

УДК 577.2:579.842.1:579.253.4

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент
Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск,
Республика Беларусь

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* И *MYCOPLASMA BOVIS* В СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ *E. COLI* И ОЦЕНКА ИХ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

Резюме

В статье описано получение рекомбинантных штаммов-продуцентов *Escherichia coli*, синтезирующих рекомбинантные белки *M. bovis* и *M. hyopneumoniae*, и дана оценка антигенных свойств синтезируемых мембранных белков. Полученные результаты демонстрируют выраженные антигенные свойства рекомбинантных белков и подтверждают перспективность созданных штаммов-продуцентов для получения стандартизированных антигенных препаратов, пригодных для использования в ИФА-тест-системах диагностики микоплазмозов сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma bovis*, рекомбинантный белок, *E. coli* BL21 (DE3), штамм-продуцент, хроматография, антигенные свойства, иммуноферментный анализ (ИФА), серодиагностика.

Summary

The article describes production of recombinant strains-producers of *Escherichia coli* synthesizing recombinant proteins of *M. bovis* and *M. hyopneumoniae* and evaluation of antigenic properties of membrane proteins synthesized by them. Obtained results demonstrate expressed antigenic properties of recombinant proteins and confirm perspective of created strains-producers for obtaining standardised antigenic preparations, suitable for use in ELISA-test systems for diagnostics of farm animal mycoplasmosis.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma bovis*, recombinant protein, *E. coli* BL21 (DE3), producer strain, chromatography, antigenic properties, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), serodiagnosis.

Поступила в редакцию 05.12.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Микоплазмы рода *Mycoplasma* представляют собой группу бактерий, лишенных клеточной стенки, что обуславливает их резистентность к ряду антибиотиков и сложность культивирования [1]. *Mycoplasma bovis* считается одним из основных этиологических агентов хронических респираторных заболеваний, маститов и артритов у крупного рогатого скота (КРС) [2]. *Mycoplasma hyopneumoniae* является первичным патогеном, ответственным за энзоотическую пневмонию свиней – заболевание, ведущее к существенным потерям продуктивности из-за снижения привесов и ухудшения конверсии корма [3]. Лабораторная диагностика этих инфекций, в частности серологические методы, основанные на выявлении специфических антител, зависит от качества антигенов. Получение чистого антигена из микоплазм традиционными методами не всегда возможно, так как он может быть контаминирован компо-

нентами культуральной среды, а сам процесс культивирования патогенов трудоемок и требует особых условий [4]. Альтернативой для получения чистого антигена служат рекомбинантные технологии, позволяющие производить отдельные высокоочищенные иммунодоминантные белки в гетерологичных системах экспрессии, таких как *Escherichia coli* [5]. Этот подход обеспечивает воспроизводимость, специфичность и безопасность получаемых диагностических препаратов. Ключевым этапом в разработке таких препаратов является не только создание эффективного штамма-продуцента, но и комплексная оценка антигенных свойств полученного рекомбинантного белка.

Целью данной работы являлось создание рекомбинантных штаммов-продуцентов *E. coli*, экспрессирующих мембранные белки *M. hyopneumoniae* и *M. bovis*, и последующая оценка их антигенных свойств в иммуноферментном анализе (ИФА).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения штаммов-продуцентов использовали гены, кодирующие мембранные белки *M. hyorheumoniae* с молекулярной массой около 46 кДа (GenBank CP034597) и *M. bovis* (около 36 кДа, GenBank CP002058.1). Специфические ПЦР-продукты получали с использованием специфических праймеров, содержащих сайты рестрикции *NheI/HindIII* и *NheI/EcoRI*. ПЦР-продукты и экспрессионный вектор pET24b(+) обрабатывали соответствующими эндонуклеазами, фрагменты очищали с использованием набора Cleanup Standard («Евроген», Россия).

Лигирование проводили с помощью ДНК-лигазы T4 при молярном соотношении вставка-вектор 3:1. Лигированную смесь трансформировали в компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3). Отбор трансформантов осуществляли на плотной среде LB, содержащей канамицин (50,0 мкг/мл). Наличие целевых вставок подтверждали ПЦР-анализом.

Культивирование продуцентов проводили в 50,0 мл среды LB с канамицином и инкубировали на качалке (200,0 об/мин) при температуре 37 °C в течение 14–16 ч. Данная культура являлась раскладкой для засева 1,0 л основного объема среды в соотношении 1:100. Культивирование вели при температуре 37 °C до достижения оптической плотности OD 600 ~0,6–0,8. Биомассу осаждали центрифугированием при 4000 г в течение 20 мин при температуре 4 °C.

Для удаления остатков культуральной среды осадок дважды отмывали охлажденным 0,15 М раствором NaCl, pH 7,4. Отмытый осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM фенилметилсульфонил-фторид – PMSF). Дезинтеграцию клеток проводили с использованием ультразвукового гомогенизатора Bandelin Sonopuls HD 2200 (Германия). Обработку осуществляли в импульсном режиме (6–7 циклов по 30 с (35 КГц) и перерывом 30 с для охлаждения на ледяной бане). Полноту разрушения контролировали микроскопически. Клеточный дебрис и неразрушенные клетки удаляли центрифугированием при 12000 g (15 мин, 4 °C). Супернатант (растворимая фракция) отбирали для дальнейшей очистки. Общую концентрацию белка в лизате определяли по методу Бредфорда.

Очистку гистидин-меченых рекомбинантных белков проводили методом иммобилизованной металлоаффинной хроматографии (IMAC) на Ni²⁺-хелатирующей смоле. Использовали хроматографические колонки объемом 10,0 мл (Econo-Pac, «Bio-Rad», США), заполненные смолой Nuvia IMAC («Bio-Rad», США). Колонку уравнивали 5–10 объемами стартового буфера (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM имидазол). Клеточный лизат, предварительно пропущенный через фильтр 0,45 мкм, наносили на колонку со скоростью 1,0 мл/мин. Неспецифически связанные белки отмывали отмывочным буфером, содержащим 20 mM имидазол. Элюцию целевого белка проводили буфером, содержащим имидазол, используя ступенчатый градиент с конечной концентрацией 250 mM. Белоксодержащие фракции, детектированные методом Бредфорда или при длине волны 280 нм, объединяли и анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE).

Для удаления примесей и имидазола проведена дополнительная стадия гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной фосфатно-солевым буфером (ФСБ, 0,01 M, pH 7,4). Очищенный белок концентрировали с помощью ультрафильтрации (Amicon, Merck) с отсечением молекулярной массы 10 кДа. Концентрацию очищенного белка определяли методом Бредфорда. Очищенный препарат хранили при температуре минус 20 °C.

Для оценки антигенных свойств полученных белков проводили иммунизацию кроликов массой 2,5–3,0 кг. Очищенные рекомбинантные белки эмульгировали с адьювантом Montanide ISA 61 («Seppic», Франция) в соотношении 40:60 (антиген/адьювант, v/v).

Для оценки зависимости иммунного ответа от дозы антигена кроликов иммунизировали разными количествами белка: 50,0 мкг, 100,0 мкг и 200,0 мкг на животное. Эмульсию вводили внутримышечно в две точки в области спины. Схема иммунизации включала две инъекции с интервалом 14 дней. Через 10 дней после второй иммунизации осуществляли забор крови из краевой вены уха. Полученную сыворотку хранили при температуре минус 20 °C. Контрольной группе животных вводили

смесь стерильного ФСБ с адьювантом по аналогичной схеме.

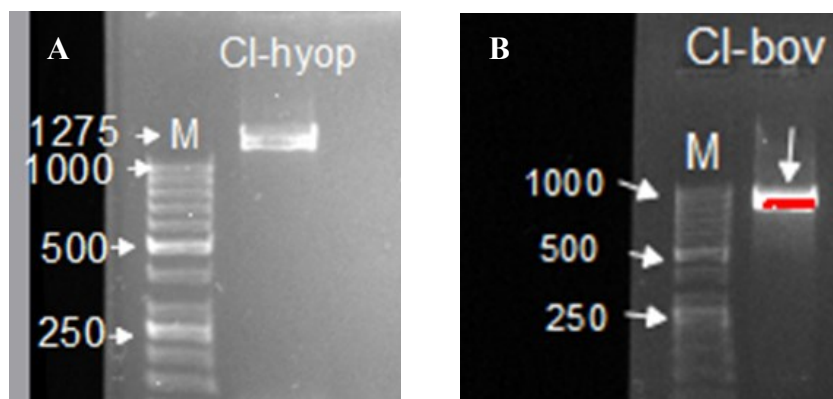
Иммуноферментный анализ проводили в 96-луночных полистироловых планшетах («Costar», США). Для оптимизации сорбции антигена лунки сенсibilizировали растворами рекомбинантного белка в концентрациях 10,0; 20,0 и 30,0 мкг/мл в различных буферах: 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере (КББ, pH 9,4), 0,02 М ФСБ (pH 7,4) и 0,02 М ацетатном буфере (pH 5,0). Инкубацию проводили 1 ч при температуре 37 °С. После трехкратной отмывки ФСБ с 0,05%-ным раствором твина-20 (ФСБ-Т) проводили блокирование неспецифических сайтов связывания 0,4%-ным раствором обезжиренного молока в КББ в течение 1 ч при температуре 37 °С. После отмывки в лунки вносили серийные двукратные разведения исследуемых антисывороток (начиная с 1:100) и инкубировали 1 ч при температуре 37 °С. После отмывки вносили конъюгат-поликлональные антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена («USCN Life Science

Inc.», Китай), разведенные согласно рекомендациям производителя. Инкубация – 1 ч при температуре 37 °С. После финальной отмывки реакцию проявляли с использованием ТМБ-субстратного раствора в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 10%-ной серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре.

Учет результатов проводили по пороговому значению, определяемому как средняя ОП отрицательных контрольных сывороток (K⁻). Положительным считали образец, ОП которого превышала пороговое значение в 1,5 раза. Титром антител считали наибольшее разведение сыворотки, дающее положительный результат.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате молекулярно-генетических манипуляций были получены рекомбинантные плазмиды pET24b(+), несущие гены целевых белков *M. hyor pneumoniae* и *M. bovis* (рисунок 1).



А – продукт амплификации с праймерами Cl-hyor (1275 п.н.);

В – продукт амплификации с праймерами Cl-bov (1002 п.н.);

М – маркер молекулярной массы

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР-анализа клонов с генами *thr* и *mbov*

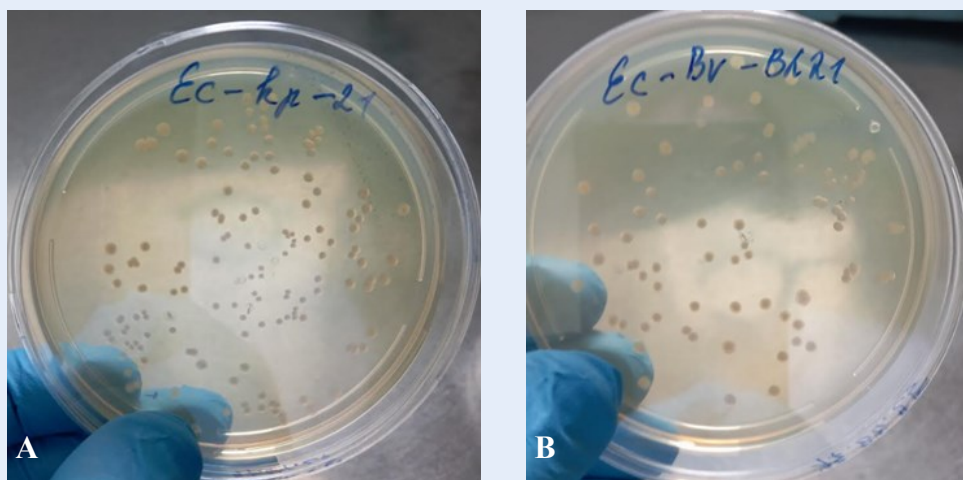
Трансформация в штамм *E. coli* BL21(DE3) и отбор на средах с канамицином позволили выделить стабильные клоны-продуценты, обозначенные как EchrBL21p1 – для *M. hyor pneumoniae* (рисунок 2 А) и EcBvBL21p1 – для *M. bovis* (рисунок 2 В).

ПЦР-анализ и рестрикция выделенных плазмид подтвердили корректность конструкции и наличие целевых вставок ожидаемого размера.

При культивировании штаммов-продуцентов в 1,0 л среды LB с последующим центрифугированием было получено 3,0–4,0 г биомассы клеток. После отмывания физиологическим раствором и ультразвуковой дезинтеграции общее количество белка в растворимой фракции лизата составляло 80,0–120,0 мг. Хроматографическая очистка растворимой фракции лизата обеспечила эффективное выделение целевых гистидин-меченых белков *E. coli*. Це-

левой белок элюировался в виде четкого пика при повышении концентрации имидазола до 250 мМ. Электрофоретический анализ фракций элюата показал наличие доминирующей полосы с молекулярной массой, соответствующей ожидаемой (~46 кДа для *M. hyopneumoniae* и ~36 кДа для *M. bovis*),

что свидетельствовало о высокой степени очистки. Последующая гель-фильтрация позволила удалить низкомолекулярные примеси и соли. Выход высокоочищенного рекомбинантного белка с 1 л культуральной жидкости составил в среднем 8,0–12,0 мг.



А – Ec-hp-BL21; В – Ec-Bv-BL21

Рисунок 2 – Колонии трансформантов, несущих рекомбинантные плазмиды pET-22b(+)-*mhr* (первичный отбор рекомбинантных клонов)

Иммунизация кроликов очищенными рекомбинантными белками с адъювантом Montanide ISA 61 индуцировала выраженный гуморальный иммунный ответ, необходимый для последующей оценки антигенных свойств. Максимальные титры антител были получены при использовании дозы антигена 200,0 мкг на животное. Меньшие дозы приводили к менее стабильному ответу.

Эффективность сорбции рекомбинантных белков на полистироловом планшете максимальна при использовании карбонатного буфера с pH 9,4. Концентрация антигена 20,0 мкг/мл была выбрана как оп-

тимальная, обеспечивающая высокий сигнал при экономичном расходе реагента. В качестве наиболее эффективного блокирующего агента подтвержден 0,4%-ный раствор обезжиренного молока.

ИФА-анализ антисывороток, полученных от кроликов, иммунизированных дозой 200,0 мкг, продемонстрировал высокие титры специфических антител, что подтверждает выраженные антигенные свойства использованных рекомбинантных белков. Средние диагностические титры составили 1:1600 для антисывороток к рекомбинантному белку *M. hyopneumoniae* и 1:1800 – для антисывороток к белку *M. bovis* (таблица).

Таблица – Оценка антигенных свойств рекомбинантных белков *M. hyopneumoniae* и *M. bovis* в серологических тестах

Рекомбинантный белок (антиген)	Диагностический титр специфических антисывороток в ИФА
<i>M. hyopneumoniae</i>	1:1600
<i>M. bovis</i>	1:1800
Контроль (ФСБ+адъювант)	<1:100

Антисыворотки были специфичны и не реагировали с гетерологичными антигенами.

Полученные данные согласуются с результатами других исследований, показывающих, что рекомбинантные мембранные белки сохраняют конформационно-зависимые эпитопы и проявляют выраженные антигенные свойства в серологических тестах [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами генной инженерии созданы стабильные рекомбинантные штаммы продуценты *E. coli* BL21(DE3) – EchrBL21p1 и EcBvBL21p1, обеспечивающие синтез мембранных белков *Mycoplasma hyopneumoniae* (около 46 кДа) и *Mycoplasma bovis* (около 36 кДа).

Разработана и апробирована эффективная схема очистки целевых белков,

включающая ультразвуковую дезинтеграцию биомассы и одноэтапную аффинную хроматографию (ИМАС) на смоле Nuvia ИМАС. Выход очищенного белка составляет 8,0–12,0 мг/л культуры, что достаточно для практического применения.

Экспериментально доказаны выраженные антигенные свойства полученных рекомбинантных белков. При иммунизации кроликов (оптимальная доза 200,0 мкг) индуцируются специфические антисыворотки, реагирующие с гомологичными антигенами в иммуноферментном анализе с титрами 1:1600–1:1800.

Оптимизированы условия постановки твердофазного ИФА для оценки антигенных свойств: сорбция антигена в карбонатном буфере при pH 9,4, концентрация 20,0 мкг/мл, использование обезжиренного молока для блокирования.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Razin, S. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas* / S. Razin, D. Yorgev, Y. Naot // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – Vol. 62, № 4. – P. 1094–1156.
2. Nicholas, R. A. J. *Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control* / R. A. J. Nicholas, R. D. Ayling // *Res. Vet. Sci.* – 2003. – Vol. 74. – P. 105–112.
3. *Review on the transmission of Mycoplasma hyopneumoniae in pig herds* / D. Maes [et al.] // *Vet. Res.* – 2008. – Vol. 39, № 1. – Art. 18.
4. Проблемы лабораторной диагностики микоплазмозов животных / П. Т. Сахарчук [и др.] // *Ветеринарная патология.* – 2018. – № 2. – С. 45–51.
5. Получение рекомбинантных антигенов для иммуноферментного анализа: стратегии и применение / О. В. Соколова [и др.] // *Биотехнология.* – 2019. – Т. 35, № 4. – С. 22–32.
6. *Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D* / Jr. C. Moreira [et al.] // *Anaerobe.* – 2016. – Vol. 40. – P. 58–62.

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬГИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА (ЭШЕРИХИОЗА) И КЛЕБСИЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

КОЛИТОКС-ЛТ

► изготовлена из штаммов бактерий *Escherichia coli* серотипов F41, K88 (F4), K99 (F5), A20 (F17); *Klebsiella pneumoniae*; рекомбинантной субъединицы В термолabileного токсина *Escherichia coli*; масляного адъюванта



► термолabileный энтеротоксин *E. coli* имеет белковую природу и обладает высокой иммуногенной активностью

► для иммунизации глубокостельных коров, нетелей и телят в неблагополучных и угрожаемых по колибактериозу и клебсиеллезу хозяйствах

WWW.BIEVM.BY