білків мікобактерій надають нові можливості для досліджень механізмів протитуберкульозного імунітету.

1. Zhang Y., Young D. Molecular genetics drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // J. Antimicrob. Chem. — 1994. — **34**. — P. 313–319.
2. Cosivi O., Grange J. M., Daborn C. J. et al. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries // Emerging Infectious Diseases. — 1998. — **4** (1). — P. 59–70.
3. Jaccott P. S., Bothamley G. H., Batra H. V. et al. Specificity Antibodies to Immunodominant Mycobacterial Antigens in Pulmonary Tuberculosis // J. Clinical Microbiol. — 1988. — **26**. — P. 2313–2318.
4. Maher M., Glennon M., Martinazzo G. et al. Evaluation a novel PCR-based diagnostic assay for detection *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples // Ibid. — 1996. — **34**. — P. 2307–2308.
5. Beige J., Lokies J., Schaberg T., et al. Clinical Evaluation a *Mycobacterium tuberculosis* PCR Assay // Ibid. — 1995. — **32**. — P. 90–95.
6. Clarridge J. E., Shawar R. M., Shinnick T. M. et al. Use polymerase chain reaction for detection *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory // Ibid. — 1993. — **31**. — P. 2049–2056.

7. Okuda Y., Maekura R., Hirotsani A. et al. Rapid Serodiagnosis Active Pulmonary Mycobacterium tuberculosis Analysis Results from Multiple Antigen-Specific Tests // *Ibid.* – 2004. – **42**. – P. 1136–1141.
8. Glatman-Freedman A., Casadevall A. Serum Therapy for Tuberculosis Revisited: Reappraisal Role of Antibody-Mediated Immunity against Mycobacterium tuberculosis // *Casadev. Clinical Microbiol. Rev.* – 1998. – **11**. – P. 514–532.
9. Manca C., Lyashchenko K, Gotten Wiker H., et al. Molecular Cloning, Purification, and Serological Characterization MPT63, a Novel Antigen Secreted Mycobacterium tuberculosis // *Infection and Immunity.* – 1997. – **65**. – P. 16–23.
10. Vordermeier H. M., Cockle P. C., Whelan A., et al. Development Diagnostic Reagents To Differentiate between Mycobacterium bovis BCG Vaccination and M. bovis Infection in Cattle // *Clinical and Diagnostic Lab. Immunol.* – 1999. – **6**. – P. 675–682.
11. Cohen M. L., Mayer L. W., Rumschlag H. S. et al. Expression Proteins Mycobacterium tuberculosis in Escherichia coli and Potential Recombinant Genes and Proteins for Development Diagnostic Reagents // *J. Clinical Microbiol.* – 1987. – No 7. – P. 1176–1180.
12. Hewinson R. G., Michell S. L., Russell W. P. et al. Molecular characterization MPT83: a seroreactive antigen Mycobacterium tuberculosis with homology to MPT70 // *Scand. J. Immunol.* – 1996. – **43(5)**. – P. 490–499.

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

*Надійшло до редакції 19.03.2007*