

УДК 602.68:57.083.3

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА БРУЦЕЛЛ – Cu/Zn-ЗАВИСИМОЙ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ (SOD)

А.В. Шустов, С.З. Ескендинова, Е. Манат, Г.Б. Унышева, Н.И. Сарина

Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан
saule_e@mail.ru

Периплазматический белок Cu-Zn-SOD (супероксиддисмутаза) является одним из главных ферментов антиоксидантной системы микроорганизмов, который рассматривается как один из универсальных механизмов патогенеза при инфекционных заболеваниях, а показатели, отражающие сдвиги в уровнях антиоксидантных ферментов, являются ключевыми факторами, обуславливающими прогнозирование исхода заболевания. Известно, что основным механизмом обезвреживания микроорганизмов, в том числе бруцелл при их фагоцитозе, является кислородозависимый механизм. При этом фагоциты убивают поглощенные микроорганизмы разными кислородными радикалами. Нейтрализуя свободные кислородные радикалы посредством действия антиоксидантных ферментов - каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутаза (СОД), микроорганизмы приобретают резистентность и адаптацию к характерному для фагоцитов окислительному стрессу, вследствие чего они выживают в очаге воспаления, а нередко и внутри фагоцитов. Персистенция микроорганизмов в организме ухудшает течение инфекционного процесса, тем самым обуславливая хроническое течение бруцеллезной инфекции. Следовательно, Cu-Zn-SOD, находясь в периплазме бруцелл, защищает мембранные и периплазматические структуры от экзогенного воздействия супероксидов и является одним из факторов патогенности.

В результате исследований проведено моделирование гена и дизайн *in silico* генетических конструкций для синтеза рекомбинантного антигена бруцелл - Cu/Zn-зависимой супероксиддисмутаза (SOD). Подобраны первичные структуры олигонуклеотидов для синтеза целевого гена SOD с последовательностями, кодон-оптимизированными для экспрессии в *E.coli*.

Методом твердофазного амидофосфитного синтеза на автоматическом ДНК-синтезаторе получены олигонуклеотидные праймеры для синтеза целевого гена SOD *de novo*. Проведена очистка олигонуклеотидов до чистоты >95%. Проведён синтез *de novo* в синтетической ПЦР гена SOD.

Полученный ген клонирован в составе высококопийных неэкспрессионных бактериальных плазмид и в составе экспрессирующей конструкции на основе вектора для бактериальной экспрессии рЕТ22b(+). Проведён эксперимент по оценке накопления рекомбинантного антигена SOD бруцелл в культурах экспрессирующего штамма BL21(DE3), трансформированного полученной конструкцией рЕТ22/SOD.

Ключевые слова: рекомбинантный антиген, супероксиддисмутаза, праймеры, бруцеллез.

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез - одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний человека и животных - выявлен на всех обитаемых континентах земли. В Казахстане заболевания людей и животных бруцеллезом зарегистрированы практически во всех регионах. В последние годы серьезное внимание уделяется возбудителю бруцеллеза как возможному эффективному средству биологического терроризма. Полигостальность бруцеллеза, полиморфизм возбудителя, хроническое, часто бессимптомное течение заболевания у человека и животных, разнообразие клинических проявлений делают его трудно диагностируемым, что в свою очередь отражается негативно на эффективности противобруцеллезных мероприятий [1].

Учитывая сложную эпизоотическую обстановку по бруцеллезу, сложившуюся в республике, остро встает вопрос об обеспеченности ветеринарной службы передовыми диагностическими средствами. Одним из потенциалов повышения чувствительности и специфичности серологических тестов является использование рекомбинантных аналогов иммунодоминантных белков патогенных бруцелл, спектр которых окончательно определен и изучен в настоящее время [2-4]. На современном этапе технология получения рекомбинантных белков является основой в разработке и создании диагностических препаратов нового поколения при ряде многих инфекционных заболеваний. Технология, основанная на использовании генетически трансформированного штамма-продуцента, в отличие от традиционных технологий, позволяет получать высокоочищенные стабильные препараты рекомбинантных антигенов возбудителя болезни.

Периплазматический белок Cu-Zn-SOD (супероксиддисмутаз) является одним из главных ферментов антиоксидантной системы микроорганизмов, который рассматривается как один из универсальных механизмов патогенеза при инфекционных заболеваниях, а показатели, отражающие сдвиги в уровнях антиоксидантных ферментов, являются ключевыми факторами, обуславливающими прогнозирование исхода заболевания. Известно, что основным механизмом обезвреживания микроорганизмов, в том числе бруцелл при их фагоцитозе, является кислородозависимый механизм. При этом фагоциты убивают поглощенные микроорганизмы разными кислородными радикалами. Нейтрализуя свободные кислородные радикалы посредством действия антиоксидантных ферментов - каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы (СОД), микроорганизмы приобретают резистентность и адаптацию к характерному для фагоцитов окислительному стрессу, вследствие чего они выживают в очаге воспаления, а нередко и внутри фагоцитов. Персистенция микроорганизмов в организме ухудшает течение инфекционного процесса, тем самым обуславливая хроническое течение бруцеллезной инфекции. Следовательно, Cu-Zn-SOD, находясь в периплазме бруцелл, защищает мембранные и периплазматические структуры от экзогенного воздействия супероксидов и является одним из факторов патогенности [5-10].

Исследователями определено протективное действие антиоксидантного фермента Cu-Zn-SOD *Brucella abortus*, выраженное в значительной индукции пролиферации Т-клеток и продукции гамма-интерферона у инфицированных мышей. Так, вакцинация мышей клетками *Escherichia coli*, экспрессирующей фермент Cu-Zn-SOD *B. abortus*, формировала у них защиту против бруцелл. Использование с этой же целью плазмидной ДНК, включающей Cu-Zn-SOD ген *B. abortus*, так же индуцировало гуморальный и клеточный иммунный ответ против возбудителя бруцеллеза. Протективный эффект этой вакцины был сходен с эффектом вакцинации штаммом *B. abortus* RB5 [11-12].

Таким образом, периплазматический белок бруцелл Cu-Zn-SOD активно участвует в индукции иммунного ответа и, следовательно, является потенциальным субстратом, на основе которых можно разработать эффективные препараты для диагностики и профилактики бруцеллеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штаммы для экспрессии рекомбинантного белка SOD *E. coli* BL21(DE3) и BL21(DE3) pLys из лабораторной коллекции (Novagen, USA). В качестве вектора для создания экспрессирующей конструкции использовали плазмиду pRS2 (из лабораторной коллекции; pRS2 – плазида на основе pUC18 с обогащённым полилинкером). Клетки *E. coli* выращивали на жидкой или агаризованной среде Лурия-Бертани (LB) (1% бакто-триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl).

Поиск кандидатных антигенов для использования в диагностической иммуноферментной тест-системе для диагностики бруцеллеза проводили с использованием баз данных NCBI PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) и NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Биоинформатические исследования и планирование генноинженерных работ проводили с использованием пакета программ Vector NTI 11.5 (Invitrogen, США).

При создании *in silico* последовательности выбранного антигена бруцелл для последующего синтеза его гена были построены множественные сравнения (элайнменты) аминокислотных последовательностей высокоиммуногенных белков бруцелл. Для создания элайнментов использовали программу AlignX из пакета Vector NTI 11.5 (Invitrogen, США). Обратную трансляцию проводили с использованием инструмента BackTranslation, при этом контролировали возможность появления шпилек в 5'-концевой области гена. Расчёт первичных структур олигонуклеотидов для синтеза *de novo* гена целевого антигена проводили с использованием программы Oligo 7. Все праймеры были рассчитаны с таким перекрытием, чтобы использовать их в ПЦР с температурой отжига 60°C. При расчётах олигонуклеотидных праймеров для синтеза гена *de novo*, праймеры разделяли на две группы – «внутренние» и «фланкирующие». «Внутренние» праймеры были 100% гомологичны соответствующему участку рассчитанной последовательности синтезируемого гена, совокупность «внутренних» праймеров покрывает всю длину гена. При этом «внутренние» праймеры чередуются в порядке Sense-Antisense-Sense-Antisense- т.д. и все соседние друг с другом праймеры имеют области перекрытия не менее 15 нт. «Фланкирующие» праймеры были нацелены на концы синтезируемого гена и несут уникальные сайты узнавания рестриктаз для последующего клонирования синтезированного *de novo* фрагмента ДНК. Смесь «внутренних» праймеров (до 20 шт) используются на I раунде ПЦР, на II раунде ПЦР проводится только с двумя «фланкирующими» праймерами.

Синтез олигонуклеотидных праймеров для получения гена de novo

Синтез олигонуклеотидных праймеров проводилось в лаборатории органического синтеза. Очистку олигонуклеотидов после синтеза проводили методом гель-электрофореза в 15% полиакриламидном геле с последующей пассивной элюцией олигонуклеотидов в буфер TE и последующим переосаждением. Оценку концентрации олигонуклеотидов проводили с использованием спектрофотометра NanoDrop. Все праймеры разводили до концентрации 50 рМ/мкл (стоковая концентрация). В ПЦР праймеры использовали в конечной концентрации 0,2-2 рМ/мкл (концентрации подбирали экспериментально).

Синтез гена de novo

Для проведения ПЦР использовали высокоточную термофильную полимеразу Phusion HotStart DNA polymerase (ThermoScientific, США), поставляемую вместе с ферментом. Для проведения ПЦР готовили Phusion Master-Mixt по следующему протоколу: (712 мкл H₂O MQ+200 мкл 5X буфер Phusion (содержащий 7,5 mM MgCl₂)+8 мкл dNTP (смесь четырёх трифосфатов, каждого по 25 mM)). В итоге получали 920 мкл Master-Mixt, которую смешивали с праймерами и полимеразой для проведения двухраундовой ПЦР, как описано ниже.

Приготовление реакционных смесей для ПЦР с полимеразой Phusion (общий протокол). В тонкостенную пробирку для ПЦР объемом 0,2 мл вносили: 23 мкл Phusion Master-Mixt; 2 мкл смеси праймеров (каждого 50 pM/мкл); 0,2 мкл полимеразы Phusion HotStart DNA Polymerase (5 ед/мкл); 10 нг матрицы (если используется, в объеме <1 мкл).

Состав реакционной смеси I раунда амплификации: 23 мкл Phusion Master-Mixt; 2 мкл смеси «внутренних» праймеров (каждый праймер присутствует в равной концентрации, общая концентрация 50 pM/мкл); 0,2 мкл полимеразы Phusion (5 ед/мкл). Программа термоциклирования для амплификатора Corbett PalmCycler составляла 95°C - 10 мин. Далее осуществляли 30 трёхсегментных циклов: (95°C - 1 мин; 55°C - 1 мин (на 5°C меньше расчётной температуры плавления праймеров); 72°C - 1 мин (по 1 мин на 1 кб длины амплификата) и завершающий сегмент - 72°C - 10 мин).

Состав реакционной смеси II раунда амплификации: 46 мкл Phusion Master-Mixt; 1 мкл «фланкирующего» праймера Sense; 1 мкл «фланкирующего» праймера Anti-Sense; 0,2 мкл полимеразы Phusion (5 ед/мкл); 1 мкл продукта ПЦР I раунда (матрица). Программа термоциклирования для амплификатора Corbett PalmCycler – аналогично программе для I раунда: 95°C - 10 мин.

Продукт ПЦР II раунда анализировали гель электрофорезом в 1% агарозе. В завершение оценивали выход продукта ПЦР II раунда и его чистоту.

Для лигирования фрагментов ДНК использовали ДНК-лигазу фага T4 производства «Promega» (США). Состав буфера: 250 mM трис-HCl pH 7,2, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM ДТТ, 5% полиэтиленгликоль (PEG 3500). Реакцию лигирования проводили в течение ночи при +16°C.

Гидролиз плазмидной ДНК проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции NcoI и EcoRI (Fermentas, Литва) в оптимальных буферных и температурных условиях, согласно рекомендациям производителей.

Трансформация клеток E. coli

Для трансформации клеток лабораторных штаммов *E. coli* (BL21(DE3) и BL21(DE3)pLys) использовали метод подготовки электрокомпетентных клеток с RbCl-CaCl₂. Эффективность трансформации составляла ~0,5-1x10⁸ трансформантов на 1 мкг суперскрученной ДНК плазмиды pGEM-T. При клонировании фрагментов ДНК в плазмиде pGEM-T для поиска рекомбинантов использовали селекцию на среде с ампициллином и бело-голубую селекцию на среде с добавлением хромогенной системы IPTG и X-gal.

Гетерологичная экспрессия клонированных генов

Полученными конструкциями трансформировали электрокомпетентные клетки *E. coli* штаммов BL21(DE3) и BL21(DE3)pLysS, трансформантов высевали на селективную среду с ампициллином (100 мкг/мл). Выросшими колониями инокулировали две колбы, содержащие по 100 мл среды LB (*Lysogeny broth*) с добавлением ампициллина до 100 мкг/мл. Культуры выращивали при 37°C до ОП₆₀₀ = 0,8. Затем индуцировали экспрессию рекомбинантного белка добавлением IPTG до 0,5 mM (в одну колбу) и до 1 mM (во вторую колбу). После добавления индуктора температуру инкубации снижали до 28°C и продолжали культивирование, отбирая пробы (10 мл) через 4, 6 и 8 ч. индукции и после индукции в течение ночи. Собранные пробы обрабатывали следующим образом. Биомассу бактерий собирали центрифугированием (5000g, 10 мин) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора, следуя рекомендациям производителя прибора. Полученный лизат осветляли центрифугированием (1000g, 30 мин). По 2 мкл каждого осветлённого лизата использовали для приготовления проб для SDS-PAGE.

Электрофорез с исходным лизатом, растворимой и нерастворимой фракцией, а также элюатом и ренатурированным белком проводили в 14% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по методу J. Laemmli et al. на аппарате для вертикального электрофореза (Bio-Rad, США). Тщательно промытые и обезжиренные стеклянные пластины (7x10) монтировали с помощью прокладок и зажимов. Для предотвращения утечки растворов прокладки смазывали вазелином. Заливали пространство между пластинками раствором для разделяющего геля, состоящего из 3,5 мл 30% акриламида; 3,1 мл 1% бисакриламида; 7,5 мл 1,5 M трис HCl (pH 8,7); 6,5 мл дистиллированной воды; 0,03 мл 10% ДСН; 0,001 мл ТЕМЕД и 0,01 мл 10% персульфата аммония. После полимеризации нижнего геля вставляли гребенку и заливали оставшееся пространство раствором для концентрации геля, приготовленного по следующей прописи: 1 мл 30% акриламида; 1 мл 1% бисакриламида; 2,5 мл 0,5 M трис-HCl (pH 6,8); 5,35 мл дистиллированной воды; 0,01 мл 10% ДСН; 0,005 мл ТЕМЕД и 0,05 мл 10% персульфата аммония.

Буфер для разведения образцов готовили следующим образом: к 0,315 мл 1М трис-НСl (рН 6,8) добавляли 0,25 мл 2-меркаптоэтанола; 0,5 мл глицерина, 0,115 мл 10% ДСН; 0,05 мл 0,1% бромфенолового синего и доводили объем до 5 мл дистиллированной водой. Образцы разводили в соотношении 1:1, кипятили на водяной бане в течение 3-5 минут и охлаждали.

Электрофорез проводили при силе тока 20 мА на камеру. По завершении процесса гель вынимали из пластин, окрашивали в течение 1 часа в растворе Coomassie R-250 и отмывали в нескольких сменах обезбачивающего раствора до полного исчезновения фоновой окраски.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн in silico гена диагностически важного антигена бруцелл - Cu/Zn-зависимой супероксиддисмутазы (SOD).

Из международной базы данных Genbank были загружены последовательности гена Cu/Zn-зависимой супероксиддисмутазы для различных видов возбудителя бруцеллеза: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ceti*. Как видно из множественного сравнения выведенных аминокислотных последовательностей Cu/Zn-SOD, представленного на рисунке 1, данный белок демонстрирует очень высокий эволюционный консерватизм. С учётом эволюционного консерватизма данного антигена, собранная совокупность данных полностью охватывает антигенное разнообразие супероксиддисмутазы у бруцелл, эпизоотологически актуальных для животноводства Казахстана, а также видов бруцелл, опасных для человека. Была выведена консенсусная аминокислотная последовательность антигена Cu/Zn-SOD (рисунок 1), которая использована для расчетов последовательности гена Cu/Zn-SOD. Первые 20 аминокислотных остатков в последовательности непротрансформированного белка-предшественника Cu/Zn-зависимой супероксиддисмутазы представляют собой сигнальный пептид, который отщепляется от белка-предшественника в процессе транспорта в физиологический компартмент в котором накапливается Cu/Zn-SOD (периплазматическое пространство бактериальной клетки). Поскольку указанный сигнальный пептид не присутствует в последовательности зрелого антигена Cu/Zn-SOD, для синтеза целевого гена была использована последовательность зрелого антигена без сигнального пептида.

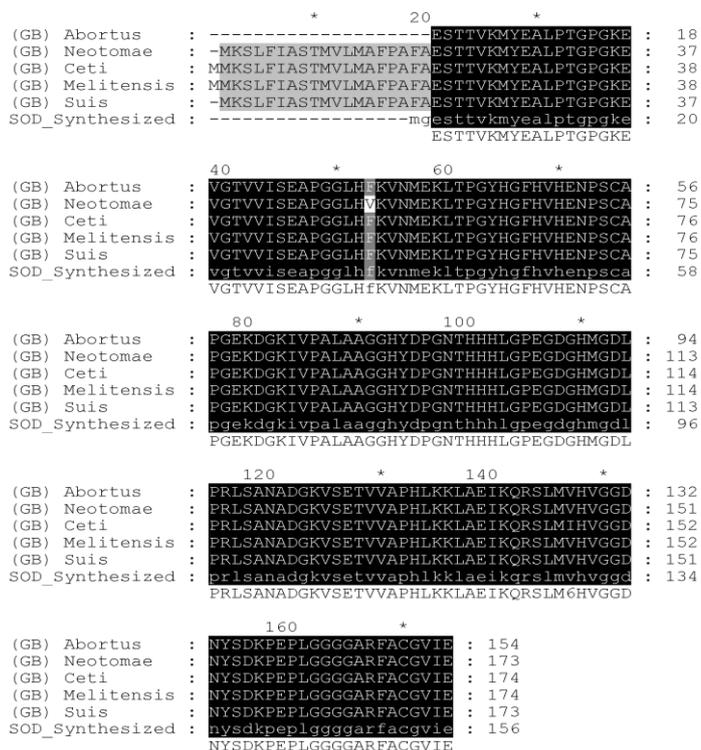


Рис. 1. Множественное сравнение выведенных аминокислотных последовательностей Cu/Zn-зависимой супероксиддисмутазы для видов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*.

Рассчитанная последовательность фрагмента ДНК длиной 496 пн, содержащего ген Cu/Zn-SOD и линкеры для клонирования, показаны ниже (подчёркнуты сайты NcoI на 5'-конце и EcoRI на 3'-конце для клонирования в экспрессирующий вектор pET22b(+)):

5'-
 CCACCATATGGCCATGGGGGAGAGCACAACAGTCAAAATGTATGAGGCGCTGCCTACTGGTCCGGGC
 AAAGAGGTAGGGACTGTTGTCATTAGCGAAGCCCCAGGGGGCCTGCATTTCAAGGTAATATGGAAA

AGCTGACCCCGGGCTACCACGGGTTTCATGTACACGAAAACCCGTCGTGCGCACCCGGGCGAGAAGGA
CGGAAAAATCGTTCCGGCACTCGCCGCCGGGGTCACTACGATCCAGGCAATACACATCATCATTTAG
GGCCTGAAGGTGATGGACACATGGGTGATTTACCGCGCTTGTCCGCAAATGCTGATGGAAAGGTTAGT
GAGACAGTTGTGGCTCCTCACCTGAAAAAACTGGCCGAAATCAAACAGCGCTCATTAATGGTCCATGT
CGGGGAGACAATTA CTCTGATAAGCCCGAACCCGCTGGGCGGTGGTGGTGC GCGGGTTCGCTTGGCGG
GTTATCGAACTCGAGAAATTCGTGG-3'.

Рассчитанная белок-кодирующая последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии целевого белка в *E.coli*.

Для синтеза *de novo* фрагмента ДНК, соответствующего по первичной структуре приведённой последовательности, были рассчитаны и использованы праймеры, перечисленные в таблице 1. В таблице 1 против каждого праймера указано, к какой группе праймеров он относится – «внутренних» или «фланкирующих».

Таблица 1. Праймеры для синтеза *de novo* гена Cu/Zn-SOD

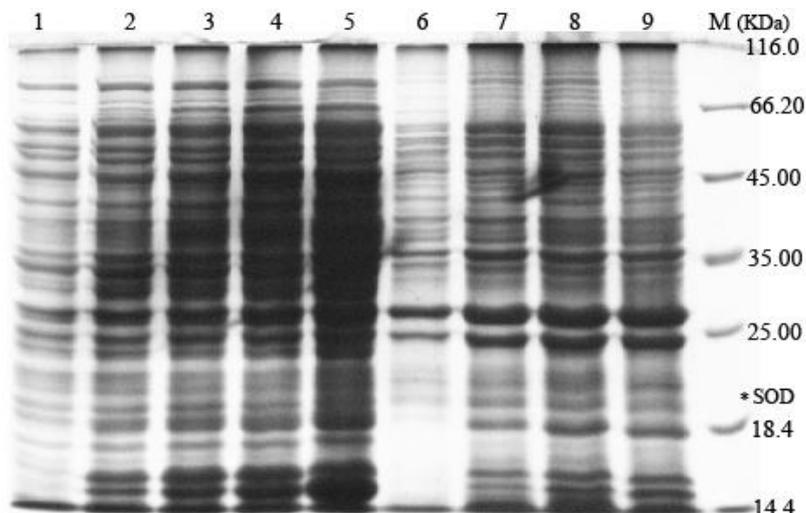
Название	Последовательность 5' ->3'	Длина	«внутренний» или «фланкирующий»
nSOD1	CCACCATATGGCCATGGGGATGAAATCACTTTTCA	35	«внутренний»
nSOD2	AACGCCGGGAAAGCCATTAAGACCATAGTGGACGCGATGAAAAGTG ATTCATCCCATG	60	«внутренний»
nSOD3	TGGCTTCCCGGCGTTCGCCGAGAGCACAACAGTCAAATGTATGAG GCGCTGCCTACTG	60	«внутренний»
nSOD4	GGGGCTTCGCTAATGACAACAGTCCCTACCTCTTTCGCCGACCAGT AGGCAGCGCCTCA	60	«внутренний»
nSOD5	TTGTCATTAGCGAAGCCCCAGGGGGCCTGCATTTCAAGGTAATATG GAAAAGCTGACCC	60	«внутренний»
nSOD6	GACGGGTTTTTCGTGTACATGAAACCCGTTGGTAGCCCGGGGTCAGCTT TTCCATATTTACC	60	«внутренний»
nSOD7	TCATGTACACGAAAACCCGTCGTGCGCACCCGGGCGAGAAGGACGGA AAAATCGTTCGGC	60	«внутренний»
nSOD8	GATGTGTATTGCCTGGATCGTAGTGACCCCGGCGGCGAGTGCCGGA ACGATTTTTCCGT	60	«внутренний»
nSOD9	ACGATCCAGGCAATACACATCATCATTTAGGGCCTGAAGGTGATGGA CACATGGGTGATT	60	«внутренний»
nSOD10	CACTAACCTTCCATCAGCATTTGCGGACAAGCGCGGTAAATCACCC ATGTGTCCATCAC	60	«внутренний»
nSOD11	AAATGCTGATGGAAAGGTTAGTGAGACAGTTGTGGCTCCTCACCTGA AAAAACTGGCCGA	60	«внутренний»
nSOD12	TGTCTCCCCGACATGGACCATTAATGAGCGCTGTTTGATTTTCGGCCA GTTTTTTCAGGT	60	«внутренний»
nSOD13	CCATGTCCGGGGAGACAATTA CTCTGATAAGCCCGAACCCGCTGGGCG GTGGTGGTGC GCG	60	«внутренний»
nSOD14	CCACGAATTCTCGAGTTATTCGATAACCCCGCAAGCGAACCCGCGCAC CACCACCG	55	«внутренний»
nSOD_woSP	CCACCATATGGCCATGGGGGAGAGCACAACAGTCAAATG	40	«фланкирующий»
nSOD_NoStop	CCACGAATTCTCGAGTTTCGATAACCCCGCAAGCGAA	36	«фланкирующий»

Для синтеза рассчитанных олигонуклеотидных праймеров с помощью ДНК-синтезатора ASM-800 (Biosset, Новосибирск) были введены параметры роста цепи ДНК и условия проведения синтеза. Синтез проводился при температуре 30°C, относительном давлении внутри каналов 2,5 атм. В качестве активатора фосфоамидов использовался этиламинтетразол. Синтез проводили в реакторных колонках объемом 25 мкл. Качество полученных олигонуклеотидных праймеров определяли с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле, концентрацию определяли спектрофотометрически.

В ходе эксперимента по синтезу гена все полученные праймеры сначала были доведены до концентрации 50 рМ/мкл. Затем в отдельной пробирке была сделана смесь 14-ти внутренних праймеров, т.е. были смешаны 10 мкл nSOD1 + 10 мкл nSOD2 + 10 мкл nSOD3 + ... + 10 мкл nSOD14. Эта смесь была использована в ПЦР I раунда в соответствии с вышеописанным протоколом. Продукт ПЦР I раунда был использован в качестве матрицы для проведения ПЦР II раунда с фланкирующими праймерами. На II раунде был получен продукт ожидаемой длины 496 пн (рисунок 2).

последовательность полилинкера состоит из кодонов, обеспечивающих оптимальные условия для старта трансляции рекомбинантного белка.

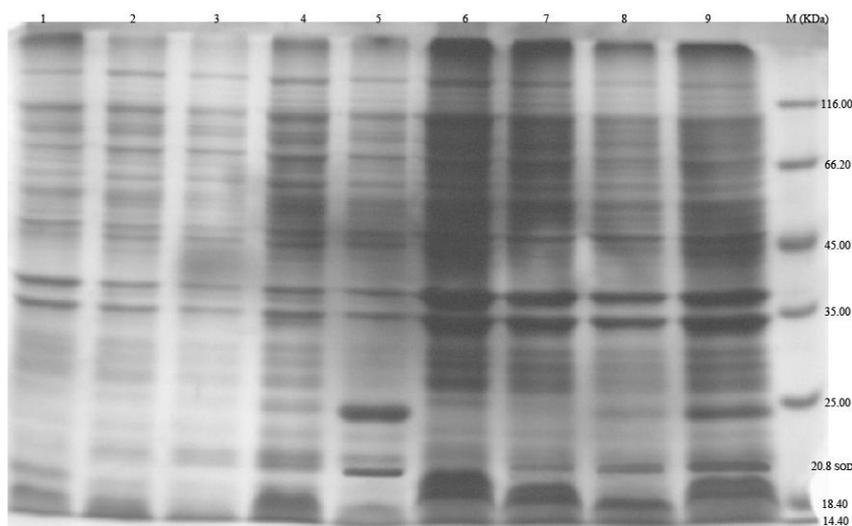
Для выбора штамма *E.coli*, экспрессирующего целевой ген в составе рекомбинантного вектора pET22/SOD, исследовали экспрессию гена в штаммах *E.coli* - BL21(DE3)plysS и BL21(DE3). Индукцию экспрессии проводили в присутствии концентраций IPTG – 0,2 мМ в течение 2, 4, 6 ч. и в течение ночи. Результаты эксперимента по экспрессии рекомбинантного антигена SOD бруцелл приведены на рисунках 4 и 5.



1 - лизат клеток (total) до индукции; 2 - лизат клеток после двухчасовой индукции; 3 - лизат клеток после четырехчасовой индукции; 4 - лизат клеток после шестичасовой индукции; 5 - лизат клеток индукция в ночь; 6 - осадок клеток (pellet) без индукции; 7 - осадок клеток после двухчасовой индукции; 8 - осадок клеток после четырехчасовой индукции; 9 - осадок клеток после шестичасовой индукции; 2-9 – концентрация IPTG 0,1 мМ; М - маркер (Thermo scientific)

Рис. 4. Электрофореграмма экспрессии рекомбинантного антигена SOD Br. Abortus в штамме BL21(DE3)plysS

Результаты эксперимента, представленные на рисунке 4, показывают, что при использовании штамма *E. coli* BL21(DE3)plysS во всех пробах экспрессии ожидаемый продукт, индуцированной 0,1 мМ IPTG, не обнаружен.



1 - лизат клеток (total) до индукции; 2 - лизат клеток после двухчасовой индукции; 3 - лизат клеток после четырехчасовой индукции; 4 - лизат клеток после шестичасовой индукции; 5 - лизат клеток индукция в ночь; 6 - осадок клеток (pellet) без индукции; 7 - осадок клеток после двухчасовой индукции; 8 - осадок клеток после четырехчасовой индукции; 9 - осадок клеток после шестичасовой индукции; 2-9 – концентрация IPTG 0,1 мМ; М - маркер (Thermo scientific)

Рис. 5. Электрофореграмма экспрессии рекомбинантного антигена SOD Br. abortus в штамме BL21(DE3)

По сравнению со штаммом *E. coli* BL21(DE3)*plysS* накопление рекомбинантного белка в культуре штамма-продуцента BL21(DE3) было активнее. Экспрессия рекомбинантного антигена SOD *B. abortus* в штамме BJ21(DE3) *E. coli* увеличилась после шестичасовой индукции. Рекомбинантный антиген SOD бруцелл имеет расчётную молекулярную массу 20,8 кДа.

В ходе исследований был синтезирован *de novo* ген супероксиддисмутазы (SOD) – диагностически значимого антигена возбудителя бруцеллеза. Синтез гена *de novo* из олигонуклеотидов является сравнительно новой и чрезвычайно многообещающей технологией генетической инженерии, поскольку синтез позволяет получать целевые гены без использования труднодоступных или инфекционно-опасных материалов. Структура полученного гена подтверждена секвенированием.

С использованием полученного гена SOD создана генетическая конструкция для получения рекомбинантного белка и продемонстрировано накопление белка в индуцированных культурах экспрессионного штамма *E. coli*, трансформированного экспрессирующей конструкцией.

Поскольку SOD является группоспецифическим антигеном, высококонсервативным для всего рода *Brucella*, данный антиген обладает большой диагностической ценностью для использования в разработке иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем на бруцеллёз как ветеринарного, так и медицинского применения.

ВЫВОДЫ

В результате исследований проведено моделирование гена и дизайн *in silico* генетических конструкций для синтеза рекомбинантного антигена бруцелл - Cu/Zn-зависимой супероксиддисмутазы (SOD). Подобраны первичные структуры олигонуклеотидов для синтеза целевого гена SOD с последовательностями, кодон-оптимизированными для экспрессии в *E. coli*.

Методом твердофазного амидофосфитного синтеза на автоматическом ДНК-синтезаторе получены олигонуклеотидные праймеры для синтеза целевого гена SOD *de novo*. Проведена очистка олигонуклеотидов до чистоты >95%. Проведён синтез *de novo* в синтетической ПЦР гена SOD.

Полученный ген клонирован в составе высококопийных неэкспрессионных бактериальных плазмид и в составе экспрессирующей конструкции на основе вектора для бактериальной экспрессии pET22b(+). Проведён эксперимент по оценке накопления рекомбинантного антигена SOD бруцелл в культурах экспрессирующего штамма BL21(DE3), трансформированного полученной конструкцией pET22/SOD.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fernando P.P., Klaus N., Luis E.S., and Wei I.U. Diagnosis of Brucellosis // *The Open Veterinary Science Journal*. - 2010. - P. 46-60.
2. Sascha A.D., Karsten N., Holger C.S., Herbert T., Ralf B., Heinrich N. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections // *Journal of Immunological methods*. - 2006. - P. 4-47.
3. Sergio C.O., Gilson C.M., Leonardo A. de A., Guillermo H.G. Recent Advances in Understanding Immunity Against Brucellosis: Application for Vaccine Development // *The open veterinary science Journal*. - 2010. - P.102-108.
4. Kyung Y.K., Jong-Wan K., Moon H., Sung-II K., Suk C. Об Dong H. C., Ji- Yeon K. Immunogenic proteins of *brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis // *Veterinary Microbiology*. – 2012. - P. 374-380.
5. Bricker B.J., Tabatabai L.B., Judge B.A., Deyoe B.L., Mayfield A.E. Cloning, Expression, and Occurrence of the *Brucella* Cu-Zn Superoxide Dismutase // *National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, and Zoology Department, Iowa State University: American Society for Microbiology*. - 1990. - P. 2935-2939.
6. Louisa B.T., and Steven G.H. Cattle Serologically Positive for *Brucella abortus* Have Antibodies to *B. abortus* Cu-Zn Superoxide Dismutase // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. - Sep. - 1994. – P. 506-510.
7. Kataria N., Kataria A., Maan R. Evaluation of oxidative stress in *brucella* infected cows // *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*. - 2010. - Vol. 2. - P. 19-25.
8. Кулжанова Ш.А. Показатели прооксидантной и антиоксидантной систем крови у больных хроническим бруцеллезом // *Сибирский медицинский журнал*. - 2009. - №2. – Т. 24. - С.55-57.
9. Гладиллина Е.Г., Ляпина Е.П., Таранова Ю.К. Прогнозирование рецидивов заболевания у больных хроническим бруцеллезом // *Успехи современного естествознания*. - 2006. - №1. - С. 53-54.
10. Курбанов А.И. Антиоксидантные ферменты микроорганизмов как потенциальные факторы патогенности // *Международный медицинский журнал*. - 2009. - №1. - С. 136-139.

11. Angel A. Onate, Sandra Cespedes, Alex Cabera, Rodolfo Ribers, Andrs Gonzalez, A DNA vaccine coding CU, Zn Superoxide Dismutase of *Brucella abortus* Induces Protective Immunity in BALB/c Mice // *American Society for microbiology*. - 2003. - Vol. 71, №9. - P. 4857-4861.

12. Mark G. Stevens, Louisa B. Tabatabai, Steven C. Olsen, Norman. Cheville. Immune responses to superoxide dismutase and synthetic superoxide dismutase in cattle vaccinated with *Brucella* or RB51 // *Veterinary Microbiology*. - 1994. - Vol. 41, №15. - P. 383-389.

БРУЦЕЛЛИ-CU/ZN-ТӘУЕЛДІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА (SOD) РЕКОМБИНАНТТЫ АНТИГЕНІН АЛУ

А.В. Шустов, С.З. Ескендірова, Е. Манат, Г.Б. Ұнышева, Н.И. Сарина

ТҮЙІН

Cu-Zn-SOD (супероксиддисмутаза) периплазматикалық ақуызы, инфекциялық аурулар кезінде патогенездің әмбебап тетіктерінің бірі болып есептелетін, микроорганизмдердің антиоксиданттық жүйесінің маңызды ферменті, сонымен бірге, антитотықтырғыштық ферменттер деңгейінің өзгерісі аурудың шығу тегін болжауға көмектесетін негізгі фактор болып саналады. Cu-Zn-SOD бруцелла периплазмасының ішінде жарғақшалық және периплазматикалық құрылымдарды супероксидтердің экзогенді әсерлерінен қорғайды және патогенділіктің бір факторы болып саналады.

Зерттеу нәтижесінде бруцеллез қоздырғышына кандидат – ақуыздардың (әлеуетті антиген) иммуногенділігі анықталды және GenBank NCBI ақпарат базасын қолданып диагностикалық маңызды нәруыздың антигенін экспрессиялау жүйесі таңдап алынды. Cu/Zn-тәуелді супероксиддисмутаза (SOD) рекомбинантты антигенін синтездеу үшін ген үлгісін және *in silico* дизайн құрастыру жүргізілді. *E.coli* жасушасында экспрессияланатын кодондары оңтайландырылған тұтас SOD генін құрастыру үшін таңдап алынған олигонуклеотидтердің бірінші реттік құрылымы анықталды. SOD генін *de novo* синтездеу үшін қатты фазалық амидофосфаттық әдіс арқылы автоматтық ДНҚ синтезаторымен олигонуклеотидты праймерлері алынды. ПШР әдісімен SOD генінің амплификациясы және *de novo* синтезі жүргізілді. ПШР екінші раундта ұзындығы 496 пн өнім алынды. Алынған ПШР амплификат экспрессия жүрмейтін (аралық клондауға арналған вектор) pB32 плазмиді құрамына клондалды. Тазалауға ыңғайлы болу үшін рекомбинантты ақуыздың C-ұшында (6xHis) гексагистидин белгісі бар және N-ұшында рекомбинантты ақуыздың трансляциясының басталуына оңтайлы шарттарды қамтамасыз ететін pET22b(+) векторының полилинкерінде кодталған аминқышқылдар тізбегі бар. pET22/SOD трансформацияланған *E. coli* BL21(DE3) өндіруші штаммын рекомбинантты SOD бруцелла антигенін экспрессиялайтын индуцирленген өсіндісінің жиналуын бағалау жүргізілді.

Негізгі сөздер: рекомбинантты антиген, супероксиддисмутаза, праймерлер, бруцеллез.

PRODUCTION OF RECOMBINANT ANTIGEN OF BRUCELLA – CU-ZN-SOD

A.V. Shustov, S.Z. Yeskendirova, E. Manat, G.B. Unysheva, N.I Sarina

National Center for Biotechnology, the Science Committee, Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Astana, Kazakhstan
saule_e@mail.ru

ABSTRACT

Periplasmic protein Cu-Zn-SOD (superoxide dismutase) is one of the major antioxidant enzymes of microorganisms, which is regarded as one of the universal mechanisms of the pathogenesis of infectious diseases, and indicators reflecting changes in the levels of antioxidant enzymes are key factors contributing to predict disease outcome. Therefore, Cu-Zn-SOD, being in the periplasm of *Brucella*, protects the membrane and periplasmic structure from the impact of exogenous superoxide and is one of the factors of pathogenicity.

In this study, we defined immunogenicity of candidate protein of brucellosis causative agent and GenBank NCBI database was used for choosing a good expression system for diagnostic purposes candidate antigen. The gene design of Cu/Zn superoxide dismutase was *in silico* built. The first oligonucleotids design confirmed for construction of whole gene of SOD which expressing in *E.coli*, and codon modification was stabilized. Solid phase method was used for the synthesis of the target gene SOD *de novo* by automated DNA synthesizer. The gene of SOD was synthesized by PCR. The second round PCR product length was 496 bp. Then the PCR product cloned into no expression pB32 plasmid. Recombinant proteins C-terminus consists of six [histidine](#) (*His*) residues and N-terminus consists useful [amino acid](#) motif and they are used for affinity purification of polyhistidine-tagged recombinant proteins expressed in *E.coli* by pET22b+ plasmid. Then the pET22b+/SOD transformed into *E.coli* BL21(DE3), and expression of recombinant protein was estimated.

Keywords: Recombinant antigen, superoxide dismutase, primer, brucellosis.