

УДК 577.21: 579.834.114: 616.98-07

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА E. COLI – ПРОДУЦЕНТА ХИМЕРНОГО ПОЛИПЕПТИДА НА ОСНОВЕ OSPC СИБИРСКИХ ИЗОЛЯТОВ BORRELIA AFZELII И BORRELIA GARINII И ОЦЕНКА АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМЕРА

Караваяев В.С., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биохимии», Новосибирск, e-mail: ibch@niibch.ru

В настоящей работе кодирующие области генов поверхностных белков OspC из спирохет *B. garinii* 20047 и *B. afzelii* были амплифицированы методом ПЦР, состыкованы между собой, встроены в экспрессирующий вектор pETm и клонированы в клетках *E. coli* шт. BL21(DE3). Отобранный рекомбинантный клон *E. coli*, продуцировал химерный полипептид OspC (OspC^{gar+afz}) с молекулярной массой 40,83 кДа, содержащий с N-конца молекулы аминокислотную последовательность зрелого белка OspC геновида *B. garinii* 20047, а с C-конца молекулы аминокислотную последовательность зрелого белка OspC геновида *B. afzelii*. Индуцируемая ИПТГ экспрессия гена химерного полипептида OspC^{gar+afz} осуществлялась под контролем T7 промотора. Синтезируемый гибридный белок составлял ~25% от суммарного белка клетки и находился в растворимом состоянии в цитоплазме. Химерный полипептид OspC^{gar+afz} очищен аффинной хроматографией на Ni-NTA-сефарозе CL-6B и исследован на способность связывать антитела сывороток крови больных иксодовым клещевым боррелиозом. Чувствительность иммуноферментного обнаружения IgM и IgG антител в сыворотках больных иксодовым клещевым боррелиозом с мигрирующей эритемой, реагирующих с антигеном OspC^{gar+afz} составила 58,3% и 52,8%, соответственно. Частота обнаружения IgM и IgG антител к антигену OspC^{gar+afz} в сыворотках больных ИКБ без мигрирующей эритемы составила 57,9% и 68,4%, соответственно. Специфичность иммуноферментного выявления антител к антигену OspC^{gar+afz}, в котором в качестве контрольных сывороток использовали сыворотки больных сифилисом, ревматоидным артритом и здоровых доноров, составила 100%. Результаты исследований свидетельствуют об антигенной активности сконструированного химерного полипептида OspC^{gar+afz} и перспективности его использования в диагностических целях для серодиагностики иксодового клещевого боррелиоза.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, рекомбинантный химерный полипептид, *Borrelia burgdorferi* s.l., иммуноферментный анализ, серодиагностика, IgM, IgG, ИФА.

CONSTRUCTION OF E. COLI STRAIN – PRODUCER OF CHIMERIC POLYPEPTIDE BASED ON OSPC FROM SIBERIAN ISOLATES BORRELIA AFZELII AND BORRELIA GARINII, AND EVALUATION OF ANTIGENIC ACTIVITY OF RECOMBINANT CHIMERA

Караваяев V.S., Ryabchenko A.V., Beklemishev A.B.

The Research Institute of Biochemistry, Novosibirsk, e-mail: ibch@niibch.ru

In this study, the coding regions of surface protein OspC genes from *B. garinii* and *B. afzelii* 20047 spirochetes were amplified by PCR, abutted to each other, incorporated into an expression vector pETm and cloned in *E. coli* str. BL21 (DE3). Selected recombinant *E. coli* clone, produced a chimeric polypeptide OspC (OspC^{gar+afz}) with molecular weight 40.83 kDa, containing in the N-termini of molecule a sequence of the mature OspC protein from genospecies *B. garinii* 20047 and in the C-termini a sequence of the mature OspC protein from genospecies *B. afzelii*. IPTG-induced expression of the gene encoding chimeric polypeptide OspC^{gar+afz} carried out under the control of the T7 promoter. Synthesized fusion protein was ~ 25% of total cell protein and was in a soluble state in the cytoplasm. The chimeric polypeptide has been purified by affinity chromatography on Ni-NTA-Sepharose CL-6B, and examined for the ability to bind antibody of sera from patients with tick-borne borreliosis. The sensitivity of detection by the enzyme immunoassay of IgM and IgG antibodies to the antigen OspC^{gar+afz}, in sera of patients with tick-borne borreliosis having erythema migrans amounted to 58.3% and 52.8%, respectively. The frequency of detection of IgM and IgG antibodies to OspC^{gar+afz} in the sera of patients with Lyme disease not having erythema migrans was 57.9% and 68.4%, respectively. The specificity of detection of antibody to OspC^{gar+afz} by the enzyme immunoassay was 100% in experiments in which sera of patients with syphilis, rheumatoid arthritis and healthy donors were used as the control sera. The research results indicate that the constructed chimeric polypeptide OspC^{gar+afz} possesses the antigenic activity and can be used for diagnostic purposes in serodiagnosis of tick-borne borreliosis in perspective.

Keywords: tick-borne borreliosis, recombinant chimeric polypeptide, *Borrelia burgdorferi* s.l., enzyme immunoassay, serodiagnosis, IgM, IgG, ELISA

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) – одно из самых распространенных природно-очаговых заболеваний в России, вызываемых спирохетами комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.). В нашей стране природные очаги этой инфекции широко распространены в лесной зоне, от границ с Прибалтикой на западе до Южного Сахалина – на востоке [2]. В связи

с наблюдаемым в последние годы широким распространением высокоактивных природных очагов ИКБ на территории РФ, а также неуклонным ростом заболеваемости особую важность приобретают вопросы диагностики этой инфекции. В клинической практике одним из наиболее распространенных и доступных серологических тестов на ИКБ является метод иммунофермент-

ного анализа (ИФА). В современных иммуноферментных тест-системах в качестве антигена используют преимущественно рекомбинантные белки или их фрагменты из патогенных видов боррелий, эпидемически значимых для конкретной территории [6, 10]. Одним из новых подходов по улучшению серодиагностики ИКБ является использование в лабораторных тестах в качестве антигена полипептидов, содержащих эпитопы нескольких гомологичных или гетерологичных иммунодоминантных белков *B.burgdorferi* s.l. [3, 7]. В связи с изложенным, целью настоящего исследования явилось получение и оценка антигенной активности рекомбинантного химерного полипептида OspC (OspCgar+afz), содержащего эпитопы иммунодоминантных белков OspC западно-сибирских изолятов *B.garinii* и *B.afzelii* для возможного его использования в серодиагностике ИКБ.

Материалы и методы исследования

Источником генов кодирующих химерный полипептид OspC^{gar+afz} служили западно-сибирские изоляты спирохет *B.garinii* 20047[†] и *B.afzelii*. Изоляты спирохет были получены из клещей, отловленных в лесопарковой зоне г. Новосибирска [4]. Для клонирования рекомбинантных ДНК, кодирующих химерный полипептид OspC^{gar+afz} были использованы клетки *E.coli* штамма BL21(DE3) и модифицированный экспрессирующий вектор pETm [5]. Клетки выращивали при 37°C в присутствии канамицина 30 мг/мл до оптической плотности 1,0±0,1 о.е., затем добавляли изопропил-β-D-1-тиогактопиноназида (ИПТГ) до 1мМ и продолжали инкубацию клеток в течение 12–16 часов при 30°C. Клетки осаждали центрифугированием (3000 об./мин, 15 мин) и хранили при минус 20°C. Выделение и очистку химерного полипептида OspC^{gar+afz} осуществляли с помощью аффинной хроматографии лизата клеток на колонке с Ni-NTA-сефарозой CL-6B согласно протоколу фирмы-производителя сорбента («Qiagen», Германия). Количество белка определяли методом Лоури, используя для построения калибровочной кривой бычий сывороточный альбумин и IgG собаки. Чистота химерного полипептида OspC^{gar+afz} данным электрофореза в SDS-ПААГ составляла не менее 90%. Антигены хранили в буферном растворе, содержащем 10 мМ Трис-HCL, pH 7.5; 300 мМ NaCl; 20 мМ 2-меркаптоэтанол и 0.05 % NaN₃.

Для изучения антигенных свойств химерного полипептида OspC^{gar+afz} методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) использовали панель сывороток крови больных ИКБ с мигрирующей эритемой (локализованная стадия инфекции) (n=36) и без мигрирующей эритемой (диссеминированная стадия инфекции) (n=19). Сыворотки больных ИКБ были получены из муниципальной инфекционной клинической больницы № 1 и областного диагностического центра г. Новосибирска. Диагноз у больных ИКБ с локализованной стадией инфекции установлен на основе анамнеза (укус клеща), наличия мигрирующей эритемы и данных клинического обследования.

У больных ИКБ с диссеминированной стадией инфекции в анамнезе отмечен укус клеща и наблюдалась моно – или полиорганная симптоматика, характерная для диссеминированной формы заболевания. Диагноз ИКБ лабораторно подтвержден ИФА с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «ЛаймБест-IgM» и «ЛаймБест-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Все сыворотки больных ИКБ в IgM ИФА и IgG ИФА были положительными. При комплексном исследовании сывороток больных ИКБ не обнаружено специфических IgM и IgG антител к спирохетам *Tripinema pallidum* и вирусу клещевого энцефалита. Для определения неспецифических перекрестных реакций в качестве отрицательного контроля использовали сыворотки здоровых доноров (n=30), больных сифилисом (n=20) и больных ревматоидным артритом (n=12). Контрольные отрицательные сыворотки были отрицательными в ИФА. Сыворотки до исследования хранили при температуре минус 70°C.

Постановку IgM ИФА и IgG ИФА осуществляли в режимах по описанной ранее методике [1]. Для определения специфического комплекса антиген-антитело использовали пероксидазные конъюгаты на основе мышиных моноклональных антител против IgM и IgG человека. Рабочие разведения этих реагентов составили: для анти-IgM антител 1:3000, для анти-IgG антител 1:4000. Для подсчета критической оптической плотности (ОПкрит) антигена использовали 30 отрицательных образцов сывороток здоровых доноров. ОПкрит устанавливали статистически как среднее значение ОП для группы здоровых доноров и 2-х стандартных отклонений, что соответствовало верхней границе 95% доверительного интервала для возможных значений показателя. Исходя, из критической величины ОП с антигеном OspC^{gar+afz} проводился анализ результатов тестирования исследуемых сывороток. Образцы считали положительными, если результат превышал пороговое значение ОПкрит в двух из трех независимых экспериментах. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы «StatPlus 2009» (компания «StatSoft», USA).

Результаты исследования и их обсуждение

Для конструирования химерного полипептида OspC^{gar+afz} был выбран поверхностный белок боррелий OspC, который является основным антигеном, вызывающим иммунный ответ на ранних стадиях заболевания ИКБ и присутствует во всех без исключения патогенных штаммах *B.burgdorferi* s.l. [10]. В работах ряда авторов представлены данные об использовании антигенов OspC в качестве маркеров для серодиагностики ИКБ [8, 9]. Этот белок характеризуется высокой гетерогенностью аминокислотных последовательностей, оказывающей влияние на антигенную структуру OspC. Показано, что при использовании в качестве антигена рекомбинантных белков OspC геновида *B.garinii* и *B.afzelii*, циркулирующих в популяции клещей Западной Сибири, значительно повышается чувствительность анализов методом ИФА [1].

Ранее фрагменты кодирующих областей генов *OspC* западносибирских изолятов *V.garini* (*OspC_{gar}*) и *V.afzelii* (*OspC_{afz}*) были клонированы в клетках *E.coli* в составе вектора pETm. При сравнительном структурном анализе гомология аминокислотных последовательностей рекомбинантных белков *OspC_{gar}* и *OspC_{afz}* составила 67%, что указывало на наличие отличающихся эпитопов у этих полипептидов [5]. Установленные нуклеотидные последовательности фрагментов генов *OspC_{gar}* и *OspC_{afz}* западносибирских изолятов *V.burgdorferi* s.l. и кодируемые этими генами аминокислотные последовательности депонированы в Международной электронной базе данных «GenBank» под номерами: *OspC_{gar}* – EU979626 и *OspC_{afz}* – EU979627, соответственно.

Нами сконструирована рекомбинантная ДНК, кодирующая химерный полипептид *OspC_{gar+afz}*, содержащий полноразмерные аминокислотные последовательности зрелых белков *OspC* двух изолятов спирохет *V.garini* и *V.afzelii*, циркулирующих на территории Западной Сибири. Согласно расчётам химерный полипептид *OspC_{gar+afz}* должен содержать 390 аминокислотных остатков и иметь молекулярную массу равную 40,83 кДа.

Для получения гена химерного полипептида *OspC_{gar+afz}* 3' – конец клонированного гена зрелого белка *OspC_{gar}* в составе модифицированного экспрессирующего вектора pETm состыковывали с помощью ДНК-лигазы бактериофага T4 с 5'-концом ампликона гена зрелого белка *OspC_{afz}*. По данным электрофоретического анализа ген химерного полипептида *OspC_{gar+afz}* имел размер 1170 п.н. Об экспрессии химерного гена полипептида *OspC_{gar+afz}* судили по при-

сутствию на электрофореграммах в лизатах клеток штамма-продуцента целевого белка с молекулярной массой около 40,8 кДа. Таким образом, полученная конструкция обеспечивала биосинтез химерного полипептида *OspC_{gar+afz}*, содержащего аминокислотные последовательности зрелых белков *OspC_{afz}* и *OspC_{gar}* [3].

На первом этапе работы по изучению антигенной активности химерный рекомбинантный полипептид *OspC_{gar+afz}* был исследован с помощью вестерн-блот анализа со смесью сывороток крови больных ИКБ в титре 1:100. В качестве отрицательного контроля использовали лизаты клеток *E. coli* BL21 (DE3), несущих вектор без вставки гена *OspC_{gar+afz}*. Вестерн-блот анализ продемонстрировал специфичность связывания антител сывороток больных ИКБ с *OspC_{gar+afz}*. В аналогичном эксперименте этот полипептид не реагировал с антителами сывороток здоровых доноров.

Полученные результаты позволили приступить к оценке антигенной активности и специфичности химерного полипептида *OspC_{gar+afz}* по его способности взаимодействовать с антителами сывороток крови больных ИКБ, здоровых доноров, больных сифилисом и ревматоидным артритом. При исследовании в ИФА сывороток здоровых доноров на наличие IgM и IgG специфических к антигену *OspC_{gar+afz}* была предварительно определена OD_{492} крит. Кроме того, показано, что оптимальная концентрация антигена *OspC_{gar+afz}* для сорбции на полистироловый носитель составляет 2 мкг/мл. Результаты определения специфических IgM и IgG антител к химерному полипептиду *OspC_{gar+afz}* в сыворотках больных ИКБ и контрольных сыворотках приведены в таблице.

Специфические IgM и IgG антитела к химерному полипептиду *OspC_{gar+afz}* в сыворотках больных ИКБ и контрольных сыворотках

Сыворотки	Количество положительных сывороток (%)				
	антитела	ИКБ	БС (n=20)	БРА (n=12)	ЗД (n=30)
локализованная стадия ИКБ (n=36)	IgM	21 (58,3)	0	0	0
	IgG	19 (52,7)	0	0	0
диссеминированная стадия ИКБ (n=19)	IgM	11 (57,9)	0	0	0
	IgG	13 (68,4)	0	0	0

n – количество исследуемых образцов сывороток; ИКБ – больные иксодовым клещевым боррелиозом; БС – больные сифилисом; БРА – больные ревматоидным артритом; ЗД – здоровые доноры.

Как видно из данных таблицы из 36-ти образцов сывороток крови больных ИКБ с локализованной стадией инфекции на наличие IgM антител к антигену OspC^{gar+afz} 21 (58,3%) сыворотки были положительными. Из 19 сывороток больных ИКБ с диссеминированной стадией инфекции специфические IgM антитела к OspC^{gar+afz} выявлены в 11-ти (57,9%) сыворотках. При тестировании в IgG ИФА 36-ти образцов сывороток больных ИКБ с локализованной стадией инфекции и 19-ти образцов сывороток больных ИКБ диссеминированной стадией инфекции положительные результаты были выявлены более чем в 50% сывороток. Специфические IgG антитела к антигену OspC^{gar+afz} обнаруживали в 19 (52,7%) сыворотках больных ИКБ с локализованной стадией инфекции и в 13-ти (68,4%) сыворотках больных ИКБ диссеминированной стадией инфекции. Следует отметить, что количество позитивных результатов при исследовании сывороток больных с диссеминированной стадией инфекции в IgG ИФА было выше, чем в IgM ИФА. Можно предположить, что химерный полипептид OspC^{gar+afz} более пригоден для обнаружения IgM антител у больных ИКБ с локализованной стадией инфекции и для обнаружения IgG антител у больных с диссеминированной стадией инфекции. По результатам исследований специфические антитела к антигену OspC^{gar+afz} определялись в сыворотках большинства больных ИКБ. Однако, даже использование антигена OspC^{gar+afz} не способно выявить все положительные сыворотки больных ИКБ. Иными словами, чем больше специфических антигенов будет вовлечено в исследование, тем больше будет надежность и достоверность такого анализа.

По результатам исследования в IgM ИФА и IgG ИФА контрольных отрицательных сывороток (здоровых доноров, больных сифилисом и ревматоидным артритом) мы наблюдали высокие показатели диагностической специфичности химерного полипептида OspC^{gar+afz}. При исследовании этих сывороток в IgM ИФА и IgG ИФА с антигеном OspC^{gar+afz} не было получено ни одного ложноположительного результата. Из этого следует, что химерный полипептид OspC^{gar+afz} не содержит эпитопов перекрещивающихся с эпитопами других антигенов, вследствие чего не дает неспецифических сигналов в иммуноферментном анализе. Это, в свою очередь, обеспечивает повышение специфичности диагностики ИКБ. Следует отметить, что полученные результаты расходятся с ожидаемыми показателями

чувствительности анализа, спрогнозированными нами ранее на основе анализа индивидуальных антигенов с сыворотками больных ИКБ на различных стадиях заболевания [5]. Вероятно, такое различие можно объяснить неоднородностью панелей сывороток, на которых проводились исследования ранее и в настоящей работе.

Выводы

Сконструирован штамм *E. coli* – продуцент химерного полипептида OspC^{gar+afz}, содержащего состыкованные между собой аминокислотные последовательности зрелых белков OspC^{gar} и OspC^{afz}. Продемонстрирована антигенная активность химерного полипептида OspC^{gar+afz} методом ИФА в экспериментах с сыворотками больных ИКБ, что свидетельствует о перспективности его использования для серодиагностики ИКБ.

Список литературы

1. Караваев В.С., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Иммунохимический анализ рекомбинантных белков OspC западно-сибирских изолятов *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii*. // Журнал микробиол. эпидемиол. иммунобиол. – 2010. – № 1. – С. 20-23.
2. Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Ковалевский Ю.В. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов в России // Паразитология. – 2002. – № 36 (3). – С. 177-187.
3. Беклемишев А.Б., Рябченко А.В., Караваев В.С. Рекомбинантные химерные полипептиды, несущие эпитопы различных иммунодоминантных белков спирохет комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* и способ диагностики иксодового клещевого боррелиоза. // Патент России № 2514230, опубликован 03.03.2014.
4. Рябченко А.В., Ивлева И.Н., Беклемишев А.Б. Комплексная оценка зараженности клещей *Ixodes persulcatus*, распространённых в рекреационной зоне новосибирского научного центра, спирохетами *Borrelia burgdorferi s.l* // Журнал инфекционной патологии. – 2004. – № 11 (3-4). – С. 107-110.
5. Рябченко А.В., Караваев В.С., Беклемишев А.Б. Сравнительный структурный и иммунохимический анализ рекомбинантных антигенов OspC новосибирских изолятов спирохет *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2010. – № 2. – С. 6-12.
6. Aguero-Rosenfeld M.E. Diagnosis of lyme borreliosis / M.E. Aguero-Rosenfeld, G Wang, I Schwartz, G.P. Wormser // Clin Microbiol Rev. – 2005. Vol. 18, № 3. – P. 484-509.
7. Baranova E. Rational design of antigens to improve the serodiagnosis of tick-borne borreliosis in central regions of Russia / E. Baranova, Ev P. Solov, E Panfertsev, A Baranova, G Feduykina, L Kolombet, MG Morshed, S Biketov // Adv Exp Med Biol. – 2014. Vol. 807. – P. 9-21.
8. Kenedy MR, Lenhart TR, Akins DR. The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2012. Vol. 66, № 1. – P. 1-19.
9. Rauer, S. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant OspC and the internal 14-kDa flagellin fragment for serodiagnosis of early Lyme disease / S. Rauer, N. Spohn, C. Rasiyah, U. Neubert, A. Vogt // J. Clin. Microbiol. – 1998. – Vol. 36. – P. 857-61.
10. Wilske B.V., Fingerle U., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2007. Vol. 49, № 1. – P. 13-21.