

УДК 602.68:57.083.3:616.097

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА p60 *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Мукантаев К.Н.<sup>1</sup>, Бегалиева А.<sup>1</sup>, Іңірбай Б.<sup>1</sup>, Райымбек Г.<sup>1</sup>, Қазыкен Д.<sup>1</sup>,  
Сегізбаева Г.Ж.<sup>2</sup>, Шевцов А.Б.<sup>1</sup>, Муканов К.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный центр биотехнологии

ул. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан

<sup>2</sup>Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева

ул. Мунайтпасова, 5, Астана, 010000, Казахстан

lii@biocenter.kz

### АБСТРАКТ

Совершенствование иммунологических методов диагностики листериоза является актуальной проблемой в профилактике пищевых токсикоинфекций. В настоящее время одним из приоритетных диагностических антигенов *L. monocytogenes* принято считать белок p60.

Методом полимеразной цепной реакции синтезирована центральная часть гена p60 длиной 625 пар оснований. В работе использована геномная ДНК штаммов *L. monocytogenes*, выделенных в Республике Казахстан. Полученный ген имел структурные особенности, характерные для гена p60 листерий. Синтезированный ген клонирован в экспрессионную плазмиду pET32. Проведена трансформация кишечной палочки штамма BL21. В результате гетерологической экспрессии получен протеин с молекулярной массой 40 кДа, соответствующий предполагаемой массе рекомбинантного антигена. Иммуноферментный анализ показал специфическую активность антител против белка p60 *L. monocytogenes* с полученным рекомбинантным антигеном.

Ключевые слова: p60 антиген, листериоз, рекомбинантный белок, ген, праймер, генетическая конструкция.

### The p60 recombinant antigen of *Listeria monocytogenes*

Mukantayev K.N.<sup>1</sup>, Begaliyeva A.<sup>1</sup>, Inirbay B.<sup>1</sup>, Raiymbek G.<sup>1</sup>, Kazyken D.<sup>1</sup>,  
Segizbayeva G.Zh.<sup>2</sup>, Shevtsov A.B., Mukanov K.K.

<sup>1</sup>National center for biotechnology

13/1 Valikhanov st., Astana, 010000, Kazakhstan

<sup>2</sup>L.N. Gumilyov Eurasian National University

5 Mungaytpasov st., Astana, 010000, Kazakhstan

lii@biocenter.kz

### ABSTRACT

Improvements in immunological methods for the diagnosis of listeriosis are important in the prevention of foodborne diseases. Currently, an important diagnostic antigen of *Listeria monocytogenes* is the p60 protein.

The 625-bp-long central part of the p60 gene was synthesized with polymerase chain reaction. In this study, genomic DNA from strains of *L. monocytogenes* that was isolated in the Republic of Kazakhstan was used. The gene had structural features that were characteristic of the p60 gene of *Listeria*. Six codons of the histidine amino acid were added. The synthesized gene was cloned in a pET32 expression plasmid, which was transformed into *Escherichia coli*, strain BL21. As a result of the heterologous expression, a protein with a molecular weight of 40 kDa, which corresponded to the expected mass of the recombinant antigen, was obtained. Monoclonal antibodies against 6xHis-Tag reacted to the 40-kDa protein. Results from an enzyme-linked immunosorbent analysis showed specific reactions between the recombinant antigen and specific polyclonal antibodies, which were obtained by the immunization of BALB/c mice with the AUF vaccine against animal listeriosis. These results suggest that the p60 recombinant protein that was obtained can be used in the diagnostics of listeriosis.

Keywords: p60 antigen, *Listeria*, recombinant protein, gene, primer, genetic construction.

## ВВЕДЕНИЕ

Листерия – инфекционное заболевание человека и животных сапрозоонозного характера, возбудителем которого является *Listeria monocytogenes*. Основным резервуаром возбудителя признаны такие объекты внешней среды как почва и корма животных, из которых наиболее часто выделяется патоген. Заражение людей происходит при несоблюдении ветеринарно-санитарных правил обработки продуктов животноводства в неблагополучных по листериозу территориях. В условиях низкого уровня развития перерабатывающих технологий источником заражения могут стать молочные продукты, мясо, овощи и морепродукты [1]. По своей значимости, листериоз среди пищевых токсикоинфекций занимает второе положение после сальмонеллеза. Однако, по уровню госпитализации, которая составляет 90% от общего числа инфицированных больных, выходит на первое место. Несмотря на то, что заболевание носит спорадический характер, смертность от заболевания при септической форме или при поражении центральной нервной системы достигает 30%. Восприимчивы к листериозу в основном беременные женщины, новорожденные дети, пожилые люди и больные с нарушением иммунной системы [2].

Учитывая сапрозоонозный характер инфекции, выявление возбудителя в объектах внешней среды, а также в продуктах питания и кормах приобретает особое значение в предотвращении заражения человека и животных. На сегодняшний день существует ряд диагностических схем: традиционные бактериологические исследования на селективных средах с последующими биохимическими исследованиями, многочисленные виды ПЦР анализов, в том числе недавно описанные анализы на основе микрочипов. Особое значение приобретают иммунологические методы выявления возбудителя [3, 4].

Разработанные в последние годы различные варианты иммуноферментного анализа основаны на использовании фага, несущего фрагмент ScFv антител, направленный против *Listeria monocytogenes*. Полученные фаги должны были заменить традиционные антитела против целых клеток. Однако при апробировании тест системы в полевых условиях диагностические возможности разработанных вариантов иммуноферментного анализа оказались слишком низкими [5]. Palumbo et al. (2003), используя в прямом варианте иммуноферментного анализа коммерческие антитела против Н и О антигенов *Listeria monocytogenes*, удалось определить патогенные варианты листерий. Несмотря на то, что большинство используемых в иммуноферментном анализе антител являлись родоспецифичными, после проведенных процедур обогащения культуры авторам удалось выявить отдельные колонии *Listeria monocytogenes* [6]. Lathrop A.A. et al. (2003) охарактеризовали моноклональные антитела, выявляющие убитые нагреванием *Listeria sp.* Антитела реагировали с белками молекулярной массой 76, 66, 56 и 52 кДа *L. monocytogenes* и белками 66, 56 и 52 кДа *L. innocua*, что также делает их непригодными для выявления патогенных листерий пищевого происхождения [7]. Farber et al. (1988) использовали иммобилизованные в лунках планшеты и нитроцеллюлозной мембраны антитела против флагеллярного антигена для выявления листерий в пищевых продуктах. Диагностические возможности данной системы также оказались не высокими [8].

В настоящее время для диагностики листериоза приобретает большое значение антиген р60. Антиген является внеклеточным белком *L. monocytogenes*, вовлечен в инвазию клеток млекопитающих и экспрессируется в процессе размножения листерий в клетках человека или животных, так как антитела против антигена р60 листерий часто присутствуют у людей и животных, как с клиническими признаками, так и без [9, 10, 11]. Диагностическая значимость антигена р60 также определена при исследовании мутантов листерий, не способных синтезировать данный антиген. Мутантные по антигену р60 клетки демонстрировали R форму колонии и не были способны заражать лабораторных животных и фибробласты мышей. При добавлении в зараженную мутантными листериями культуру

клеток частично очищенного антигена р60 от дикого типа листерий у последних восстанавливалась инвазивная способность [9, 12].

Белок р60 кодируется открытой рамкой считывания длиной 1452 п.о., что приводит к образованию белка с теоретической молекулярной массой 50 кДа и типичной N-концевой сигнальной последовательностью [13]. Белок демонстрирует четко выраженную доменную структуру с двумя консервативными районами на N и C концах длиной 100 и 120 аминокислот, соответственно [14]. В консервативном районе на N конце пептида выявлена SH<sub>3</sub> область с неясной функциональной активностью. С C-конца пептида выявлены области аналогичные аминокислотной последовательности гидролитических ферментов, которые, как полагают, придают антигену р60 гидролитическую активность [15, 16]. Центральная часть высоко вариабельна с треонин-аспаргиновыми повторами, расположенными по краям последовательности TPSKN. Данные повторности при исследовании их ДНК гибридизацией показали высокую специфичность только к белку р60 *L.monocytogenes* и *L. innocua* [12].

Включение иммунного ответа и индукция синтеза специфических к антигену р60 листерий антител связано с деградацией его в цитоплазме клеток хозяев. После инвазии листерий в клетки хозяина в цитоплазме листериолизин О деградирует до образования пептида листериолизина О длиной 91-99 аминокислот и антигена р60 или муреин гидролазы. Далее муреин гидролаза деградирует в пептид р60 длиной 217-225 аминокислот и пептид р60 длиной 449-457 аминокислот. Все три пептида имеют эпитопы, способные связываться с главным комплексом совместимости I типа. Alice J.A.M. Sijts с соавторами (1997), с целью определения потенциального протеолитического сигнала антигена р60, произвели целенаправленное удаление некоторых участков ДНК вдоль всей длины гена. Деградация мутантных форм антигена р60 осуществлялась путем их введения в макрофаги, инфицированные рекомбинантной формой *L. monocytogenes*. Исследования показали, что удаление с N-терминального конца двух третей антигена повышает его цитоплазматическую деградацию. В противоположность, усечение C-концевой последовательности привело к небольшой стабилизации антигена в цитоплазме клеток хозяев. Поскольку аминокислотная последовательность белка в N-концевой части определяет скорость его деградации, авторами проведен целенаправленный мутагенез в определенных участках. Замена валина стабилизирует молекулы р60, в то время как замена аспарагиновой кислотой приводит к быстрой деградации. Полученные авторами данные показывают, что аминокислотная последовательность в N-конце пептида и несколько внутренних областей р60 обеспечивают его устойчивость в цитоплазме инфицированных клеток [16].

В настоящее время зарегистрированы различные антитела против антигена р60 листерий, предназначенных для диагностических целей. Используемые в диагностике листериоза антитела реагировали только патогенными видами *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*. По данным авторов, антитела против белка р60 из *L. monocytogenes* подходят для разработки специфических иммунологических анализов, предназначенных для обнаружения патогенных штаммов *Listeria*. А поскольку состав наружной мембраны бактериальных клеток может изменяться в зависимости от условий культивирования, то необходима проверка антител на реакционную активность со штаммами листерий, выделенных из окружающей среды или пищевых продуктов [17]. Разработанная авторами реакция иммунофлуоресценции на основе антител к антигену р60 активно выявляла более патогенные штаммы *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* и *L. innocua*, но не обнаруживала *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* и *L. murrayi*. Полученные данные были подтверждены методом гибридизации с ДНК зондами и коррелировали с результатами иммуноблоттинга, демонстрирующего стабильность антигена р60.

Одним из определяющих моментов при разработке иммунологических методов диагностики и получения моноклональных антител является использование антигенных препаратов, соответствующих следующим требованиям: гомогенность, иммуногенность и содержание детерминант, представляющих диагностический интерес для исследователя.

В настоящее время методами генетической инженерии созданы различные профилактические и диагностические препараты против инфекционных заболеваний. Генная инженерия открыла путь для производства продуктов белковой природы путем введения в клетки микроорганизмов искусственно синтезированных генов, где они могут экспрессироваться в составе гибридных молекул. Первой удачной попыткой такого рода стали работы Г. Бойера по экспрессии химически синтезированного гена в *E. coli* [18].

В связи этим целью работы является получение рекомбинантного антигена р60 *L. monocytogenes* для использования в иммунохроматографическом анализе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для наработки гена и его клонирования использовались хемокомпетентные штаммы *Escherichia coli* JM109 и DH5 $\alpha$ . Для гетерологической экспрессии рекомбинантного р60 антигена *L. monocytogenes* использовался электрокомпетентный штамм *E. coli* BL21. Клетки *E. coli* выращивались на жидких и плотных питательных средах LB. Нарботка и определение нуклеотидной последовательности гена р60 проводилась с использованием плазмиды рGEMT (Promega, USA). Для экспрессии рекомбинантного антигена использован вектор рЕТ32. Используемые в работе ферменты: NcoI, XhoI, BamHI, HindIII, T4 ДНК лигаза, Tag и Phusion DNA Polymerase.

**Таблица 1.** Праймеры использованные в работе  
**Table 1.** The primers used in this work

ПЦР праймеры	Нуклеотидная последовательность
smol-END 1F st	5'-CTGCAGGGATCCCCATGGTGGTAGCAGAAACGAAAGAAACTCCA-3'
smol-END1R st	5'-CTCGAGAAGCTTTA GTGGTGGTGGTGGTGGTGTACGCGACCGAAGCCAACT-3'
start_f st	5'-CTGCAGGGATCCCCATGGTGTGTGGGGTATCGCACAAAGTAAAG-3'
start_r st	5'-CTCGAGAAGCTTTA GTGGTGGTGGTGGTGGTGT TTAGTGTAACCA GAGCAATCAAATGTAG-3'

Сайты рестрикции подчеркнуты одинарной линией, гексагистидиновая вставка помечена квадратной рамкой.

Различные участки гена р60 *L. monocytogenes* амплифицировались полимеразной цепной реакцией с использованием *Phusion* полимеразы. Первый участок амплифицировался праймерами smol-END 1F st и smol-END1R st, второй участок праймерами start\_f st и smol-END1R st, третий участок праймерами start\_f st и start\_r st. Полученные фрагменты гена р60 клонировались в плазмиду рGEMT. Полученные рекомбинантные плазмиды трансформировались в хемокомпетентные клетки.

Для трансформации клеток лабораторных штаммов *E. coli* JM109 и DH5 $\alpha$  использовали метод Hanahan [19]. Эффективность трансформации составляла 50% трансформантов на 1 мкг суперскрученной ДНК плазмиды рGEMT. При клонировании фрагментов ДНК в плазмидных векторах для поиска рекомбинантов использовали методы контрелекции на средах с антибиотиками и метод скрининга рекомбинантов с использованием IPTG и X-gal.

Очистку препаративного количества плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора PureLink HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen, Germany). 100 мл среды LB (1% бакто-триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl) заражали штаммом, несущим плазмиду и выращивали при температуре 37°C до оптической плотности OD600 = 0,7-0,8. Очистку плазмиды проводили в соответствии с протоколом производителя набора.

Очистку аналитического количества плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Netherlander). 5 мл среды LB (1% бакто-триптона,

0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl) заражали штаммом, несущим плазмиду и выращивали при температуре 37°C в течение 16 часов. Очистку аналитического количества плазмиды проводили в соответствии с протоколом производителя набора.

Разделение фрагментов ДНК проводили согласно Маниатису и др. [20] методом электрофореза в горизонтальных агарозных гелях с концентрацией агарозы от 1 до 3%. Электрофорез проводили при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере (0,04М трис-ацетат рН 8,1, 0,002М ЭДТА) с содержанием 0,5 мкг/мл бромистого этидия, при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30-60 мин.

Препаративное разделение фрагментов ДНК проводили в 0,8%-ном агарозном геле. Фрагменты выделяли из геля методом электроэлюции. Полученный раствор ДНК экстрагировали смесью фенол-хлороформ и хлороформом, после чего преципитировали этанолом. Эффективность элюции контролировали методом электрофореза в агарозном геле.

Для лигирования фрагментов ДНК использовали ДНК-лигазу фага T4. Состав буфера: 250 мМ трис-HCl, рН 7,2. 25 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ ДТТ, 1 мМ трихлорида гексааминокобальта. Реакцию лигирования заканчивали после инкубирования в течение 45 минут при комнатной температуре. Первичную структуру ДНК определяли по методу Sanger [21].

Полученный рекомбинантный белок анализировали денатурирующим электрофорезом в 15% ПААГ. Иммунохимические свойства рекомбинантного антигена анализировались иммуноблотом и иммуноферментным анализом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез гена р60 осуществляли с геномной ДНК *L. Monocytogenes*, используя праймеры, последовательность которых определена программой Primer Select (DNASTAR). Геномная ДНК *L. monocytogenes* выделена из штаммов, распространенных в Республике Казахстан. Основными требованиями к праймерам являются близкая температура отжига, длина 20-25 пар оснований и отсутствие образования вторичных структур. Праймеры были проверены программой PrimerBlast (NCBI). Два праймера start\_f st и start\_r st отвечали за синтез С-концевой части антигена р60 длиной 1135 пар оснований. Два других праймера smol-END 1F st и smol-END1R st отвечали за синтез N-концевой части антигена длиной 935 пар оснований. Отобранные варианты праймеров перекрывали центральную часть гена антигена р60. В связи с этим была использована третья комбинация праймеров smol-END 1F st и start\_r st, ответственных за синтез центральной части гена длиной 625 пар оснований.

Определение нуклеотидной последовательности полученных фрагментов гена р60 *L. monocytogenes* показало, что наиболее высокий процент совпадения с последовательностью гена р60, представленного в базе данных PubMed, является продукт, полученный при использовании smol-END 1F st и start\_r st (рисунок 1). Полученный фрагмент представляет собой последовательность, расположенную в середине гена р60. В полученном фрагменте ДНК имеются два сайта рестрикции HindIII. Из рисунка 1 видно, что в позиции 609 тимин заменен на цитозин и в позиции 1106 гуанин заменен на аденин. Помимо этого, в позиции 981 синтезированного гена выявлено отсутствие участка ДНК длиной 6 пар оснований.

	551	600
» p60 listeria ...	(552)	AA GTAGCAGAAA CGAAA GAAACTC CAGTAGTAGAT CAAAA TGCTACTACA
» 3:07	(1)	AAA CGAAA GAAACTC CAGTAA TAGAT CAAAA TGCTACTACA
« 3:05	(8)	TGGT AGCAGAAA CGAAA GAAACTC CAGTAA TAGAT CAAAA TGCTACTACA
Consensus	(552)	AA GTAGCAGAAA CGAAA GAAACTC CAGTAA TAGAT CAAAA TGCTACTACA
	601	650
» p60 listeria ...	(602)	CACGCTGTT AAAAG OGGTGACACTATT TGGCGTTTAT CCGTAAAA TACGG
» 3:07	(43)	CACGCTGTC AAAAG OGGTGACACTATT TGGCGTTTAT CCGTAAAA TACGG
« 3:05	(58)	CACGCTGTC AAAAG OGGTGACACTATT TGGCGTTTAT CCGTAAAA TACGG
Consensus	(602)	CACGCTGTC AAAAG OGGTGACACTATT TGGCGTTTAT CCGTAAAA TACGG
	651	700
» p60 listeria ...	(652)	TGTTTCTGT TCAAGACATTATGTCATGGAATAATT TA TCT TCTTCT CTA
» 3:07	(93)	TGTTTCTGT TCAAGACATTATGTCATGGAATAATT TA TCT TCTTCT CTA
« 3:05	(108)	TGTTTCTGT TCAAGACATTATGTCATGGAATAATT TA TCT TCTTCT CTA
Consensus	(652)	TGTTTCTGT TCAAGACATTATGTCATGGAATAATT TA TCT TCTTCT CTA
	701	750
» p60 listeria ...	(702)	TTTATGTAGGTCAAA AGCTTGC TAT TAAACA AACTGC TAAACA CAGCTACT
» 3:07	(143)	TTTATGTAGGTCAAA AGCTTGC TAT TAAACA AACTGC TAAACA CAGCTACT
« 3:05	(158)	TTTATGTAGGTCAAA AGCTTGC TAT TAAACA AACTGC TAAACA CAGCTACT
Consensus	(702)	TTTATGTAGGTCAAA AGCTTGC TAT TAAACA AACTGC TAAACA CAGCTACT
	751	800
» p60 listeria ...	(752)	CCAAAAGCAGAA GTGAAA A OGGAA GCTCCAGCAGCTGAAA AAA CAA GCAGC
» 3:07	(193)	CCAAAAGCAGAA GTGAAA A OGGAA GCTCCAGCAGCTGAAA AAA CAA GCAGC
« 3:05	(208)	CCAAAAGCAGAA GTGAAA A OGGAA GCTCCAGCAGCTGAAA AAA CAA GCAGC
Consensus	(752)	CCAAAAGCAGAA GTGAAA A OGGAA GCTCCAGCAGCTGAAA AAA CAA GCAGC
	801	850
» p60 listeria ...	(802)	TCAGTAGT TAAAGAAA ATACTAACACAAA TACTGCTACTACAGAGAAA
» 3:07	(243)	TCAGTAGT TAAAGAAA ATACTAACACAAA TACTGCTACTACAGAGAAA
« 3:05	(258)	TCAGTAGT TAAAGAAA ATACTAACACAAA TACTGCTACTACAGAGAAA
Consensus	(802)	TCAGTAGT TAAAGAAA ATACTAACACAAA TACTGCTACTACAGAGAAA
	851	900
» p60 listeria ...	(852)	AA GA AACAGCAA OGC AA CAACA AAGCAGCACCTAAA GC ACCAA CAGAA GCT
» 3:07	(293)	AA GA AACAGCAA OGC AA CAACA AAGCAGCACCTAAA GC ACCAA CAGAA GCT
« 3:05	(308)	AA GA AACAGCAA OGC AA CAACA AAGCAGCACCTAAA GC ACCAA CAGAA GCT
Consensus	(852)	AA GA AACAGCAA OGC AA CAACA AAGCAGCACCTAAA GC ACCAA CAGAA GCT
	901	950
» p60 listeria ...	(902)	GC AAAAC CAGCTCC TGCAC CATCTACA AACACAAA TGCTAAT AAAAC GAA
» 3:07	(343)	GC AAAAC CAGCTCC TGCAC CATCTACA AACACAAA TGCTAAT AAAAC GAA
« 3:05	(358)	GC AAAAC CAGCTCC TGCAC CATCTACA AACACAAA TGCTAAT AAAAC GAA
Consensus	(902)	GC AAAAC CAGCTCC TGCAC CATCTACA AACACAAA TGCTAAT AAAAC GAA
	951	1000
» p60 listeria ...	(952)	TACTAATACAAA TACAAACAATAC TAA TACA AATA CCA TC TAAAAATA
» 3:07	(393)	TACTAATACAAA TACAAACAATAC TAA TACA AATA CCA TC TAAAAATA
« 3:05	(408)	TACTAATACAAA TACAAACAATAC TAA TACA AATA CCA TC TAAAAATA
Consensus	(952)	TACTAATACAAA TACAAACAATAC TAA TACA AATA CCA TC TAAAAATA
	1001	1050
» p60 listeria ...	(1002)	CTAATACAAACTCAAATACTTAA TAGAATACAAA TC AAA TACGAATGCT
» 3:07	(443)	CTAATACAAACTCAAATACTTAA TAGAATACAAA TC AAA TACGAATGCT
« 3:05	(458)	CTAATACAAACTCAAATACTTAA TAGAATACAAA TC AAA TACGAATGCT
Consensus	(1002)	CTAATACAAACTCAAATACTTAA TAGAATACAAA TC AAA TACGAATGCT
	1051	1100
» p60 listeria ...	(1052)	AA CCAAGGTCTCTCAA CAATAACAGCAATTC AAGCGCAA GTGCTAT TAT
» 3:07	(493)	AA CCAAGGTCTCTCAA CAATAACAGCAATTC AAGCGCAA GTGCTAT TAT
« 3:05	(508)	AA CCAAGGTCTCTCAA CAATAACAGCAATTC AAGCGCAA GTGCTAT TAT
Consensus	(1052)	AA CCAAGGTCTCTCAA CAATAACAGCAATTC AAGCGCAA GTGCTAT TAT
	1101	1150
» p60 listeria ...	(1102)	TGCTGAA GCTCAA AAAACACCTTGGAA AAGCTTATT CA TGGGGTGGTAAAG
» 3:07	(543)	TGCTGAA GCTCAA AAAACACCTTGGAA AAGCTTATT CA TGGGGTGGTAAAG
« 3:05	(558)	TGCTGAA GCTCAA AAAACACCTTGGAA AAGCTTATT CA TGGGGTGGTAAAG
Consensus	(1102)	TGCTGAA GCTCAA AAAACACCTTGGAA AAGCTTATT CA TGGGGTGGTAAAG
	1151	1200
» p60 listeria ...	(1152)	GA CCAACTACATTTGAT TGCTC TGGTTACACTAAA TAGTAT TTGCTAAA
» 3:07	(593)	GA CCAACTACATTTGAT TGCTC TGGTTACACTAAA TAGTAT TTGCTAAA
« 3:05	(608)	GA CCAACTACATTTGAT TTCTC TGGTTACACTAAA TAGTAT TTGCTAAA
Consensus	(1152)	GA CCAACTACATTTGAT TGCTC TGGTTACACTAAA TAGTAT TTGCTAAA

зеленый – сайты рестрикции HindIII; желтый – участки несовпадения с последовательностью p60 антигена PubMed

**Рис. 1.** Результат сравнительного анализа нуклеотидной последовательности синтезированного гена p60 и нуклеотидной последовательности, представленной в базе данных PubMed

green – HindIII restriction site; yellow – mismatch sites between obtained gene and nucleotide sequences presented in PubMed database

**Fig. 1.** The results of comparative analysis of the p60 gene nucleotide sequences which was synthesized from cDNA and nucleotide sequences presented in PubMed database

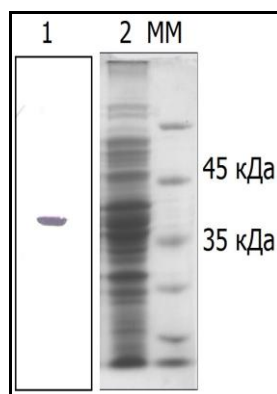
Аминокислотный анализ полученного рекомбинантного антигена p60 показал наличие повторяющихся NT последовательностей (рисунок 2). При этом в С-концевой части рекомбинантного белка повторяющаяся последовательность разрывает последовательность TPSKN. Также в данной области выявлена последовательность QQQTARPKARTEAAKPARA, являющаяся по литературным данным наиболее иммуногенным участком.

1	MSDKIIHLTD	DSFDTDVLKA	DGAILVDFWA	EWCGPCKMIA	PILDEIADEY
51	QGKLTVAKLN	IDQNPGTAPK	YGIRGIPTLL	LFKNGEVAAT	KVGALSQGL
101	KEFLDANLAG	SGSGHMHHH	HHSSGLVPRG	SGMKETAATAK	FERQHMDSPD
151	LGTDDDDKAM	VEEKTKETPV	IDQNTATHAV	KSGDTIWALS	VKYGVSVDI
201	MSWNNLSSSS	IYVGQKLAIK	QTANTATPKA	EVKTEAPAAE	KQAAFVVKEN
251	TNTNTATTEK	KETATQQQTA	PKAPTEAAKP	APAPS	TNTNA NKTNTNTNTN
301	NTNTPSKNTN	TNSNTNTNTN	SNTNANQGSS	NNNSNSSASA	IIAKAQKHLG
351	KAYSWGNGP	TFDCSGYTK	HHHHH*KL		

**Рис. 2.** Аминокислотная последовательность рекомбинантного р60 антигена *L. monocytogenes*

**Fig. 2.** Amino acid sequences of the recombinant р60 antigen of *L. monocytogenes*

Отобранный фрагмент гена р60 по сайтам NcoI и XhoI клонирован в плазмиду рЕТ32 и трансформирован в *E. coli* штамма BL21. Наличие рекомбинантного белка р60 в лизате трансформированных клеток определяли методом иммуноблота с помощью анти-6His Tag моноклональных антител (рисунок 3). Технология гексагистидинового метки широко применяется в генетической инженерии при получении рекомбинантных белков, позволяющая значительно повысить эффективность их очистки. В связи с этим, характерной чертой рекомбинантных белков является наличие данной метки.



1 – иммуноблот с анти-His tag моноклональными антителами; 2 – лизат клеток с рекомбинантным антигеном р60; MM – молекулярный маркер

**Рис. 3.** Иммуноблот лизата трансформированных клеток с анти-His Tag моноклональными антителами

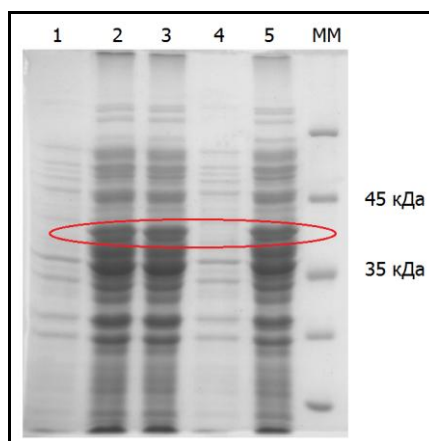
1 – western blot with anti-His Tag monoclonal antibody; 2 – lysate of transformed cell with the recombinant antigen р60; MM – molecular marker

**Fig. 3.** Western blot of transformed cell lysate with anti-His Tag monoclonal antibody

Из рисунка 3 видно, что моноклональные антитела против гексагистидинового метки выявляют белок с молекулярной массой приблизительно 40 кДа. Полученные результаты доказывают наличие рекомбинантного протеина в лизате трансформированных клеток. Более того, молекулярная масса обнаруженного белка соответствует предполагаемой массе рекомбинантного антигена.

При определении оптимальной концентрации IPTG, обеспечивающей максимальную экспрессию целевого белка, трансформированные клетки культивировались до достижения плотности 0,8 OD при длине волны 600 нм. Затем в разные пробирки с выращенной культурой добавляли IPTG в концентрациях 0,1, 0,2 и 0,4 мМ и продолжали инкубировать при комнатной температуре в течение 16 часов. Результат индукции рекомбинантного белка анализировался электрофорезом в полиакриламидном геле (рисунок 4). Из рисунка 4 видно,

что увеличение концентрации IPTG выше 0,1 мМ не оказывает значительного влияния на индукцию белка.



1, 4 – без индукции IPTG; 2 – IPTG в концентрации 0,4 мМ; 3 – IPTG в концентрации 0,2 мМ; 5 – IPTG в концентрации 0,1 мМ

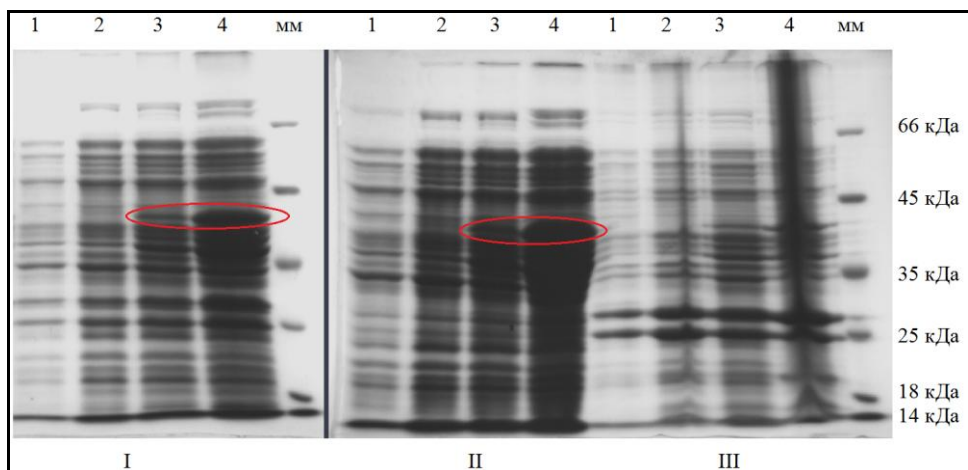
**Рис. 4.** Влияние концентрации IPTG на индукцию рекомбинантного антигена р60

1, 4 – without IPTG induction; 2 – IPTG in 0.4 mM concentration; 3 – IPTG in 0.2 mM concentration; 5 – IPTG in 0.1 mM concentration

**Fig. 4.** Effect of IPTG concentration on the induction of recombinant antigen p60

Для определения времени максимальной наработки белка в жидкую среду с трансформированными BL21 с плотностью клеток 0,8 OD при длине волны 600 нм добавляли IPTG в концентрации 0,1 мМ и через каждые 2, 4, 8 и 16 часов отбирали по 5 мл для электрофоретического анализа (рисунок 5). Из рисунка 5 видно, что рекомбинантный белок р60 начинает экспрессироваться через 8 часов и достигает своего максимум через 16 часов. При этом белок экспрессируется в тельца включения, так как после центрифугирования дезинтеграта белок переходит в осадок. Учитывая полученные данные, оптимальными параметрами экспрессии белка является индукция в течение 16 часов с помощью IPTG в концентрации 0,1 мМ.





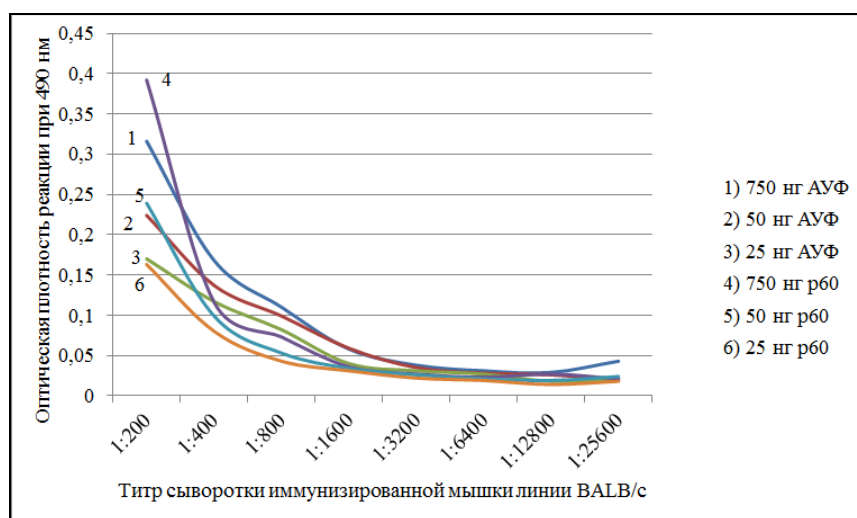
мм – молекулярный маркер; 1 – дезинтеграт клеток выращенных в течение 2 часов после добавления IPTG; 2 – дезинтеграт клеток, выращенных в течение 4 часов после добавления IPTG; 3 – дезинтеграт клеток, выращенных в течение 8 часов после добавления IPTG; 4 – дезинтеграт клеток, выращенных в течение 16 часов после добавления IPTG; I – дезинтеграт клеток; II – осадок дезинтеграта клеток; III – надосадочная жидкость дезинтеграта клеток

**Рис. 5.** Результаты гетерологической экспрессии антигена p60 *L. monocytogenes* в зависимости от времени действия IPTG

mm – molecular marker; 1 – lysate of cells which were grow for 2 hours after the addition of IPTG; 2 – lysate of cells which were grow for 4 hours after the addition of IPTG; 3 – lysate of cells which were grow for 8 hours after the addition of IPTG; 4 – lysate of cells which were grow for 16 hours after the addition of IPTG; I – cell lysates; II – pellet of cell lysates; III – supernatant of cell lysates

**Fig. 5.** The results of heterologous expression of the antigen p60 depending on the IPTG incubation time

Определение специфичности полученного рекомбинантного антигена p60 проводили иммуноферментным анализом с использованием специфической поликлональной сыворотки листерий. Поликлональную сыворотку получали путем иммунизации мышей линии BALB/c вакцинным штаммом *L. monocytogenes* АУФ (рисунок 6). Лиофилизированную вакцину растворяли в соответствии с предписаниями производителя в 1 мл  $\mu$ Q воды. Мышей иммунизировали двукратно разведенной вакциной в дозе 5 мкл. Через три дня после второй иммунизации у мышей отбиралась кровь для получения сыворотки.



**Рис. 6.** Титр антител сыворотки против *L. monocytogenes* АУФ в ИФА с дезинтегратом клеток, содержащий рекомбинантный p60 антиген

**Fig. 6.** Titer of antibody in serum against *L. monocytogenes* AUF used in ELISA with cell lysate containing recombinant p60 antigen

Из рисунка 6 видно, что поликлональная сыворотка мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *L. monocytogenes*, АУФ одинаково реагирует как с вакцинным штаммом, так и с дезинтегратором клеток продуцентов рекомбинантного антигена р60.

В работе описаны результаты получения рекомбинантного антигена р60 *L. monocytogenes*. Для получения гена р60 использовалась геномная ДНК штаммов *L. monocytogenes*, распространенных в северных регионах Казахстана. Секвенирование полученного фрагмента гена р60 показало незначительные изменения в сравнении с последовательностью, представленной в базе данных PubMed. Kohler S. et al. (1990) при изучении гена р60 в различных штаммах листерий методом ДНК гибридизации использовали ДНК зонд DdeI 1,6 длиной тысяча пар оснований, содержащий полный ген антигена *L. monocytogenes*. Данным зондом авторами были выделены гены р60 шести различных патогенных штаммов листерий. Полноразмерную ДНК антигена р60 этих штаммов листерий исследовали рестрикционным анализом, используя рестриктазу HindIII. Гомологичные по размеру фрагменты были определены у всех исследованных штаммов листерий, кроме *L. grayi*. В результате были определены три фрагмента HindIII длиной 1,8, 1,2 и 0,4 тысяч пар оснований [22].

Andreas Buberl et al. (1992), используя полимеразную цепную реакцию, синтезировали ген р60 из хромосомной ДНК различных штаммов листерий. Анализируя нуклеотидную последовательность, авторы выявили некоторые структурные особенности данного участка гена. Например, участки длиной 120 аминокислот с N- и C-конца белка обладали высокой консервативностью среди изучаемых штаммов листерий, тогда как средняя часть белка р60 длиной 240 аминокислот существенно различались. Средняя часть состояла из трех структурных элементов, регион из повторяющихся T- и N-последовательностей, затем мотив TPSKN и снова повторяющиеся последовательности T- и N-аминокислот, характерных для антигена р60 *L. monocytogenes*. Интересно, что авторы выявили аналогичные регионы и у других видов *Listeria* [23].

Проведенные исследования по определению специфичности полученного рекомбинантного антигена р60 *L. monocytogenes* показали, что сыворотки животных, вакцинированных вакциной *L. monocytogenes* АУФ, специфически реагировали с исследуемым антигеном. Аналогичные исследования были получены Gentschev I. et al. (1992), описавшим выработку антител специфичных как к нативному, так и секретируемому денатурированному белку р60 *L. monocytogenes*. Выбор данного белка авторами был обоснован тем, что сыворотки людей, больных листериозом, обладали высоким титром анти-р60 антител (24).

Buberl A. соавторами (1994) провели картирование эпитопов коротких аминокислотных последовательностей белка р60 с анти-р60 сыворотками от больных листериозом людей. Выбор двух коротких пептидов из различных участков антигена р60 *L. monocytogenes*: TDKAVSTRVARTQEVKKETT и QQQTAPKARTEAAKPARAP авторами был основан по трем причинам. Во-первых, эти части антигена р60 показали сравнительно высокий профиль гидрофильности, что предполагает более сильный иммунный ответ. Во-вторых, сравнительные и иммунологические исследования полученных последовательностей показали, что N- и C-концевые регионы антигена р60 консервативны для различных листерий, но иммуногены только у *L. monocytogenes*. В-третьих, иммунизация синтетическими пептидами из повторяющихся T-N областей антигена р60 не приводит к приемлемому титру антител. Картирование показало, что только TDKAVSTRVARTQEVKKETT и QQQTAPKARTEAAKPARAP последовательности антигена р60 способны вызывать образование достаточно высокого титра антител. При этом сыворотки, полученные к данным синтетическим пептидам, реагировали с нативными белками р60 различных серотипов *L. monocytogenes* (25).

## ВЫВОДЫ

Получен рекомбинантный антиген р60 *L. monocytogenes*, который специфически реагировал с сыворотками от иммунизированных животных. Антиген пригоден для получения специфических анти-лептоспирозных сывороток и разработки диагностических тест-систем.

## Финансирование

Исследования проводились при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках Межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии» на 2012-2014 гг.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gugnani H.C. Some emerging food and water borne pathogens // Journal of Communication Disorders. – 1999. – Vol. 31. – P. 65-72.
2. Васильев Д.А., Барышников П.И. Использование иммуноферментного анализа для диагностики листериоза // Ветеринария. – 1989. – №4. – С. 60-62.
3. Bubert A., Riebe J., Schnitzler N., Schönberg A., Goebel W., Schubert P. Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR // Journal of Clinical Microbiology. – 1997. – Vol. 35. – P. 179-183.
4. Volokhov D., Rasooly A., Chumakov K., Chizhikov V. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40. – P. 4720-4728.
5. Paoli G.C., Chen C.-Y., Brewster J.D. Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes* // Journal of Immunological Methods. – 2004. – Vol. 289. – P.147-155.
6. Palumbo J.D., Borucki M.K., Mandrell R.E., Gorski L. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41. – P. 564-571.
7. Lathrop A.A., Jaradat Z.W., Haley T., Bhunia A.K. Characterization and application of a *Listeria monocytogenes* reactive monoclonal antibody C11E9 in a resonant mirror biosensor // Journal of Immunological Methods. – 2003. – Vol. 281. – P. 119-128.
8. Farber J.M., Sanders G.W., Speirs J.I. Methodology for isolation of *Listeria* from foods – a Canadian perspective // J. AOAC Int. – 1988. – Vol. 71. – P. 675-678.
9. Kuhn M., Goebel W. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells // Infection and Immunology. – 1989. – Vol. 57. – P. 55-61.
10. Gentshev I., Sokolovic Z., Kohler S., Krohne G.F., Hof H., Wagner J., Goebel W. Identification of p60 antibodies in human sera and presentation of this listerial antigen on the surface of attenuated salmonellae by the HlyB-HlyD secretion system // Infection and Immunology. – 1992. – Vol. 60. – P. 5091-5098.
11. Kolb-Maurer A., Pilgrim S., Kampgen E., McLellan A. D., Brocker E.-B., Goebel W., Gentshev I. Antibodies against listerial protein 60 act as an opsonin for phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by human dendritic cells // Infection and Immunology. – 2001. – Vol. 69. – P. 3100-3109.
12. Bubert A., Kuhn M., Goebel W., Kohler S. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species // Journal of Bacteriology. – 1992. – Vol. 174. – P. 8166-8171.

13. Kohler S., Bubert A., Vogel M., Goebel W. Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level // *Journal of Bacteriology*. – 1991. – Vol. 173. – P. 4668-4674.
14. Whisstock J.C., Lesk A.M. SH3 domains in prokaryotes // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1999. – Vol. 24. – P. 132-133.
15. Wuenscher M.D., Kohler S., Bubert A., Gerike U., Goebel W. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity // *Journal of Bacteriology*. – 1993. – Vol. 175. – P. 3491-3501.
16. Sijts A.J.A.M., Pilip I., Pamer E.G. The *Listeria monocytogenes*-secreted p60 Protein Is an N-end Rule Substrate in the Cytosol of Infected Cells // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 19261-19268.
17. Ruhland G., Hellwigg M., Wanner G. Fiedler F. Cell-surface location of *Listeria*-specific protein p60 – detection of *Listeria* cells by indirect immunofluorescence // *Journal of General Microbiology*. – 1993. – Vol. 139. – P. 609-616.
18. Boyer J.L., Ketner G. Genetic analysis of a potential zinc-binding domain of the adenovirus E4 34k protein // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – P. 14969-14978.
19. Hanahan D. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Journal of Molecular Biology*. – 1983. – Vol. 166. – P. 557-580.
20. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М: Мир, 1982.
21. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings National Academic Sciences USA*. – 1977. – Vol. 74. – P. 5463-5467.
22. Kohler S., Leimeister-Wachter M., Chakraborty T., Lottspeich F., Goebel W. The Gene Coding for Protein p60 of *Listeria monocytogenes* and Its Use as a Specific Probe for *Listeria monocytogenes* // *Infection and immunity*. – 1990. – Vol. 58, №6. – P. 1943-1950.
23. Bubert A., Kuhn M., Goebel W., Kohler S. Structural and Functional Properties of the p60 Proteins from Different *Listeria* Species // *Journal of Bacteriology*. – 1992. – Vol. 174. – P. 8166-8171.
24. Gentshev I., Sokolovic Z., Kohler S., Krohne G. F., Hof H., Wagner J., Goebel W. Identification of p60 antibodies in human sera and presentation of this listerial antigen on the surface of attenuated *Salmonellae* by the HlyB-HlyD secretion system // *Infect. Immun.* – 1992. – Vol. 60. – P. 5091-5098.
25. Bubert A., Schubert P., Kohler S., Frank R., Goebel W. Synthetic Peptides Derived from the *Listeria monocytogenes* p60 Protein as Antigens for the Generation of Polyclonal Antibodies Specific for Secreted Cell-Free *L.monocytogenes* p60 Proteins // *Applied and environmental microbiology*. – 1994. – Vol. 60. – P. 3120-3127.

## REFERENCES

1. Gugnani H.C. Some emerging food and water borne pathogens. *Journal of Communication Disorders*, 1999, vol. 31, pp. 65-72. PMID:10810592.
2. Vasilev D.A., Baryshnikov P.I. Using enzyme immunoassay for the diagnosis of listeriosis. *Veterinary Medicine*, 1989, no. 4, pp. 60-62.
3. Bubert A., Riebe J., Schnitzler N., Schönberg A., Goebel W., Schubert P. Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, vol. 35, pp. 179-183. PMID:8968903.
4. Volokhov D., Rasooly A., Chumakov K., Chizhikov V. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, vol. 40, pp. 4720-4728. PMID:12454178.
5. Paoli G.C., Chen C.-Y., Brewster J.D. Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Immunological Methods*, 2004, vol. 289, pp. 147-155. PMID:15251420.

6. Palumbo J.D., Borucki M.K., Mandrell R.E., Gorski L. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, vol. 41, pp. 564-571. PMID:12574247.
7. Lathrop A.A., Jaradat Z.W., Haley T., Bhunia A.K. Characterization and application of a *Listeria monocytogenes* reactive monoclonal antibody C11E9 in a resonant mirror biosensor. *Journal of Immunological Methods*, 2003, vol. 281, pp. 119-128. PMID:14580886.
8. Farber J.M., Sanders G.W., Speirs J.I. Methodology for isolation of *Listeria* from foods – a Canadian perspective. *J. AOAC Int.*, 1988, vol. 71, pp. 675-678. PMID:3292513.
9. Kuhn M., Goebel W. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infection and Immunology*, 1989, vol. 57, pp. 55-61. PMID:2491841.
10. Gentschev I., Sokolovic Z., Kohler S., Krohne G.F., Hof H., Wagner J., Goebel W. Identification of p60 antibodies in human sera and presentation of this listerial antigen on the surface of attenuated salmonellae by the HlyB-HlyD secretion system. *Infection and Immunology*, 1992, vol. 60, pp. 5091-5098. PMID:1452342.
11. Kolb-Maurer A., Pilgrim S., Kampgen E., McLellan A.D., Brocker E.-B., Goebel W., Gentschev I. Antibodies against listerial protein 60 act as an opsonin for phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by human dendritic cells. *Infection and Immunology*, 2001, vol. 69, pp. 3100-3109. PMID:11292729.
12. Bubert A., Kuhn M., Goebel W., Kohler S. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *Journal of Bacteriology*, 1992, vol. 174, pp. 8166-8171. PMID:1459966.
13. Kohler S., Bubert A., Vogel M., Goebel W. Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level. *Journal of Bacteriology*, 1991, vol. 173, pp. 4668-4674. PMID:1906869.
14. Whisstock J.C., Lesk A.M. SH3 domains in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, vol. 24, pp. 132-133. PMID:10322416.
15. Wuenscher M.D., Kohler S., Bubert A., Gerike U., Goebel W. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *Journal of Bacteriology*, 1993, vol. 175, pp. 3491-3501. PMID: 8099071.
16. Sijts A.J.A.M., Pilip I., Pamer E.G. The *Listeria monocytogenes*-secreted p60 Protein Is an N-end Rule Substrate in the Cytosol of Infected Cells. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, pp. 19261-19268. PMID:9235920.
17. Ruhland G., Hellwigg M., Wanner G. Fiedler F. Cell-surface location of *Listeria*-specific protein p60 - detection of *Listeria* cells by indirect immunofluorescence. *Journal of General Microbiology*, 1993, vol. 139, pp. 609-616. PMID:8473866.
18. Boyer J.L., Ketner G. Genetic analysis of a potential zinc-binding domain of the adenovirus E4 34k protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, pp. 14969-14978. PMID:10747932.
19. Hanahan D. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 1983, vol. 166, pp. 557-580. PMID:6345791.
20. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Molecular Cloning*. - Moscow: Mir, 1982.
21. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings National Academic Sciences USA*, 1977, vol. 74, pp. 5463-5467. PMID:271968.
22. Kohler S., Leimeister-Wachter M., Chakraborty T., Lottspeich F., Goebel W. The Gene Coding for Protein p60 of *Listeria monocytogenes* and Its Use as a Specific Probe for *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity*, 1990, vol. 58, no. 6, pp. 1943-1950. PMID:2111287.
23. Bubert A., Kuhn M., Goebel W., Kohler S. Structural and Functional Properties of the p60 Proteins from Different *Listeria* Species. *Journal of Bacteriology*, 1992, vol. 174, pp. 8166-8171. PMID:1459966.

24. Gentschev I., Sokolovic Z., Kohler S., Krohne G.F., Hof H., Wagner J., Goebel W. Identification of p60 antibodies in human sera and presentation of this listerial antigen on the surface of attenuated Salmonellae by the HlyB-HlyD secretion system. *Infect. Immun.*, 1992, vol. 60, pp. 5091-5098. PMID:1452342.

25. Bubert A., Schubert P., Kohler S., Frank R., Goebel W. Synthetic Peptides Derived from the *Listeria monocytogenes* p60 Protein as Antigens for the Generation of Polyclonal Antibodies Specific for Secreted Cell-Free *L.monocytogenes* p60 Proteins. *Applied and environmental microbiology*, 1994, vol. 60, pp. 3120-3127. PMID:7944357.

## РЕКОМБИНАНТТЫ p60 *LISTERIA MONOCYTOGENES* АНТИГЕНІН АЛУ

Мұқантаев Қ.Н.<sup>1</sup>, Бегәлиева Ә.<sup>1</sup>, Іңірбай Б.<sup>1</sup>, Райымбек Г.<sup>1</sup>, Қазыкен Д.<sup>1</sup>, Сегізбаева Г.Ж.<sup>2</sup>, Шевцов А.Б.<sup>1</sup>, Мұқанов Қ.Қ.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ұлттық Биотехнология Орталығы

Валиханов к-сі, 13/1, Астана, 010000, Қазақстан

<sup>2</sup>Л. Гумилев атындағы Еуразия Ұлттық Университеті

Мунайтпасов к-сі, 5, Астана, 010000, Қазақстан

*lil@biocenter.kz*

### ТҮЙІН

Листерияға диагноз қоюға арналған иммунологиялық әдістерді жетілдіру тамақ токсикоинфекцияларының алдын-алу шараларындағы көкейтесті мәселе болып табылады. Қазіргі кезде, *L. monocytogenes*-тің диагностикалық антигендерінің ішінде р60 ақуыз ең басымдыққа ие антиген болып саналады.

Полимеразды тізбекті реакция әдісімен ұзындығы 625 нуклеотид жұптары негізінде р60 генінің орталық бөлігі синтезделді. Жұмыс барысында Қазақстан Республикасында бөлініп алынған *L. monocytogenes* штамдарының ДНК-сын пайдаландық.

Алынған ген листериялардың р60 антигенімен бірдей сипатты құрылымдық ерекшеліктерін көрсетті. Синтезделген ген рЕТ32 экспрессиялаушы плазмидаға енгізілді. Ішек таяқшасының BL21 штамы трансформацияланды. Гетерологиялық экспрессияның нәтижесінде рекомбинантты антигеннің болжамды салмағына сәйкес келетін 40 кДа молекулалық салмағы бар протеин алынды. Иммундыферменттік талдау әдісі *L. monocytogenes* р60 антигеніне қарсы антиденелердің алынған рекомбинантты антигенмен айрықша белсенділігін көрсетті.

**Негізгі сөздер:** р60 антиген, листерия, рекомбинантты ақуыз, ген, праймер, генетикалық құрылым.