

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО БВМ19 *BRUCELLA ABORTUS* И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО АНТИГЕННОСТИ

*А.К. Булашев, К.А. Турсунов,
Ж.К. Каирова, А.С. Сыздыкова*

Аннотация

В статье представлены результаты исследований по созданию штамма продуцента рекомбинантного белка внешней мембраны (БВМ) с молекулярной массой 19 кДа (рБВМ19) *Brucella abortus* и изучению антигенности целевого продукта. Рекомбинантный белок находился в тельцах включения цитоплазмы штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3), который давал максимальное количество целевого продукта при культивировании его в течение суток. Проведены сравнительные исследования сывороток крови крупного рогатого скота (КРС), положительно реагирующего на бруцеллез по классическим серологическим реакциям, в непрямом иммуноферментном анализе (н-ИФА) на основе рБВМ19, рБВМ25 и рБВМ31, а также природных БВМ бруцелл. Сделано заключение о том, что использование единичного рекомбинантного белка в н-ИФА значительно снижает его чувствительность, поэтому эффективные диагностикумы могут быть разработаны на основе применения комплекса белковых антигенов.

Ключевые слова: бруцеллез, белки внешней мембраны, рекомбинантные белки, антигенность, н-ИФА, диагностика.

Введение

Бруцеллез остается одним из самых распространенных зоонозных заболеваний, который вызывает не только большие экономические потери в животноводстве, но также имеет определенное значение для общественного здравоохранения [1-3]. Эффективность программ по борьбе с бруцеллезом в первую очередь зависит от достоверности серологической диагностики. В Казахстане для диагностики бруцеллеза используются

классические серологические реакции, такие как реакция связывания комплемента (РСК), реакция агглютинации (РА), роз бенгал проба (РБП). Данные тесты, основаны на использовании корпускулярных антигенов (цельных клеток) бруцелл, главными компонентами которых являются липополисахариды (ЛПС). Однако, как известно, использование ЛПС приводит к перекрестной реакций с антителами, направленными

против гомологичных эпитопов полисахаридной молекулы отдельных грамтрицательных бактерий, таких как *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* spp. и *Escherichia coli* O:157 [4-6]. Кроме того, традиционные методы серодиагностики не позволяют дифференцировать инфицированных животных от вакцинированных [7-9]. В этой связи, продолжается поиск антигенов, которые лишены

вышеуказанных недостатков. В настоящее время описан ряд белков *Brucella* spp., которые могут быть использованы в качестве потенциальных антигенов в иммуноанализах [10-12]. Одним из таких белков-кандидатов является БВМ19 бруцелл [13-16].

Целью настоящей работы явилось получение рБВМ19 *Brucella abortus* и изучение его антигенности.

Материалы и методы исследований

Штаммы и плазмидный вектор. В работе использовали штаммы *E. coli* DH5 α и *E. coli* BL21(DE3) из лабораторной коллекции Национального центра по биотехнологии РК. В качестве вектора для создания экспрессирующей конструкции использовали плазмиду рЕТ28b+.

Клетки *E. coli* выращивали на жидкой или агаризованной среде Лоурия-Бертани (ЛБ), состоящей из 1% бакто-триптона, 0,5% дрожжевого экстракта и 1% NaCl.

Поиск последовательности, кодирующей белок внешней мембраны бруцелл БВМ19, 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 генно-инженерных работ проводили с использованием пакета программ Vector NTI 11.5 (Invitrogen, США).

Белки внешней мембраны бруцелл. Для сравнительной оценки

рБВМ19 использовали полученные нами ранее рекомбинантные рБВМ25 и рБВМ31 [17]. Кроме того, были использованы природные БВМ выделенные из клеток *B. abortus* 19 по методике, описанной Шенжановым К.Т. и соавт. (2002) [18]. Содержание белков определяли по общеизвестной методике (M. Bradford, 1975) [19].

Сыворотки. Образцы сывороток крови 77 гол. КРС, положительно реагирующего на бруцеллез по результатам классических реакций, были любезно представлены ветеринарной лабораторией Житикаринского района, Костанайской области.

Трансформация хемокомпетентных клеток *E. coli* DH5 α . Для наработки препаративного количества нуклеотидной последовательности, кодирующей БВМ19, полученную конструкцию трансформировали в клетки *E. coli* DH5 α . Для этого, компетентные клетки размораживали на льду в течение

30 минут. Затем добавляли 2 мкл BVM19/pET28b+ и инкубировали еще 30 минут на льду. Далее помещали пробирку на 30 секунд в водяную баню при 42°C, после чего перенесли в лед на 1-5 минут. К полученной смеси добавляли 1 мл питательной среды 2X YT и инкубировали при 37°C, 150 об/мин, в течение 40 минут. После инкубации центрифугировали пробирку при комнатной температуре в течение 5 минут, 5000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, оставляя около 100 мкл, осадок ресуспендировали и высевали на селективную среду с канамицином (50 мкг/мл). Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение ночи.

Для выявления положительных клонов, проводили скрининг выросших колоний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием коммерческих праймеров T7. Положительную колонию нарабатывали методом культивирования в 100 мл ЛБ/канамицин при 37°C, 150 об/мин, в течение ночи. Затем осаждали культуру клеток центрифугированием при 4°C, 6000 об/мин, в течение 10 минут. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок использовали для выделения плазмиды. Плазмиду выделяли с помощью коммерческого набора HiPure Plasmid Midiprep Kit (Вильнюс, Литва).

Трансформация электрокомпетентных клеток E. coli BL21(DE3). Для определения экспрессии рекомбинантного белка

полученную плазмиду трансформировали в электрокомпетентные клетки. Для этого, клетки размораживали на льду 15 минут, добавляли 2 мкл плазмиды (50 нг/мкл) и переносили в охлажденную кювету. Выбирали режим пульса EC-2 (V=2500). Тщательно протирали поверхность кюветы, помещали в туннель электропаратора и сделали один пульс. Затем добавляли в кювету 950 мкл среды 2X-YT, переносили содержимое в пробирку и инкубировали 45 минут при 37°C, 150 об/мин. 50 мкл клеточной суспензии высевали на селективную среду с канамицином (50 мкг/мл). Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение ночи. Для определения положительного клона повторяли ПЦР скрининг с использованием коммерческих праймеров T7. Положительную колонию нарабатывали в 50 мл ЛБ/канамицин и сохраняли криоконсервацией.

Определение экспрессии pBVM19. Выросшими колониями инокулировали колбу, содержащую 100 мл среды ЛБ с добавлением канамицина до 50 мкг/мл. Культуру выращивали при 37°C до ОП₆₀₀ = 0,6-0,8. Затем индуцировали экспрессию рекомбинантного белка добавлением ИПТГ до 0,5 мМ. После добавления индуктора температуру инкубации снижали до комнатной температуры (24-26°C) и продолжали культивирование, отбирая пробы (5 мл) через 2 ч, 4 ч, 6 ч, после индукции в течение ночи и через 24 ч. Собранные пробы обрабатывали следующим образом.

Биомассу бактерий собирали центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин, 4°C) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора, следуя рекомендациям производителя прибора. Полученный лизат осветляли центрифугированием (11000 об/мин, 30 мин). По 3 мкл каждого осветлённого лизата использовали для приготовления проб для электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН).

Анализ белков в ПААГ-ДСН. Электрофорез с исходным лизатом, растворимой и нерастворимой фракций проводили в 12% ПААГ-ДСН по методу U.Laemmli на аппарате для вертикального электрофореза (Bio-Rad, США) [20]. Тщательно промытые и обезжиренные стеклянные пластины (7×10) монтировали с помощью прокладок и зажимов. 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 М 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 заливали оставшееся пространство раствором для концентрации геля, приготовленного по следующей прописи: 1 мл 30% акриламида; 1 мл 1% бисакриламида; 2,5 мл 0,5 М 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. Сразу же после заливки концентрирующего геля устанавливали гребенку до полной полимеризации.

Буфер для разведения образцов готовили следующим образом: к 0,315 мл 1М трис-HCl (pH 6,8) добавляли 0,25 мл 2-меркаптоэтанола; 0,5 мл глицерина, 0,115мл 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 Кумасси R-250 и отмывали в нескольких сменах обесцвечивающего раствора до полного исчезновения фоновой окраски.

Очистка и хроматография рБВМ19. Рекомбинантный белок очищали с помощью металл-аффинной хроматографии с использованием коммерческих колонок HisTrap Columns (GE Healthcare Life Sciences, Cardiff, UK) в соответствии с наставлениями производителя.

Определение антигенности рБВМ19 методом н-ИФА. Лунки 96-луночного планшета иммобилизовали рБВМ19 в концентрации 1 мкг/мл, растворенным в бикарбонатном буфере, pH 9,6. Планшет инкубировали при 4°C, в течение ночи и промывали 3 раза фосфатно-

солевым буфером (ФСБ), рН 7,4. Далее вносили исследуемые образцы сыворотки крови в заранее установленном оптимальном разведении и инкубировали 1 час при 37°C. После повторения процедуры промывки, вносили по 100 мкл/лунку антивидовые антитела (anti-bovine), меченные пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) в рабочем разведении. Инкубировали 1 час при 37°C и

Результаты исследований

Для создания генетической конструкции, служащей основой для экспрессии рекомбинантного антигена, нами был проведен анализ международной базы данных Genbank и отобрана наиболее оптимальная

"MGISKASLLSLAAAGIVLAGCQSSRLGNLDNVSPPPPPAPVNAVPA GTVQ KGNLDSPTQFPNAPSTDMSAQSGTQVASLPPASAPDLTPGAVAGVWNASL GGQSKKIATPQTKYGGQYRAGPLRCPGELANLASWAVNGKQLVLYDANG GTVASLYSSGQGRFDGQTTGGQAVTLRS"

```
1 atgggaattt caaaagcaag tctgtcagc ctgcgcgagg ctggcattgt cctggccggg
61 tgccagagct cccggcttgg taatctcgat aatgtttcgc ctccgccgcc gcctgcaccg
121 gtcaatgctg ttccggcagg cacggtgcag aaaggcaatc ttgattctcc cacacaattc
181 cccaatgcgc cctccacgga tatgagcgcg caatccggca cacaggtcgc aagcctgccg
241 cctgcatccg caccggacct gacgcccggc gccgtggctg gcgctctggaa cgcctcgctt
301 ggtggtcaga gctgcaagat cgcgacgccg cagaccaa atggccaggg ctatcgcgca
361 ggcccgtgc gctgccccgg tgaactggct aatcttgcct cctgggccgt caatggcaag
421 caactcgtcc ttacgatgc gaacggcggg acggttgcct cgctctattc tcaggacag
481 ggccgcttcg atggccagac caccggcggg caggccgtga cgctgtcgcg ctga
```

Приведенная нуклеотидная последовательность была синтезирована компанией Bio Basic (Канада) и получена в лиофилизированном виде в концентрации 4 мкг. По рекомендации производителя полученные образцы ДНК были растворены в 40 мкл воды mQ.

промывали ФСБ. Реакцию проявляли добавлением субстрата ортофенилендиамин (ОФД) и останавливали 2,5 М H₂SO₄. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре, при длине волны 492 нм. Результат н-ИФА считали положительным, если значение ОП исследуемого образца превышало экстинцию контрольной пробы в 2 и более раза.

последовательность гена, кодирующего БВМ19 *B. abortus*.

Ниже представлена полная аминокислотная последовательность данного белка, а также нуклеотидная последовательность его гена, состоящая из 567 п.н.

Разведенные образцы хранили при – 20°C.

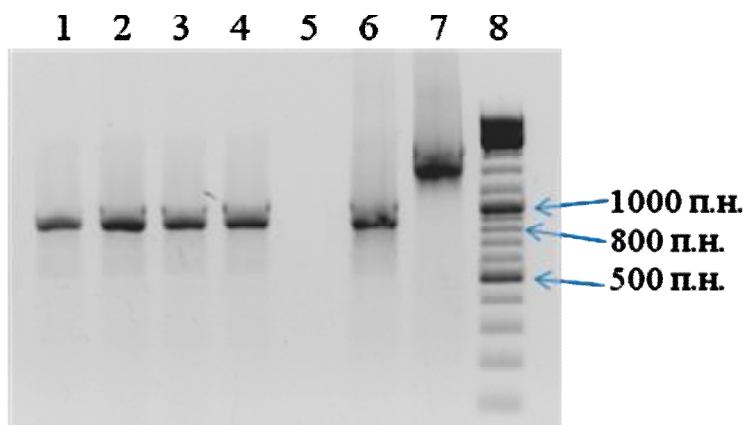
В результате проведенной работы нами была получена генетическая конструкция на основе вектора рЕТ28b+, включающая в себя последовательность гена, кодирующего необходимый белок,

а также 6His-Tag, применяемый при очистке и изоляции белкового компонента из общей бактериальной массы.

Для дальнейших работ плазида, несущая последовательность гена БВМ19, была трансформирована в компетентные клетки *E. coli* DH5 α

для получения препаративного количества плазмиды.

Для определения наличия трансформированных генов был проведен ПЦР-скрининг колоний с чашки Петри (рисунок 1). В качестве праймеров использовали T7 Forward и T7 Revers.



1-4 – колонии; 5 – отрицательный контроль; 6 – положительный контроль №1; 7 – положительный контроль №2; 8 – ДНК маркер

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР продуктов

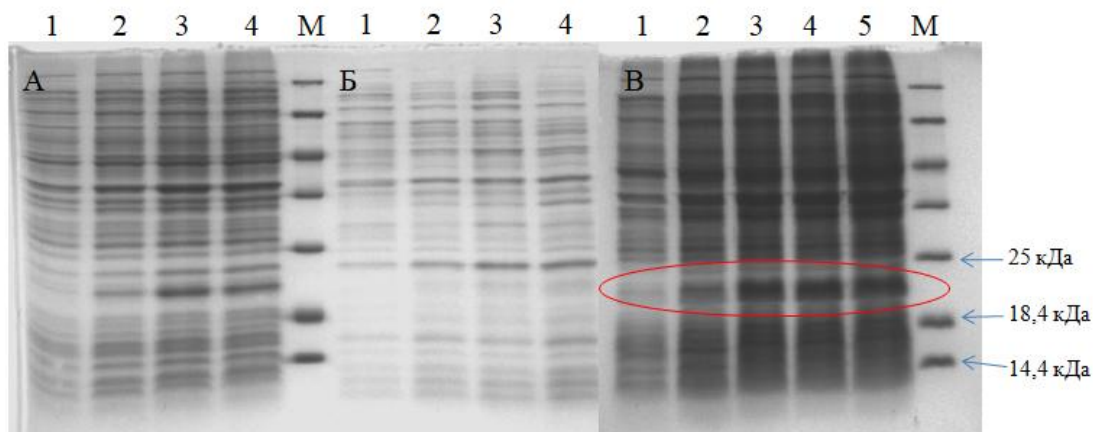
Как видно из рисунка 1, трансформация прошла успешно. Длина гена БВМ19 составляет около 870 п.н., что соответствует ожидаемому размеру.

Для дальнейшей работы колонию №1 скалывали на большой объем селективной питательной среды (ЛБ/канамицин, 50 мкг/мл), культивировали в течение ночи при 37°C и покачивании в режиме 150 об/мин. Затем выделяли плазмиды из культуры клеток.

С целью получения штамма-продуцента рекомбинантного белка полученная конструкция была трансформирована в клетки *E. coli* штамма BL21 методом электропарации. Для определения

наличия трансформированного гена был проведен ПЦР-скрининг нескольких колоний с каждой чашки Петри. Определение вставки производили с помощью вышеописанной методикой постановки ПЦР.

Полученный штамм-продуцент культивировали при температуре 37°C до оптической плотности 0,6-0,8 при длине волны 600 нм. Далее, добавляли изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) и инкубировали при 24-26°C, 150 об/мин. Индукция проходила в течение ночи при концентрации ИПТГ 0,5 мМ. Ниже приведены электрофореграммы белков клеток штамма-продуцента рБВМ19 (рисунок 2).

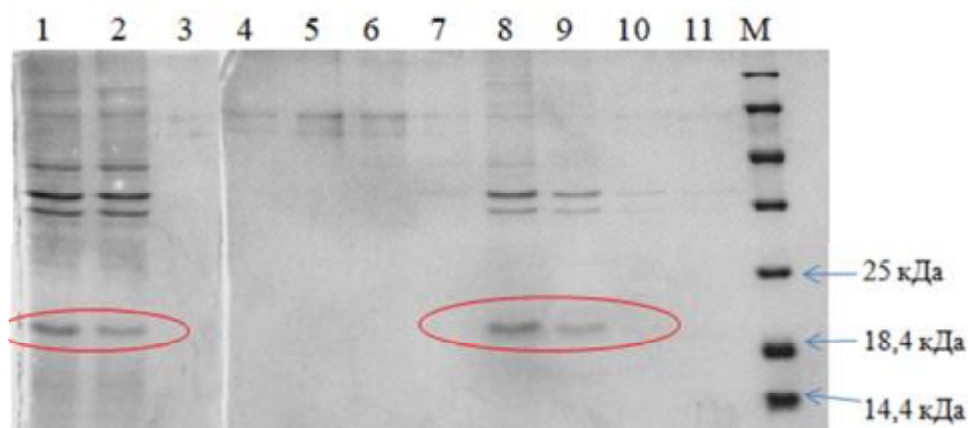


А – Общий спектр белков, Б – Белки в надосадочной жидкости, В – Белковый спектр телец включения: 1 – до добавления ИПТГ; 2 – 2 часа после добавления ИПТГ; 3 – 6 часов после добавления ИПТГ; 4 – в течение ночи после добавления ИПТГ; 5 – 24 часа после добавления ИПТГ; М – маркерные белки

Рисунок 2 - Электрофорез лизата клеток, экспрессирующие рБВМ19

Как видно из рисунка 2, рекомбинантный белок локализуется во фракции телец включения. Наибольшее количество белка наблюдается при культивировании в течение 24 часов. Размер индуцированного белка был равен 20 кДа.

Для металл аффинной хроматографии использовали коммерческие колонки HisTrap Columns. В качестве образца брали фракцию надосадочной жидкости III, с содержанием 8 М мочевины, полученную при очистке (рисунок 3).



1 – Надосадочная жидкость III, 2 – Надосадочная жидкость прошедшая через колонку, 3 – Промывка колонки, 4 – 50 мМ ИПТГ I, 5 – 50 мМ ИПТГ II, 6 – 150 мМ I, 7 – 150 мМ II, 8 – Фракция I (500 мМ ИПТГ), 9 – Фракция II (500 мМ ИПТГ), 10 – Фракция III (500 мМ ИПТГ), 11 – Фракция IV (500 мМ ИПТГ), М – маркерные белки

Рисунок 3 - Электрофорез фракций рБВМ19 после хроматографии

Как видно из рисунка 3, не весь белок остался в колонке. Часть белка прошла во фракцию надосадочной жидкости

прошедшей через колонку и поэтому мы наблюдаем малое количество очищенного рекомбинантного белка в лунках 8

и 9 (Фракция I и Фракция II, соответственно). Для получения очищенного рБВМ19 необходимо провести дальнейшие исследования по оптимизации методики этой работы.

Антигенность рБВМ19 изучали методом н-ИФА с

использованием сывороток 77 голов КРС, положительно реагирующего на бруцеллез по результатам традиционных реакций (РБП и РА).

Таблица 1 – Результаты серологических исследований сывороток КРС в н-ИФА

Кратность ОПи/ОПк	Белковые антигены бруцелл, использованные в н-ИФА			
	рБВМ19	рБВМ25	рБВМ31	БВМ <i>V. abortus</i>
	Количество исследованных голов			
до 1,49*	20	6	12	3
от 1,50 до 1,99*	27	29	6	2
от 2,00 до 2,50**	22	23	9	3
от 2,51 до 3,00**	3	11	8	2
от 3,01 до 3,50**	2	5	20	-
от 3,51 до 4,00**	2	2	10	3
от 4,00 и выше**	1	1	12	65
Количество серопозитивных животных, гол.	30	42	59	73
Средний показатель ОПи/ОПк	2,56±0,13	2,55±0,08	3,5±0,12	6,63±0,23
Примечания:				
1) ОПи - ОП исследуемой пробы; ОПк - ОП контрольной пробы;				
2) * - Значения кратности ОПи/ОПк, принятые за отрицательный результат;				
3) ** - Значения кратности ОПи/ОПк, принятые за положительный результат.				

Как видно из таблицы 1, наибольшее количество серопозитивных животных (73 гол., или 94,8%) отмечается при использовании в н-ИФА БВМ *V. abortus*. Далее идут рБВМ31 – 59 гол. (76,6%) и рБВМ25 – 42 гол. (54,5%). Антитела по отношению к рБВМ19 были обнаружены в образцах сывороток крови 30 гол.

(39%). Причем, сыворотки крови 8 гол., или 10,4%, давали наиболее интенсивную окраску реакционной жидкости, о чем свидетельствуют значения кратности ОПи/ОПк (2,5 и выше).

Степень корреляции между результатами н-ИФА при использовании рекомбинантных и

природных БВМ бруцелл приведена в таблице 2.

Таблица 2 – Коэффициент корреляции между результатами н-ИФА с использованием различных белковых антигенов бруцелл

Изучаемые признаки	рБВМ19	рБВМ25	рБВМ31	БВМ <i>B. abortus</i>
	Коэффициенты корреляции (r)			
рБВМ19	1,0	0,45	0,18	0,24
рБВМ25	0,45	1,0	0,43	0,04
рБВМ31	0,18	0,43	1,0	-0,12
БВМ <i>B. abortus</i>	0,24	0,04	-0,12	1,0

Из таблицы 2 следует, что между результатами н-ИФА/рБВМ19 и н-ИФА/рБВМ25 наблюдается умеренная положительная связь (значение модуля коэффициента корреляции = 0,45). В 53 (68,8%) случаях результаты указанных вариантов иммуноанализа совпадали, в 18 (23,4%) случаях положительные результаты отмечались только по н-ИФА/Оmp25, а в 6 (7,8%) - только по н-ИФА/Оmp19. Умеренная корреляция установлена и между показаниями н-ИФА с использованием рБВМ25 и рБВМ31 ($r=0,43$). Корреляционная зависимость между н-

ИФА/рБВМ19 и остальными его двумя вариантами (н-ИФА/БВМ *B. abortus* и н-ИФА/рБВМ31) была слабой ($r=0,24$) и очень слабой ($r=0,18$). Положительные и отрицательные результаты н-ИФА/БВМ19 и н-ИФА/рБВМ31 совпадали в 24 (31,2%) и 13 (16,9%) случаях, соответственно. рБВМ19 не детектировал антитела в сыворотке крови 35 гол.(45,5%), показавших положительные реакции на рБВМ31. Тем не менее, следует отметить, что рБВМ19 выявил противобруцеллезные антитела в образцах крови 5 гол. (6,5%), отрицательных по н-ИФА/рБВМ31.

Обсуждение полученных результатов и заключение

В последнее десятилетие внимание исследователей, занимающихся совершенствованием серодиагностики бруцеллеза животных, привлекают БВМ возбудителя болезни, поскольку они более специфичны для бактерий рода *Brucella*, чем ЛПС - основной антигенный компонент

традиционных тестов. Кроме того, наработка БВМ, во-первых, менее опасна, чем приготовление ЛПС, предусматривающее работу с бактериальной культурой; во-вторых, использование для этой цели рекомбинантных белков позволяет стандартизировать антиген(ы), используемый(ые) в современных высокочувствительных тестах.

Небезынтересен и тот факт, что антителообразование на белковые антигены часто запаздывает по сравнению на ЛПС, и характерно для животных, у которых развивается активная бруцеллезная инфекция [21]. Таким образом, идентификация белковых компонентов бруцелл, которые вызывают антительный ответ у большинства инфицированных животных, важна не только в целях совершенствования диагностикумов, но и в разработке новых вакцинных препаратов. В настоящее время довольно интенсивно исследуется возможность использования белков бруцелл 3-ей группы (рБВМ25, рБВМ28 и рБВМ31) в серодиагностике бруцеллеза животных. Однако, до сих пор диагностическая ценность минорных белков, в том числе БВМ19, остается слабоизученной.

В ходе выполнения данной работы нами был разработан дизайн генно-инженерной конструкции и осуществлен синтез нуклеотидной последовательности гена БВМ19, проведено клонирование генов в состав плазмиды (рЕТ28b+) для экспрессии белка и создан штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/рБВМ19, а также отработаны оптимальные параметры индукции целевого продукта. Рекомбинантный белок имел мол.м. 20 кДа и находился в тельцах включения цитоплазмы штамма-продуцента, который давал максимальное количество белка при культивировании в течение суток.

Данные серологических исследований показали, что результаты исследований КРС с помощью традиционных реакций (РА и РБП) в максимальной степени подтверждались показаниями н-ИФА/БВМ *B. abortus* (94,8%), тогда как иммуноанализ на основе рБВМ31, рБВМ25 и рБВМ19 обнаруживал анти-*Brucella* антитела в меньшем количестве поголовья (76,6%, 54,5% и 39,0%, соответственно). Высокую чувствительность н-ИФА/БВМ *B. abortus* мы объясняем низкой специфичностью данного варианта, поскольку использованный в нем антигенный препарат, выделенный из клеток бруцелл химическим методом, также не лишен ЛПС, которые, как известно, являются причиной кросс-реакций между граммотрицательными бактериями.

Полученный нами рБВМ19 по антигенности уступал двум остальным рекомбинантным белкам. Показания н-ИФА/рБВМ19 умеренно коррелировали с результатами иммуноанализа на основе рБВМ31 и/или рБВМ25. Однако, необходимо подчеркнуть, что рБВМ19 позволил выявить анти-*Brucella* антитела в пробах сывороток крови от 6 до 8% поголовья, давших отрицательные результаты при применении в н-ИФА двух остальных рекомбинантных белков. Эти факты свидетельствуют о том, что использование единственного рекомбинантного белка заметно снижает чувствительность иммуноанализа. Следовательно, наиболее эффективные

диагностикумы могут быть указывают на актуальность разработаны на основе применения дальнейших исследований по комплекса (коктейля) комбинированному использованию рекомбинантных белков. рБВМ19 и рБВМ25 и рБВМ31 в н-ИФА. Достигнутые результаты

Список литературы

1. Corbel M.J., Elberg S.S., Cosivi O. Brucellosis in humans and animals // Geneva: World Health Organization. – 2006. – P.13-21.
2. OIE. Bovine Brucellosis Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organisation for Animal Health. (2009).
3. Yongqun H. Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2012. – Vol.2. doi:10.3389/fcimb.2012.00002.
4. Baldi P.C., Giambartolomei G.H., Goldbaum F.A., Abdon L.F., Velikovskiy C.A., Kittelberger R., Fossati C.A. Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with *B. abortus* S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 1996. – Vol.3. – P.472-476.
5. Velasco J., Romero C., López-Goñi I., Leiva J., Díaz R., Moriyón I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp // International journal of systematic bacteriology. – 1998. – Vol.48. – P.759-768.
6. Blasco J.M., Molina-Flores B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats // Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. – 2011. – Vol.27. – P.95-104.
7. Godfroid J., Nielsen K., Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife // Croatian Medical Journal. – 2010. – Vol.51. – P.296-305.
8. Nielsen K., Yu W. Serological diagnosis of brucellosis // Prilozi. – 2010. – Vol.31. – P.65-89.
9. Poester F.P., Nielsen K., Samartino L.E., Yu W.L. Diagnosis of brucellosis // Open Veterinary Science Journal. – 2010. – Vol.4. – P.46-60. doi: 10.2174/1874318801004010046.
10. Ghasemi A., Salari M.H., Zarnani A.H., Pourmand M.R., Ahmadi H., Mirshafiey A., Jeddi-Tehrani M. Immune reactivity of *Brucella melitensis* – vaccinated rabbit serum with recombinant Omp31 and DnaK proteins // Iranian Journal of Microbiology. – 2013. – Vol.5. – P.19-23.
11. Lim J.J., Kim D.H., Lee J.J., Kim D.G., Min W., Lee H.J., Rhee M.H., Chang H.H., Kim S. Evaluation of Recombinant 28 kDa Outer Membrane Protein of *Brucella abortus* for the Clinical Diagnosis of Bovine Brucellosis in Korea // Journal of Veterinary Medical Science. – 2012. – Vol.74. – P.687-691.
12. Simborio H.L.T., Lee J.J., Reyes A.W.B., Hop H.T., Arayan L.T., Min W., Lee H.J., Yoo H.S., Kim S. Evaluation of the combined use of the

recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis // *Microbial Pathogenesis*. – 2015. – Vol.83-84. – P.41-46.

13. Xi Bao, Yu Fen, Zi Mian, Yi Xue, Za Zhi. Expression and identification of eukaryotic expression vectors of *Brucella melitensis* lipoprotein OMP19 // *Chinese journal of cellular and molecular immunology*. – 2016. – Vol.32. – P.470-478.

14. Mohammadi E., Golchin M. Detection of *Brucella abortus* by immunofluorescence assay using anti outer membrane protein of 19 kDa antibody // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2018. – Vol.27. – P.643-648. doi: 10.17219/acem/85081.

15. Tadepalli G., Singh A.K., Balakrishna K., Murali H.S., Batra H.V. Immunogenicity and protective efficacy of *Brucella abortus* recombinant protein cocktail (rOmp19+rP39) against *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16M infection in murine model // *Mol Immunol.* – 2016. – Vol.71. – P.34-41. doi: 10.1016/j.molimm.2016.01.001.

16. Abkar M., Lotfi A.S., Amani J., Eskandari K., Ramandi M.F., Salimian J., Brujeni G.N., Alamian S., Kamali M., Koushki H. Survey of Omp19 immunogenicity against *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*: influence of nanoparticulation versus traditional immunization // *Vet. Res. Commun.* – 2015. – Vol.39. – P.217-228. doi: 10.1007/s11259-015-9645-2.

17. IFA-test na osnove rekombinantnogo belka vneshney membrany vozbuditelya brutselleza: otchet o NIR (promezhutochnyy) / KazATU im S.Seyfullina: ruk. Bulashev A.K.; ispoln.: Kiyan V.S., i dr. -2016. - 85s. -№ Gosregistratsii: 0115RK02413. - Inv. № 0216RK01032.

18. Patent №14230 Respublika Kazakhstan, G01N 33/535. Sposob opredeleniya antitel protiv vozbuditelya brutselleza // Shenzhanov K.T., Suranshiyev ZH.A., Bulashev A.K, Ospanova S.G.; zayavl. 22.07.2002; opubl. 15.04.2008., Byul.4. - 4 s.

19. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol.72. – P.248-254.

20. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol.227. – P.680-685.

21. Letesson J.J., Tibor A., van Eynde G., Wansard V., Weynants V., Denoel P. and Saman E. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzymelinked immunosorbent assay // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 1997. – Vol.4. – P.556-564.

References

22. Corbel M.J., Elberg S.S., Cosivi O. Brucellosis in humans and animals // Geneva: World Health Organization. – 2006. – P.13-21.

23. OIE. Bovine Brucellosis Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organisation for Animal Health. (2009).

24. Yongqun H. Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2012. – Vol.2. doi:10.3389/fcimb.2012.00002.
25. Baldi P.C., Giambartolomei G.H., Goldbaum F.A., Abdon L.F., Velikovskiy C.A., Kittelberger R., Fossati C.A. Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with *B. abortus* S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 1996. – Vol.3. – P.472-476.
26. Velasco J., Romero C., López-Goñi I., Leiva J., Dęz R., Moriyón I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp // *International journal of systematic bacteriology*. – 1998. – Vol.48. – P.759-768.
27. Blasco J.M., Molina-Flores B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. – 2011. – Vol.27. – P.95-104.
28. Godfroid J., Nielsen K., Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife // *Croatian Medical Journal*. – 2010. – Vol.51. – P.296-305.
29. Nielsen K., Yu W. Serological diagnosis of brucellosis // *Prilozi*. – 2010. – Vol.31. – P.65-89.
30. Poester F.P., Nielsen K., Samartino L.E., Yu W.L. Diagnosis of brucellosis // *Open Veterinary Science Journal*. – 2010. – Vol.4. – P.46-60. doi: 10.2174/1874318801004010046.
31. Ghasemi A., Salari M.H., Zarnani A.H., Pourmand M.R., Ahmadi H., Mirshafiey A., Jeddi-Tehrani M. Immune reactivity of *Brucella melitensis* – vaccinated rabbit serum with recombinant Omp31 and DnaK proteins // *Iranian Journal of Microbiology*. – 2013. – Vol.5. – P.19-23.
32. Lim J.J., Kim D.H., Lee J.J., Kim D.G., Min W., Lee H.J., Rhee M.H., Chang H.H., Kim S. Evaluation of Recombinant 28 kDa Outer Membrane Protein of *Brucella abortus* for the Clinical Diagnosis of Bovine Brucellosis in Korea // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2012. – Vol.74. – P.687-691.
33. Simborio H.L.T., Lee J.J., Reyes A.W.B., Hop H.T., Arayan L.T., Min W., Lee H.J., Yoo H.S., Kim S. Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis // *Microbial Pathogenesis*. – 2015. – Vol.83-84. – P.41-46.
34. Xi Bao, Yu Fen, Zi Mian, Yi Xue, Za Zhi. Expression and identification of eukaryotic expression vectors of *Brucella melitensis* lipoprotein OMP19 // *Chinese journal of cellular and molecular immunology*. – 2016. – Vol.32. – P.470-478.
35. Mohammadi E., Golchin M. Detection of *Brucella abortus* by immunofluorescence assay using anti outer membrane protein of 19 kDa antibody // *Adv. Clin. Exp. Med*. – 2018. – Vol.27. – P.643-648. doi: 10.17219/acem/85081.

36. Tadepalli G., Singh A.K., Balakrishna K., Murali H.S., Batra H.V. Immunogenicity and protective efficacy of *Brucella abortus* recombinant protein cocktail (rOmp19+rP39) against *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16M infection in murine model // *Mol Immunol.* – 2016. – Vol.71. – P.34-41. doi: 10.1016/j.molimm.2016.01.001.

37. Abkar M., Lotfi A.S., Amani J., Eskandari K., Ramandi M.F., Salimian J., Brujeni G.N., Alamian S., Kamali M., Koushki H. Survey of Omp19 immunogenicity against *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*: influence of nanoparticulation versus traditional immunization // *Vet. Res. Commun.* – 2015. – Vol.39. – P.217-228. doi: 10.1007/s11259-015-9645-2.

38. IFA-test na osnove rekombinantnogo belka vneshney membrany vozbuditelya brutselleza: otchet o NIR (promezhutochnyy) / KazATU im S.Seyfullina: ruk. Bulashev A.K.; ispoln.: Kiyani V.S., i dr. -2016. - 85s. -№ Gosregistratsii: 0115RK02413. - Inv. № 0216RK01032.

39. Patent №14230 Respublika Kazakhstan, G01N 33/535. Sposob opredeleniya antitel protiv vozbuditelya brutselleza // Shenzhanov K.T., Suranshiyev ZH.A., Bulashev A.K., Ospanova S.G.; zayavl. 22.07.2002; opubl. 15.04.2008., Byul.4. - 4 s.

40. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Analytical Biochemistry.* – 1976. – Vol.72. – P.248-254.

41. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol.227. – P.680-685.

42. Letesson J.J., Tibor A., van Eynde G., Wansard V., Weynants V., Denoel P. and Saman E. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzymelinked immunosorbent assay // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 1997. – Vol.4. – P.556-564.

BRUCELLA ABORTUS СМА19 РЕКОМБИНАНТТЫ ШТАММ ПРОДУЦЕНТТЕРІН АЛУ ЖӘНЕ ОНЫҢ АНТИГЕНДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

**А.Қ. Булашев, Қ.А. Тұрсунов,
Ж.Қ. Қаирова, А.С. Сыздықова**

Түйін

Мақалада *Brucella abortus*-тың молекулалық салмағы 19 кДа болатын рекомбинантты сыртқы мембрана ақуызын (pСМА19) өндіретін штамды жасап шығару және нысанды өнімнің антигенділігін зерттеу нәтижелері келтірілген. Рекомбинантты ақуыз *E. coli* BL21(DE3) цитоплазмасының қоспа денешіктерінде (гранулаларында) орналасқан болып шықты және оның ең көп мөлшері өндіргіш штамды бір тәулік бойы өсіру кезінде жинақталған. pСМА19, pСМА25 және pСМА31, сонымен қатар табиғи СМА ақуыздарына негізделген жанама иммунды фермент тәсілінде (ж-ИФТ) бруцеллез ауруына

дәстүрлі серологиялық реакциялар бойынша оң нәтиже көрсеткен ірі қара малдың қан сары сулары салыстырмалы түрде зерттелген. Жалғыз ғана рекомбинантты ақуыздың ж-ИФТ-де қолданылуы бұл тәсілдің сезімталдығын едәуір төмендететіндігі, осыған орай тиімді диагностикумдары ақуызды антигендердің кешенін қолдану арқылы жасауға болатындығы туралы қорытынды жасалған.

Кілтті сөздер: бруцеллез, сыртқы мембрана ақуызы, рекомбинантты ақуыздар, антигенділік, ж-ИФТ, балау.

OBTAINING OF THE STRAIN PRODUCING RECOMBINANT OMP19 *BRUCELLA ABORTUS* AND STUDYING OF ITS ANTIGENICITY

*A.K. Bulashev, K.A. Tursunov,
Zh.K. Kairova, A.S. Syzdykova*

Summary

A strain-producer of *Brucella abortus* recombinant outer membrane protein (OMP) with a molecular weight of 19 kD (rOMP19) was created and antigenicity of the target product was studied. The recombinant protein was in the cytoplasmic inclusion bodies of the strain-producer *E. coli* BL21 (DE3), which gave the maximum amount of the desired product by culturing for a day. Comparative studies of cattle blood sera, positively reacting to brucellosis according to classical serological tests, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) on the basis of rOMP19, rOMP25 and/or rOMP31, as well as *Brucella*-derived OMP were carried out. It is concluded that the use of a single recombinant protein in i-ELISA significantly reduces its sensitivity, therefore effective diagnostic kits may be developed on the basis of combined recombinant proteins.

Key words: brucellosis, outer membrane proteins, recombinant proteins, antigenicity, i-ELISA, diagnostics.