

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ РЕФОЛДІНГА РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА SPAA *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE*

О. М. Дерябін

Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ

Робота присвячена оптимізації схеми ренатурації рекомбінантного білка SPAA(tr) *Erysipelothrix rhusiopathiae* для отримання його в антигенно- та імуногенноактивній формі.

Показано, що найбільш ефективна експресія білка відбувалася при використанні аутоіндукції. Ефективний рефолдінг білка SPAA(tr) досягнутий шляхом контрольованого зниження концентрації денатуруючого реагента, зміни складу буфера для ренатурації та оптимізації параметрів хроматографічного процесу. Чистота препарату рекомбінантного білка становила понад 90 %.

Антигенна специфічність рекомбінантно відтвореного білка SPAA доведена в серологічних тестах (імуноблотинг, непрямий варіант ІФА) з поліклональними антитілами до музейних штамів *Erysipelothrix rhusiopathiae* та з моноспецифічною сироваткою кролів на рекомбінантний білок SPAA(tr) і лізатами культур штамів *Erysipelothrix rhusiopathiae* різних серотипів.

Ключові слова: БЕШИХА, РЕКОМБІНАНТНИЙ БЛОК SPAA, РЕФОЛДІНГ, ІММОБІЛІЗАЦІЙНА МЕТАЛАФІННА ХРОМАТОГРАФІЯ, АНТИТІЛА

Бактерія *Erysipelothrix rhusiopathiae* відноситься до родини *Corynebacteriaceae* і є збудником хвороби — бешихи свиней (*Erysipelas suum*), яка характеризується запальною еритемою шкіри та септичними явищами, а також ураженням суглобів, веррукозним ендокардитом та некротичними ураженнями шкіри [1]. Основним джерелом інфекції є свині, у яких захворювання перебігає найчастіше в гострій формі, та гризунів. В утворенні протективного імунітету при бешихі головну роль відіграють специфічні антитіла, тому імунопрофілактика захворювання базується на застосуванні вакцин: живих — на основі авірулентних штамів збудника (наприклад, широко розповсюджений штам ВР-2) та інактивованих — на основі бактеринів або лізатів патогенних штамів як суміші можливих антигенів [2]. Такі вакцини з різною ефективністю захищають свиней тільки від гострої форми захворювання, а живі вакцини ще й здатні викликати хронічну форму захворювання та розвиток імуносупресивного стану. Щодо недоліків інактивованих вакцин — найчастіше вони мають недостатню імуногенність. Загальним недоліком для виробництва обох класичних типів вакцин є необхідність в досить складному культивуванні бактерії *Er.rhusiopathiae* в значних об'ємах, а їх використання породжує необхідність в поглибленому вивченні екологічних питань, в першу чергу — бактерійності та еволюційної мінливості (на сьогодні вже нараховується 28 серотипів) збудника бешихи при тривалому та масштабному використанні вакцин, виготовлених з цілісних клітин бактерій; виділення бактерій в навколишнє середовище, де збудник тривалий час зберігається і навіть розмножується в ґрунті, а також пасажується через організм гризунів, в популяції яких проходить селекціонування за ознаками вірулентності [3].

Одним з сучасних методів створення нових типів вакцин проти бешихи є конструювання рекомбінантних протективних антигенів в системі прокаріотів [4], що гарантує їх повну безпечність для тварин і людей та відсутність забруднення патогеном навколишнього середовища.

У *Er.rhusiopathiae* на даний час описано кілька поверхневих протеїнів, одним з яких є протективний антиген SPAA [5–7]. Продуктування цього протеїну характерно для всіх штамів збудника бешихи [8, 9] і, як було показано, очищений білок SPAA забезпечує синтез у свиней протективних опсонізуючих антитіл [10].

У попередніх дослідженнях нами була зконструйована рекомбінантна плазмідна ДНК pSPAA(tr), що кодує фрагмент послідовності гена SPAA *Er.rhusiopathiae*; та отримано штам *Escherichia coli* B121(SPAttr), який є трансформованим вказаною плазмідною та являє собою продуцент рекомбінантного білка SPAA *Er. rhusiopathie* з М.м.47 кДа [11,12]. Метою досліджень полягала в оптимізації рефолдинга рекомбінантного білка SPAA(tr) *Er.rhusiopathiae* для отримання його в розчинній формі та характеристиці антигенних властивостей.

Матеріали і методи

У дослідях були використані штами бактерії *Er.rhusiopathiae*, що зберігаються в колекції ІВМ НААН — штам «Київський» (патогенний місцевий ізолят), високовірулентний штам «149» (використовується для контрольного зараження свиней), вакцинні штами «М2-ВК» та «ВР-2» (варіант ІВМ), вірулентні штами «419» (використовується для контрольного зараження мишей), «1933», «93», «Ш» та «251».

Для експресії рекомбінантного білка SPAA(tr) було використано модифікований протокол аутоіндукції [13]. Детектування накопичення білка SPAA(tr) в бактеріальній тільці- включення проводили методом імуноблотингу білків на нітроцелюлозній мембрані Hybond-C Extra («Amersham Biosciences») з розведеною буфером у 20 разів гіперімунною сироваткою мурчаків на штам «1933» бактерії *Er. rhusiopathiae*. В якості негативного контролю використали сироватку крові неімунізованих мурчаків. Для проявлення мембрани використовували кон'югат з пероксидазою хрому (Anti-Guinea Pig IgG conjugate) («Sigma») та субстрат 4-хлоро-1-нафтол («Sigma»).

Для характеристики специфічності очищеного рекомбінантного білка SPAA(tr) методом вестерн-блоту була використана моноспецифічна антисироватка кролів на рекомбінантний білок SPAA(tr). Для проведення імуноферментного аналізу (ІФА) були використані сироватки крові свиней з господарства з перебігом гострої форми бешихою. В якості негативного контролю використали сироватку крові не імунізованих та не інфікованих свиней. Непрямий варіант ІФА (з використанням антивидових кон'югатів проти імуноглобулінів свині та кроля, мічених пероксидазою хрому («Sigma»)), проводили за стандартним протоколом на 96 лункових стрипованих планшетах («Titertek»). Антиген для адсорбції наносили в концентраціях 0,2–0,5 мкг білка на лунку при +4°C протягом ночі. Результати реєстрували при $\lambda = 450$ нм та 492 нм.

Очищення та ренатурацію рекомбінантного білка SPAA(tr) виконували методом іммобілізаційної металафінної хроматографії в денатуруючих умовах на 1 см³ HiTrap chelating колонці, під'єднаної до хроматографічної системи FPLC («Pharmacia»). Масштабування процесу ренатурації проводили з використанням 26/20 ХК колонки («GE Helthcare»), в яку упаковували 20 см³ Ni-NTA Superflow агарози («Qiagen»).

Електрофорез білків проводили в 12 % ДСН-ПААГ за методом U. Laemmli [14]. Чистоту білків та вихід ренатурації визначали методом денситометрування електрофореграм.

Результати й обговорення

Експресія клонованих генів у бактеріальних клітинах широко використовується у промисловості, фармацевтиці, структурних і біохімічних дослідженнях. Бактерії продукують великі кількості рекомбінантних білків. Такий синтез відносно недорогий і легко відтворюється. Однак, при суперпродукції гетерологічних білків часто спостерігається їх агрегація — утворення внутрішньоклітинних тілець-включень. Основними етапами, що виконуються для ренатурації білків з тілець-включень є: виділення і очищення тілець-включень; солюбілізація агрегованого білка та рефолдінг солюбілізованого білка. Незважаючи на те, що ефективність двох перших етапів може бути відносно високою, кінцевий вихід цільового продукту часто є обмеженим у зв'язку з утворенням неактивних, неправильно денатурованих форм білка (місфолдінг), а також їх агрегацією [15, 16, 17]. Експресія рекомбінантних білків у вигляді тілець-включень має ряд переваг, пов'язаних з високим рівнем накопичення цільового білку, відсутністю (в основному) ефекту токсичності для клітини-хазяїна, обмеженням його внутрішньоклітинного протеолізу та впливу інших факторів. Водночас, головним недоліком такого синтезу є складність відокремлення правильно ренатурованого білка від його олігомерних форм і продуктів місфолдінгу, що напряду впливає на антигенну та біологічну активність рекомбінантного білка при його наступному використанні.

Ген білка SPAA *Er.rhusiopathiae* кодує поліпептид, що складається з 597 амінокислот (АК), а також 29 АК можливої сигнальної послідовності, що приводить до утворення зрілого протеїну з М.м. 67–69 кДа. Рекомбінантний білок SPAA(tr) відтворює N-термінальну частину молекули з усіма В-епітопами та має М.м. 47 кДа. Найбільш ефективна експресія білка спостерігалась при використанні аутоіндукції (рис. 1).

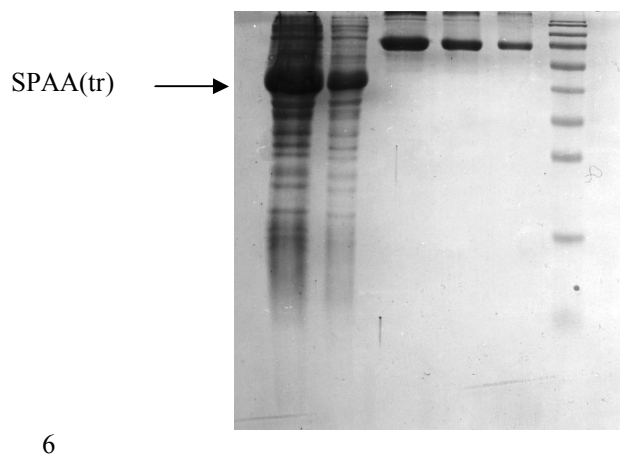


Рис. 1. Електрофореграма лізатів клітин *Escherichia coli*, в яких індукували синтез SPAA(tr) з М.м. 47 кДа (за протоколом аутоіндукції, об'єм 0,1 см³). Варіанти: 1–2 — лізати клітин (нанесено 0,01 см³ і 0,002 см³ суспензії бактеріальних клітин); 3–5 — БСА (нанесено — 3, 1.5, 0.75 мкг); 6 — білки-маркери молекулярної маси (130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 кДа)

Для спрощення технології очищення та рефолдінга рекомбінантного білка SPAA(tr), при клонуванні нами був використаний плазмідний вектор, який забезпечує синтез на карбоксильному кінці білка 6 АК залишків гістидину, завдяки чому стало можливим використати іммобілізаційну металафінну хроматографію. Ефективна ренатурація білка SPAA(tr) була досягнута за рахунок контрольованого зниження концентрації денатуруючого реагенту та оптимізації параметрів хроматографічного процесу і зміни складу буфера для ренатурації (рис. 2).

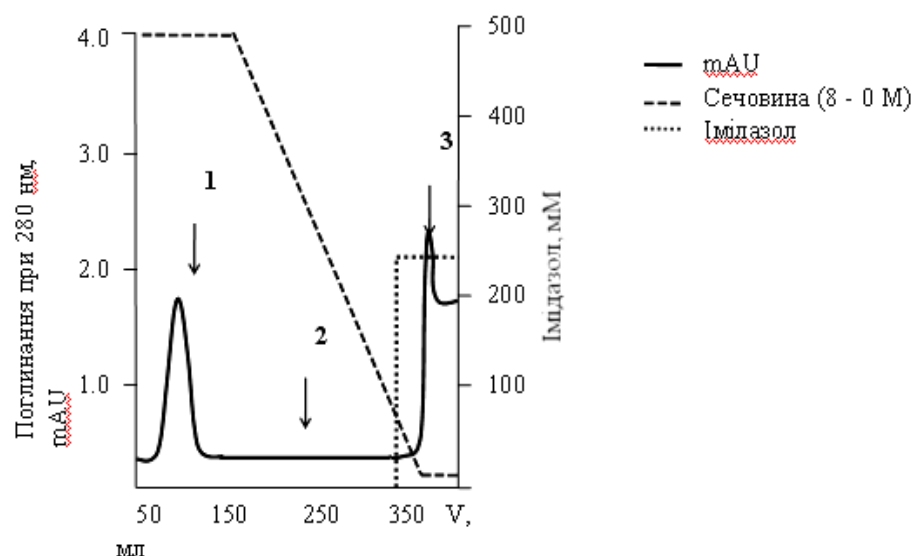


Рис. 2. Хроматограма очищення та ренатурації білка SPAA(tr) на металафінній колонці. 1 — білки, солюбілізовані з тілець-включень, що наносились на колонку; 2 — білки, які видаляються при промиванні колонки буфером, що містить сечовину; 3 — ренатурований білок SPAA(tr), отриманий елюцією 250 мМ імідазолом

Чистота препарату білка SPAA(tr), який елюється як мономер, становила понад 90 %. Білок був водорозчинним та функціонально активним протягом року при зберіганні його в буфері для елюції при +4 °С.

Антигенна специфічність білка SPAA(tr) була перевірена методом імуноблотінгу з гіперімунною поліклональною сироваткою крові мурчаків, імунізованих музейним штамом «1933» (серотип 16) *Er.rhusiopathiae* (рис. 3).

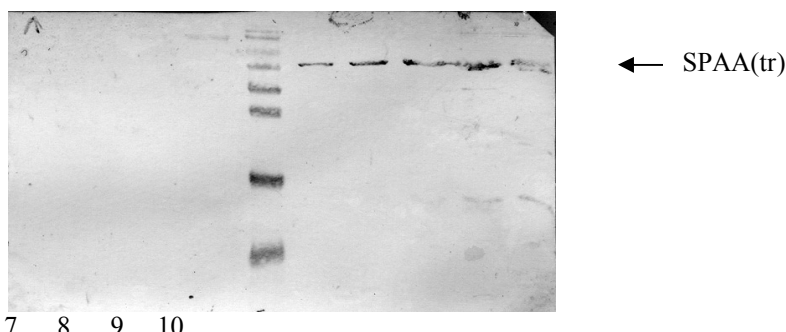
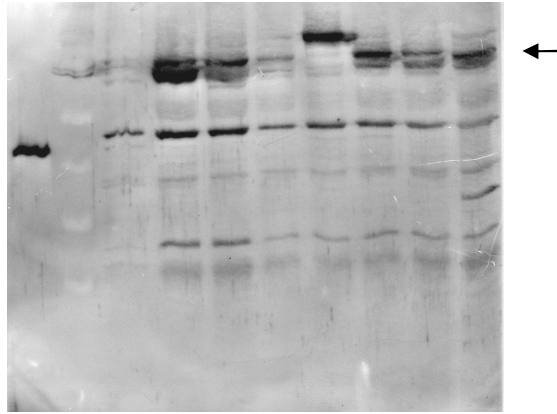


Рис. 3. Блотограми результатів зв'язування поліклональних антитіл мурчаків до білків (штам «1933») бактерії *Er. rhusiopathiae* з рекомбінантним білком SPAA(tr). Варіанти: 1 — зразок БСА (0,15мкг), 2 — зразок БСА (0,75 мкг), 3 — зразок БСА (1,5 мкг), 4 — зразок БСА (3 мкг), 5 — маркер молекулярної маси «Prestained Protein Ladder» (Fermentas), 6 — тільця включення 0,00025 см³ культури *E.coli*, 7 — тільця включення 0,0005 см³ культури *E.coli*, 8 — тільця включення 0,001 см³ культури *E.coli*, 9 — тільця включення 0,002 см³ культури *E.coli*, 10 — тільця включення 0,003 см³ культури *E.coli*

Для більш повної характеристики антигенної ідентичності рекомбінантно відтвореного білка була отримана гіперімунна моноспецифічна антисироватка кролів до афінноочищеного рекомбінантного білка SPAA(tr). Для мінімізації можливих неспецифічних реакцій гіперімунізацію кролів проводили з використанням тільки неповного ад'юванта Фрейнда («Difco»). В якості антигенів були використані лізати інактивованих культур бактерії *Er. rhusiopathiae* штамів — «419», «BP-2», «149», «M2-BK», «251», «1933», «93» та «Ш» (рис. 4).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Рис. 4. Блотограми результатів зв'язування моноспецифічних антитіл до рекомбінантного білка SPAA(tr) з лізатами клітин інактивованих культур бактерії *Er. rhusiopathiae*. Варіанти: 1 — білок SPAA(tr), 2 — маркер молекулярної маси «Prestained Protein Ladder» («Fermentas»), 3 — штам «BP-2» (варіант IBM), 4 — штам «1933», 5 — штам «93», 6 — штам «419», 7 — штам «M2-BK», 8 — штам «Ш», 9 — штам «251», 10 — штам «149»

Як видно з наведених результатів, всі досліджені музейні штами *Er. rhusiopathiae* різних серотипів специфічно реагували з моноспецифічною сироваткою на рекомбінантний білок SPAA(tr). Особливу увагу звертає на себе результат, отриманий зі штамом «M2-BK», який підтверджує наявність в гені *SPAA* значної інсерції, як і було описано нами раніше при вивченні поліморфізму гена *SPAA* методом порівняльного рестрикційного аналізу у штамів *Er. rhusiopathiae* різного походження [18, 19].

Для додаткової характеристики антигенних властивостей рекомбінантного білка була перевірена його специфічність з сироватками крові від 7 свиней з господарства, де спостерігалися клінічні прояви гострої форми бешихи (рис. 5).

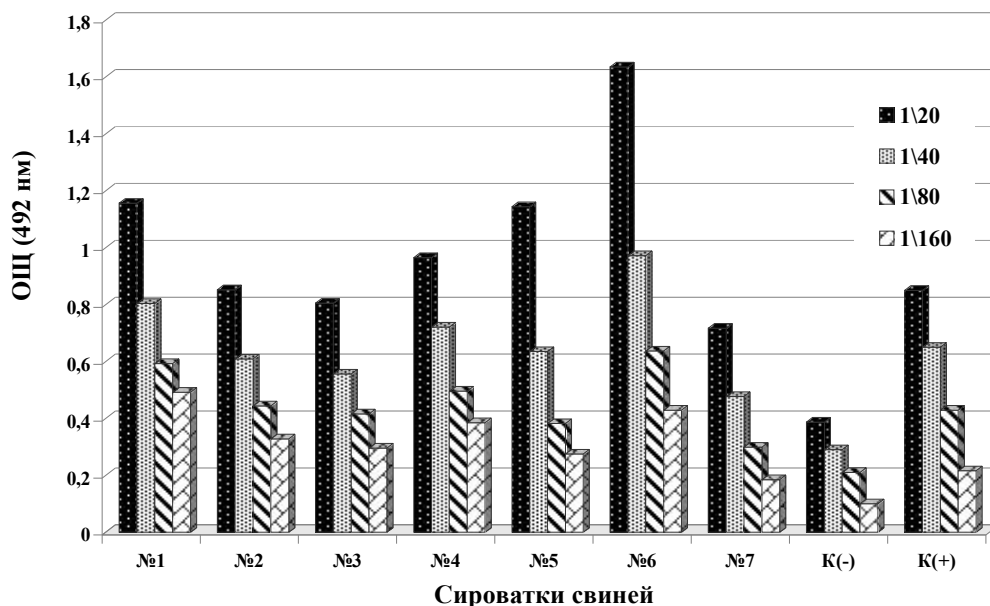


Рис. 5. Результати визначення в непрямому варіанті ІФА специфічності рекомбінантного білка SPAA(tr) з сироватками крові свиней, хворих на бешиху

Рекомбінантний білок SPAA(tr), як антиген, в ІФА реагував позитивно і специфічно з усіма сироватками, хоча більшість з них були сильно гемолізованими.

Висновки

Максимальний ступінь експресії рекомбінантного білка SPAA(tr) в *E. coli* досягнутий при аутоіндукції. З використанням імобілізаційної металоафінної хроматографії для очистки та рефолдінга рекомбінантного білка SPAA(tr) з тілець-включення, отриманий розчинний препарат білка з чистотою, яка сягає більше 90 %.

Підтверджена функціональна активність та висока специфічність ренатурованого SPAA(tr) в серологічних реакціях — імуноблотингу та непрямому ІФА — з поліклональними антитілами проти музейних штамів *Er.rhusiopathiae* різних серотипів та сироватками крові свиней з гострим перебігом захворювання на бешиху.

Показана висока специфічність та активність моноспецифічних анти сирововаток на рекомбінантний білок SPAA(tr) з лізатами культур музейних штамів *Er.rhusiopathiae* різних серотипів.

Підтверджена антигенна унікальність штаму «М2-ВК» (внаслідок збільшення молекулярної маси білка SPAA) методом імуноблотингу з використанням моноспецифічних антисирововаток на рекомбінантний білок SPAA(tr).

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати будуть покладені в основу технології виготовлення субодиничної рекомбінантної вакцини проти бешихи свиней.

O. M. Deriabin

EVALUATION OF REFOLDING EFFICACY OF *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* SPAA RECOMBINANT PROTEIN

S u m m a r y

The study concerns optimization scheme of *Er.rhusiopathiae* recombinant protein SPAA(tr) for its obtaining in antigenic and immunogenic active form. It has been shown that usage of autoinduction led to the most effective protein expression. Efficient refolding of SPAA(tr) protein was achieved by controlled reduction of denaturing agent concentration, changing of renaturation buffer composition and optimization of chromatography process parameters. Recombinant protein purity was over 90 %.

Antigenic specificity of the recombinant SPAA protein was proved in serological tests (immunoblotting, indirect ELISA) with polyclonal antibodies against *Er.rhusiopathiae* museum strains and with monospecific rabbit antiserum against recombinant SPAA(tr) protein and culture lysates of *Er.rhusiopathiae* strains of different serotypes.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕФОЛДИНГА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА SPAА *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE*

А н н о т а ц и я

Работа посвящена оптимизации схемы ренатурации рекомбинантного белка SPAА(tr) *Er.rhusiopathiae* для получения его в антигенно- и иммуногенноактивной форме. Показано, что экспрессия белка происходила наиболее эффективно при использовании аутоиндукции. Эффективный рефолдинг белка SPAА(tr) получен путем контролируемого снижения концентрации денатурирующего агента, изменения состава буфера для ренатурации и оптимизации параметров хроматографического процесса. Чистота препарата рекомбинантного белка составляла более 90 %.

Антигенная специфичность рекомбинантно воспроизведенного белка SPAА доказана в серологических тестах (иммуноблотинг, непрямой вариант ИФА) с поликлональными антителами к музейным штаммам *Er.rhusiopathiae* и с моноспецифической сывороткой кролей на рекомбинантный белок SPAА(tr) и лизатами культур штаммов *Er.rhusiopathiae* различных серотипов.

1. Brooke C. J. Erysipelothrix rhusiopathiae: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen / C. J. Brooke, T. V. Riley // J. Med. Microbiol. — 1999. — Vol. 48, № 9. — P. 789–799.
2. Kobayashi S. Immunological characterisation of protective antigens prepared by alkaline treatment of whole cells and from the culture filtrate of *Er. Rhusiopathiae* / S. Kobayashi, H. Sato, K. Hirose, H. Saito // Epidemiol. Infect. — 1991 — № 12. — P. 637–649.
3. Bender J. S. Characterization of Erysipelotrix Species Isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine Erysipelas outbreaks in United States / J. S. Bender, H. G. Shen, C. K. Irwin // Clinical and vaccine immunology. — 2010. — Vol. 17. — P. 1605–1611.
4. Galan J. E. Cloning and expression in Escherichia coli of a protective antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae / J. E. Galan, J. F. Timoney // Infect. Immun. — 1990. — Vol. 58, № 9. — P. 3116–3121.
5. White T. G. Solubilization and characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* / T. G. White, W. F. Vervey // Infection and Immunity. — 1970. — No 1. — P. 387–393.
6. Sato H. Isolation and purification of a protective protein antigen of *E. Rhusiopathiae* / H. Sato, H. Miyazaki, H. Sakakura // Zentralbil. Veterinarmed. — 1999. — № 2. — P. 47–55
7. Makino S. Surface antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathia* binds to Gram-positive bacterial cell surface / S. Makino, K. Yamamoto, A. H. Zakura, T. Shirahata // FEMS Microbiol. Lett. — 2000. — V. 186. — P. 313–317.
8. Kitajima T. Quantitative diversity of 67 kDa protective antigen among serovar 2 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its implication in protective immune response / T. Kitajima, E. Oishi, K. Amimoto // J. Vet. Med. Sci. — 2000. — Vol. 62, No. 10. — P. 1073–1077.
9. Shimoji Y. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity / Y. Shimoji, Y. Mori, V. A. Fischetti // Infection and immunity. — 1999. — Vol. 67, No. 4. — P. 1646–1651.

10. Imada Y. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs / Y. Imada, N. Goji, H. Ishikawa // *Infect. Immun.* — 1999. — Vol. 67, № 9. — P. 4376–4382.
11. Дерябин О. Н. Клонирование и экспрессия гена SPAA *Erysipelothrix rhusiopathiae* в *Escherichia coli*. / О. Н. Дерябин, Е. Г. Дерябина, П. В. Гильчук // *Biopolymers and Cell.* — 2011. — Vol. 27, N 4. — P. 310–313.
12. Патент на корисну модель №65123 Україна, МПК 2006.01 A61K 39/27. Штам *Escherichia coli* BL21(SPAttr) — продуцент рекомбінантного білку SPAA бактерії *Erysipelothrix rhusiopathiae* / О. М. Дерябін, О. Г. Дерябіна, П. В. Гільчук ; заявник і правовласник Інститут ветеринарної медицини НААН України. — № u4201106054 ; заявл. 16.05.2011 ; опубл. 25.11.2011. — Бюл. № 22. — С. 10.
13. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures / F. W. Studier // *Protein Expr. Purif.* — 2005. — 41 (1). — P. 207–234.
14. Laemmli U. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* — 1970. — V. 227, N. 4. — P. 680.
15. Alibolandi M. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies / M. Alibolandi, H. Mirzahoseini // *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* — 2011. — Vol. 1 (3). — P. 310–318.
16. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics / W. Wang // *Int. J. Pharm.* — 2005. — Vol. 289, № 1–2. — P. 1–30.
17. Li M. In vitro protein refolding by chromatographic procedures / M. Li, Z. G. Su, J. C. Janson // *Protein Expr. Purif.* — 2004. — Vol. 33, № 1. — P. 1–10.
18. Ображей А. Ф. Аналіз поліморфізму гена білка SpaA *Erysipelothrix rhusiopathiae* / А. Ф. Ображей, О. М. Дерябін, А. А. Тарасов та ін. // *Ветеринарна медицина.* — 2007. — № 88. — С. 161–166.
19. Ображей А. Ф. Вплив молекулярно-генетичних особливостей вакцинних штамів *Erysipelothrix rhusiopathie* на проєктивні властивості вакцин / А. Ф. Ображей, О. А. Тарасов, О. М. Дерябін // *Ветеринарна біотехнологія.* — 2009. — № 15. — С. 277–284.

Рецензент: старший науковий співробітник, кандидат ветеринарних наук, завідувач лабораторії екології вірусів ІВМ НААН Краснобаєв Є. О.