

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.266.61.083

Панфёрцев Е. А., Баранова Е. В., Мочалов В. В., Соловьёв П. В., Горбатов А. А., Бикетов С. Ф.

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *BREVIBACILLUS CHOSHINENSIS*, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО РЕКОМБИНАНТНЫЙ ХИМЕРНЫЙ БОРРЕЛИОЗНЫЙ АНТИГЕН

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 142279, пос. Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, Российская Федерация

Целью работы являлось создание рекомбинантного химерного белка с использованием системы вектор – хозяин *Brevibacillus choshinensis* (ТАКАРА, Япония) со встроенным слитным геном *dbpAG*, состоящим из частей генов *dbpA* и *dbpG*, которые кодируют главные антигенные детерминанты декорин-связывающих белков А (*DbpA*) двух видов возбудителей клещевых боррелиозов – *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*. Такая плазмида должна обеспечить синтез и секрецию в культуральную жидкость стабильного рекомбинантного антигена, состоящего из двух доменов – *DbpA B. afzelii* (*DbpAA*) и *B. garinii* (*DbpAAG*) – в нативной конформации и растворимой форме, что важно для его эффективного применения в серодиагностике боррелиозов. Выбор экспрессионной системы ТАКАРА на основе штамма *Brevibacillus choshinensis* и плазмиды *pNCMO2* обусловлен возможностью получения секретируемых целевых белков в растворимом виде в нативной конформации и с сохранёнными антигенными детерминантами.

Сконструирована плазмида *pNCMO2* со слитным геном *dbpAAG*, которой был трансформирован штамм *Brevibacillus choshinensis*. Полученный рекомбинантный клон *Brevibacillus choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* при культивировании в жидкой питательной среде продуцирует секретируемый белок, который имеет мол. массу около 30кД и обладает высокой иммунореактивностью с сыворотками от больных с подтверждённым диагнозом «боррелиоз».

Ключевые слова: боррелиоз; *Brevibacillus choshinensis*; декорин-связывающий белок А; ДНК.

Для цитирования: Панфёрцев Е.А., Баранова Е.В., Мочалов В.В., Соловьёв П.В.,

Горбатов А.А., Бикетов С.Ф. Конструирование рекомбинантного штамма *Brevibacillus choshinensis*, продуцирующего рекомбинантный химерный боррелиозный антиген. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 450-454. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-450-454>

Panfertsev E. A., Baranova E. V., Mochalov V. V., Soloviev P. V., Gorbatov A. A., Biketov S. F.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT STRAIN *BREVIBACILLUS CHOSHINENSIS* FOR CHIMERIC *BORRELIA DBPA* ANTIGEN PRODUCTION

142279, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The aim of this work was creation of recombinant chimeric protein using TAKARA expression system *Brevibacillus choshinensis* with fused gene *dbpAAG*, which include the parts of *dbpAA* and *dbpAG* genes coding the major antigenic determinants of decorin-binding proteins A (*DbpA*) from two species of borreliosis agents - *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. Such plasmid should be able to support the synthesis of recombinant chimeric polypeptide consisting immunogenic domains of *DbpA* *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* in the stable and soluble forms, that important for effective using in Lyme diseases serodiagnosis. We chose the TAKARA expression system based on the strain *Brevibacillus choshinensis* and plasmid *pNCMO2*. It give us possibilities to obtain the scale quantity of the secreted soluble target proteins with native conformation in particular with conserve antigenic determinants. As results, the plasmid *pNCMO2* with a fusion gene *dbpAAG* was constructed. Recombinante plasmide DNA *pNCMO2/dbpAAG* was used for *Brevibacillus choshinensis* transformation. We were able to show that during cultivation in a liquid medium recombinant cells of *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* produced secreted chimeric 30kD protein with high immunoreactivity to Lyme borreliosis patient's serum.

Key words: borreliosis; plasmid *pNCMO2*; *Brevibacillus choshinensis*; decorin-binding protein A; *Borrelia afzelii*; *Borrelia garinii*.

For citation: Panfertsev E. A., Baranova E. V., Mochalov V. V., Soloviev P. V., Gorbatov A. A., Biketov S. F. Construction of recombinant strain *Brevibacillus choshinensis* for chimeric borrelia *Dbpa* antigen production. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (7): 450-454. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-450-454>

For correspondence: Panfertsev E.A., Ph.D. Sci. Med., senior researcher of the department of immunobiochemistry of pathogen microorganisms ; e-mail: panfera62@mail.ru

Information about authors:

Panfertsev E.A., <http://orcid.org/0000-0001-6778-934X>

Mochalov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-9871-8154>

Gorbatov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-0799-893X>

Baranova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-6455-5756>

Soloviev P.V., <http://orcid.org/0000-0001-7355-8396>

Biketov S.F., <http://orcid.org/0000-0003-1179-6895>

Acknowledgment. The work is performed within research No. 050 of Rospotrebnadzor "Monitoring of circulation of causative agents of borreliosis in certain regions of the Russian Federation and perfecting of diagnostic of borreliosis".

Conflict of interest. The authors declare the absence of conflict of interests.

Received 27.03.2018
Accepted 13.04.2018

Введение. Согласно статистическим данным, заболеваемость клещевыми боррелиозами (КБ) за последние 5 лет устойчиво регистрируется практически во всех субъектах РФ за исключением территорий, где иксодовые клещи отсутствуют в силу климатических условий (в частности, Ненецкий и Чукотский автономные округа). Порядковое различие по заболеваемости КБ между некоторыми европейскими странами и РФ (например, в Германии более 200 случаев на 100 тыс. населения, в Калининградской области и Северо-Западном регионе РФ данный показатель составляет около 20) свидетельствует о гиподиагностике боррелиоза в нашей стране. Причинами этого могут быть как низкая обращаемость покусанных и профилактическое применение антибиотиков, так и недостаточная чувствительность применяемых диагностических тестов. Поскольку вызываемые боррелиями инфекции эффективно лечатся антибиотиками, а запоздалый диагноз может привести к серьёзным осложнениям, трудно переоценить роль своевременной и точной диагностики в контроле над этим заболеванием [1–3]. Совершенствование диагностики КБ, в частности разработка более чувствительных и специфичных тест-систем, представляется актуальной задачей здравоохранения РФ.

Постановка диагноза Лайм-боррелиоза основана на выявлении специфических антител, направленных против диагностически значимых антигенов патогенных видов рода *Borrelia*. Серологическую лабораторную диагностику проводят в два этапа, используя на первом иммуноферментный анализ (ИФА), на втором – иммуноблот с разрушенными клетками боррелий, выращенных на искусственных питательных средах [4–8]. Отсутствие в клетках некоторых диагностически важных антигенов, таких как «*in vivo* экспрессирующиеся» (VlsE, DbpA), «ранние» (OspC), «поздние» (P83), «иммуногенные липиды», обусловило появление другого варианта иммуноблота, названного «line blot», который представляет собой стрипы из мембраны, на который нанесены линии с индивидуальными природными и рекомбинантными антигенами [9]. Также множество (до 15) индивидуальных специфических антигенов боррелий применено в мультиплексных форматах, основанных на биочиповых и X-MAP-технологиях [10, 11].

Помимо разработки новых форматов тестов для серодиагностики проводятся исследования по молекулярному дизайну диагностически важных антигенов. Получены химерные антигены, состоящие из различных сочетаний антигенных детерминант белков боррелий OspA, OspB, VmpA, p83, FlaA, FlaB, DbpB, VlsE, OspC, DbpA [12–14]. В рамках разработки усовершенствованного серологического теста для диагностики боррелиоза в РФ мы поставили задачу получить новые, более эффективные антигены. Одним из перспективных для серодиагностики Лайм-боррелиоза антигенов боррелий, в силу поверхностной локализации и наличия высоко иммуногенных видоспецифичных эпитопов, признан декорин-связывающий белок A (DbpA) [15]. Поскольку в Европе и РФ [16] боррелиоз обычно вызывают *B. afzelii* и *B. garinii*, одним из подходов для повышения иммунологической чувствительности серологических тестов на основе DbpA является объединение иммунологически значимых эпитопов этих видов боррелий.

Ранее нами сконструирован гибридный ген *dbpAG*, при экспрессии которого в *E. coli* получен слитный рекомбинантный белок «DbpA A+G», несущий эпитопы DbpA *B. afzelii* и *B. garinii*. Этот антиген в формате ИФА обеспечил высокую иммунологическую чувствительность при анализе сыроворотка от больных боррелиозом из Центрального региона РФ [17]. Из-за особенностей экспрессирующей системы *E. coli* синтезированный рекомбинантный антиген находится в нерастворимом виде в «тельцах включения», что ведёт к

необходимости проведения цикла денатурация–ренатурация для получения его в растворимом состоянии. Как следствие антиген проявляет склонность к агрегации при хранении, мечении, при посадке на твёрдую фазу, что отрицательно сказывается на возможности его использования в различных иммунохимических тест-системах, в частности в иммунохроматографических тестах.

Поставлена задача создать генетическую конструкцию со слитным геном *dbpAG*, которая обеспечивала бы синтез растворимого и стабильного рекомбинантного полипептида, состоящего из иммуногенных доменов двух антигенов – DbpA *B. afzelii* и DbpA *B. garinii*. Для получения полипептида выбрана система вектор–хозяин на основе штамма *Brevibacillus choshinensis* и плазмиды *pNCMO2* производства компании TAKARA (Япония), с помощью которой возможно получение значительных количеств целевых белков (до 3 г/л), секретируемых в жидкую питательную среду в нативной конформации и растворимой форме [18]. Сконструирована плазида *pNCMO2-dbpAG*, в которой гибридный ген слит с последовательностью, кодирующей универсальный лидерный пептид и находится под контролем сильного P2 промотора, что обеспечивает синтез и секрецию целевого белка в жидкую питательную среду при культивировании рекомбинантного штамма *Brevibacillus choshinensis/pNCMO2-dbpAG*.

Материал и методы. В работе использовали эндонуклеазы рестрикции, лигазу T₄ и наборы реактивов (Thermo Fisher Scientific Inc., США), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), твин-20, борную кислоту, антивидовые антитела козы против иммуноглобулинов (IgG) человека (Sigma-Aldrich, США), трис(гидроксиметил)аминометан и 6% перекись водорода («РеаХим», Россия), фосфатно-солевой буфер («ПанЭко», Россия), обезжиренное молоко (BIO-RAD, США), Кумасси ярко-голубой R-250 («ДиаМ», Россия), пероксидазный субстрат 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорид (AppliChem, Германия).

Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щёлочи, органические растворители) имели аналитическую или химическую чистоту.

Для проведения иммуноблоттинга использована нитроцеллюзная мембрана с диаметром пор 0,45 мкм (Amersham™, Protran™, Германия).

Дизайн праймеров, ПЦР-амплификация. Использованы олигонуклеотидные праймеры для ПЦР-амплификации гена *dbpAG*, синтезированные в компании «Синтол» (Москва). Структуру праймеров разрабатывали с применением пакета программ DNASTAR LASERGENE.

Прямой праймер AZ BamHI: 5'- aa gga tcc tgt agt tta aca gga aaa gct ag -3'

Обратный праймер GOR EcoRI: 5'- aa gaa ttc tgt agt agc agc agt gtt ggc -3'

ПЦР-амплификацию гена *dbpAG* (996 п.о.) проводили в термоциклере MJ Mini (BIO-RAD, США), используя следующий режим амплификации: 95 °С – 2 мин, затем 30 циклов (95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 90 с), дополнительно 10 мин при 72 °С. В качестве матрицы использованы 100 нг плазмидной ДНК *pETdbpAG*.

Для ПЦР-амплификации ДНК использован набор High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Продукты ПЦР очищали из агарозного геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно протоколу производителя. Лигирование фрагмента ДНК 996 п.о. и плазмидного вектора *pNCMO2* («Такара», Япония), рестрицированных BamHI и EcoRI эндонуклеазами проводили, используя набор Rapid DNA Ligation Kit («Thermo Fisher Scientific Inc», США). Трансформацию клеток *E. coli* DH5α осуществляли с использованием набора TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher

Scientific Inc., США). Для скрининга клонов при клонировании использована обычная термостабильная ДНК-полимераза (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Электрофорез в агарозном геле проводили в Трис-Борат-ЭДТА -буфере (89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА, pH 10).

Конструирование экспрессирующей плазмиды. Конструирование экспрессирующей плазмиды проведено путём клонирования гена *dbpAAG*, полученного в результате ПЦР-амплификации в составе вектора pNCMO2. В качестве матрицы для ПЦР использована ранее созданная плазмидная ДНК *pETdbpAAG* [17].

В состав праймеров для ПЦР вводили сайты рестрикции *VamHI* (прямой праймер) и *EcoRI* (обратный праймер) для клонирования ПЦР-фрагмента в составе вектора pNCMO2 таким образом, чтобы создать единую ORF для гена *dbpAAG* и структуры, кодирующей сигнальный пептид. Полученный в результате ПЦР фрагмент ДНК размером 996 п.о. очищен, обработан ферментами *VamHI*+*EcoRI*, лигирован с предварительно рестрицированным плазмидным вектором pNCMO2/*VamHI*+*EcoRI*.

Лигазной смесью трансформированы компетентные клетки *E. coli DH5α*. Выросшие на плотной среде LA (содержащей ампициллин 50 мкг/мл) клоны анализировали при помощи ПЦР с использованием праймеров, комплементарных промоторной и терминаторной областям вектора pNCMO2. Из положительных клонов выделяли плазмидную ДНК, которую подвергали рестрикционному картированию с последующим секвенированием клонированного гена размером 996 п.о.

Анализ нуклеотидной последовательности. Анализ нуклеотидной последовательности (трансляцию последовательности гена в аминокислотную последовательность) гибридного гена *dbpAAG* проводили с использованием пакета программ DNASTAR LASERGENE.

Получение рекомбинантных клонов *Brevibacillus choshinensis* и экспрессия рекомбинантного белка DBPAG. Использована система вектор-хозяин *Brevibacillus choshinensis* (TAKARA, Япония) включающая: компетентные клетки *Brevibacillus choshinensis*, плазмиду pNCMO2, бульон Мартена (MT) для культивирования рекомбинантных клонов. Трансформация компетентных клеток *B. choshinensis* проводилась по инструкции производителя. Трансформанты высевались на плотную среду MT с 1% глюкозы и 25 мкг/мл неомидина. Выросшие колонии анализировали при помощи ПЦР, используя праймеры, комплементарные промоторной и терминаторной областям плазмидного вектора pNCMO2. Отобрано несколько колоний *B. choshinensis* с плазмидой pNCMO2/*dbpAAG*. Культивирование рекомбинантных клонов проводилось в 3 мл бульона MT, содержащего 1% глюкозы и 25 мкг/мл неомидина, в течение 24ч при 33°C. Выросшую культуру охлаждали до 4°C, разделяли биомассу и культуральную жидкость (КЖ) при помощи низкоскоростного центрифугирования (5000 g, 15мин). КЖ и клетки штамма *B. choshinensis*/pNCMO2/*dbpAAG* тестировали на наличие рекомбинантного белка методом вертикального электрофореза по Laemmly [19] в 13% полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) в редуцирующих условиях с последующей окраской геля Кумасси ярко-голубым R.

Сыворотки пациентов больных боррелиозом. Для иммунохимической характеристики белка DBPAG использованы сыворотки крови людей из рабочей коллекции Референс-Центра по мониторингу за боррелиозом на базе ФБУН Го-

```
TAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAATATATACACAATATCCCAAGAACAATTTGT
TTATACTAGAGGAGGAGAACAACAAGTCAATGAAAAAGAGGGTCTTAAACAGT
GTATTGCTTCTGCTACTGCTAGCTAGTGCCTCGACTTACTGTTGCTCCCATGGCT
TTCGCT
GGATCCTGTAGTTTAAACAGGAAAAGCTAGATTGGAATCATCAGTTAAAGACATTA
CAAATGAAATAGAGAAAAGCTATAAAAAGAAAGCTGAAGACGCTGGTGTAAGACAG
ACGCGTTCACAGATACACAACAAGGTGGCAAGGTGGCAGGCCCTAAAAAAGAGAG
CAGCAAAAATACGCGTCTGCTGACTTAACAACCAAAATTCCTAGAAGCAACAGAAG
AGGAAACTATTAATTTAAAGAAAATGGAGCGGGGAAGAAGACTTCTCAGGAA
TATATGATTTAATATACGGAGCCGAGAAGCAGTAGAAAAAATGGGGATGAAAG
GTATGGAACAAGAGGTCAAAGAGGCCACTAAAGAAAAATCCAAAACTACAGCTG
ATGGGATACTGCGATTGTAAGAAAGTAAAGAAAGCAAAAAGTGGAAAAAATTAAG
AAAAACAACATAAAAAAAGCTTGGATGTGGCTTAAACAGGAGAAACTA
AAATCAGATTAGAATCATCAGCTCAAGAAATTAAGATGAAATAAATAAAATTA
AAGCTAATGCTAAAAAAGAGGGCGTAAAAATTCGAGGCTTTCACAGATAAACAAA
CAGGCAGCAAGGTATCAGAAAAAGCCTGAATTCATCTTAAAGCAAAAAATAAAG
CTATTCAGGTGGCAGAAAAATTTGTAAGCAATAAAAGAGGAAGCAGAAAAAC
TTAAAAAGAGTGGAAAGTGTGGTGCATTCTCAGCAATGTATGACTTAATGCTTGA
TGTCTCAAAACCACTAGAAGAGATTGGAATACAAAAATGACAGGAACAGTTAC
AAAGGAAGCTGAAAAAAGCTCCTCAACTACAGCTGAGGGGATACTTGTATTGC
ACAAGCAATGGAAGAAAAATTTGAACAATGTTAATAAAAAACACAAGACGCCCT
CAAAAACCTCGAGGAAAAAGCCAACACTGCTGCTACTACAAAAGCTTTCGGGCCG
ACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGAATTC
```

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pNCMO2/*dbpAAG*.

сударственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Пул сывороток крови включал: сыворотки крови пациентов с установленным клиническим диагнозом болезни Лайма в стадии диссеминации ($n = 6$) и поздней стадии ($n = 6$). Все сыворотки охарактеризованы в коммерческих тест-системах (Anti-Borrelia-Euroline-WB и Anti-Borrelia plus VlsE ELISA (IgG), Euroimmun).

Вестерн-блот. Постановку иммуноблоттинга проводили следующим образом. Белки из ПААГ с помощью трансблоттера TE70XP (Hoefer, США) переносили на нитроцеллюлозную мембрану при силе тока 200 мА в течение 60 мин. Дальнейшие процедуры отмывки и инкубации мембраны с реагентами проводили при температуре 37°C на ротационном шейкере ST-3L (ELMI Ltd., Латвия) при 150 rpm. Мембрану инкубировали в растворе ФСБ, содержащем 5% обезжиренного молока в течение 40 мин. Далее проводили отмывку мембраны в течение 5 мин раствором ФСБ-Т (ФСБ, содержащий 0,1% твин-20) и инкубировали 1 ч в растворе (1:100) сыворотки крови пациентов. После этапа отмывки (трижды по 5 мин) мембрану инкубировали 40 мин в растворе антител козы к иммуноглобулинам (IgG) человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. После отмывки (трижды по 5 мин) мембрану помещали в раствор субстратной смеси (0,05% 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорида, 0,015% перекиси водорода, 0,01М ФБР (pH 7,4)). Результаты регистрировали через 5–10 мин, останавливая реакцию промыванием мембраны в дистиллированной воде.

Результаты и обсуждение. Подтверждение и анализ нуклеотидной последовательности гибридного гена *dbpAAG*. Для подтверждения нуклеотидной последовательности гибридного гена *dbpAAG* проведено секвенирование рекомбинантной плазмидной ДНК pNCMO2/*dbpAAG* с праймера, комплементарного промоторной области векторной плазмиды pNCMO2 (рис. 1).

Анализ нуклеотидной последовательности гибридного гена *dbpAAG*, проведённый с использованием пакета программ DNASTAR LASERGENE, показал, что в составе плазмидной ДНК pNCMO2 клонирован фрагмент ДНК размером 996 п.о., который находится в единой открытой рамке считывания со структурой, кодирующей лидерный пептид (выде-

CSLTGKARLESSVKDITNEIEKAIKEAEDAGVKTDAFTDTQTGGKVAGPKIRAAKIRV
ADLTTKFLATEEETINFKENGAGEEDFSGIYDLIYGAAEAVEKIGMKGMQEVEVKEAT
KENSKTADGILAVKVMKAKVKEIKEKQTKNQKLGCGLTGETKIRLESSAQEIKDE
INKIKANAKKEGVKFEAFDTKQTGSKVSEKPEFILKAKIKAIQVAEKFKAIKEEAEKLE
KKS GSSGAFSAMVDLMLDVSKPLEEIGIQKMTGTVTKEAEKTPPTTAE GILAIQAAME
EKLNNVNNKKQQDALKNLEEKANTAATTKLAALAE

Рис. 2. Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка DbrAA-G, полученная в результате трансляции нуклеотидной последовательности гена *dbpAAG*.

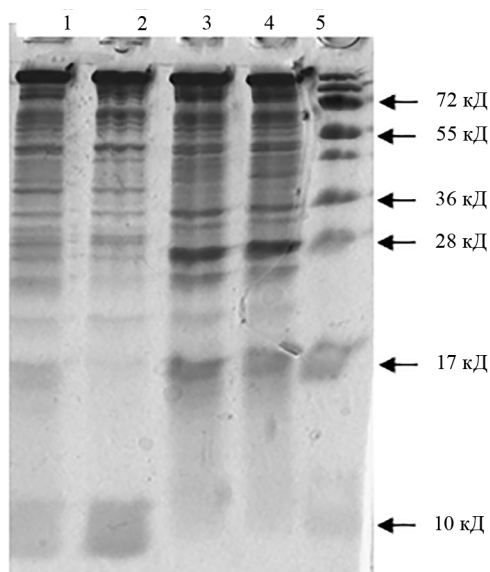


Рис. 3. Электрофоретический анализ культуральной жидкости и клеток полученных после культивирования рекомбинантных клонов *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG*.

Трек 1, 2 – клетки *B. choshinensis/dbpAAG*; 3, 4 – КЖ; 5 – маркёры молекулярных масс.

лен жирным курсивом на рис. 1), необходимый для секреции белка DbrAA-G в среду культивирования.

Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка DbrAAG. Путём трансляции из нуклеотидной последовательности гена *dbpAAG* получена аминокислотная последовательность белка DbrAA-G, показанная на рис. 2.

Экспрессия гибридного гена dbpAAG. Полученную после культивирования рекомбинантных клонов *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* КЖ и клетки тестировали на наличие рекомбинантного белка с помощью SDS-электрофореза в 13% ПААГ (рис. 3).

Как видно на рис. 3, в КЖ клонов *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* (треки 3 и 4) имеется белковая полоса с мол. массой около 30 кД, соответствующей расчётной молекулярной массе белка слитного антигена DbrA *B. afzelii* и *B. garinii*.

Иммунохимическая характеристика слитного рекомбинантного антигена DbrAA-G. КЖ после культивирования клона *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* в жидкой среде МТ анализировали методом иммуноблоттинга с пулом сывороток крови больных Лайм-боррелиозом. На рис. 4 представлен результат анализа, из которого видно, что секретируемый в КЖ штамма *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* слитный полипептид DBPA *B. afzelii* и *B. garinii* специфически связывает

антитела к DBPA *B. afzelii* и *B. garinii* возбудителя боррелиоза.

Ранее нами сконструирован гибридный ген *dbpAAG*, при экспрессии которого в *E. coli* получен слитный рекомбинантный белок DbrAAG, состоящий из иммуногенных доменов DbrA *B. afzelii* и *B. garinii* и проявляющий высокую иммунохимическую активность в ИФА при анализе сывороток от больных боррелиозом [17]. Рекомбинантный антиген после синтеза в клетках *E. coli* переходит в нерастворимую форму (inclusion bodies), что затрудняет последующее его использование в некоторых форматах иммунохимических тестов, в частности в иммунохроматографии. Предпринята попытка получения растворимого и стабильного рекомбинантного полипептида DbrAAG. Для этого выбрана экспрессионная система на основе штамма *Brevibacillus choshinensis* (TAKARA, Япония, пат. 20103774, 3696322, 3734593, 3433807), с помощью которой успешно получен ряд функционально активных белков из различных организмов в растворимой форме в значительных количествах. Система обеспечивает высокопродуктивную экспрессию в растворённом виде гетерологичных белков, включающих ферменты, антигены, антитела, цитокины с сохранением их функциональной активности в диапазоне 0,1 – 3,7 г/л [18].

Использован полученный ранее слитный ген *dbpAAG*, который переклонирован в плазмиду pNCMO2. Рекомбинантной плазмидой трансформирован штамм *B. choshinensis*. Рекомбинантный клон *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* при культивировании в жидкой питательной среде секретирует белок с мол. массой около 30 кД (соответствует расчётной), способный взаимодействовать с сыворотками крови больных боррелиозом. В связи с недостаточной продуктивностью полученного рекомбинантного клона (не более 5 мг/л), что может быть вызвано токсичностью гибридного белка и/или неэффективной трансляцией из-за вырожденности некоторых кодонов, планируется дальнейшая оптимизация кодонов гена *dbpAAG* и использование векторной системы, адаптированной для экспрессии генов токсичных белков в клетках *B. cho-*

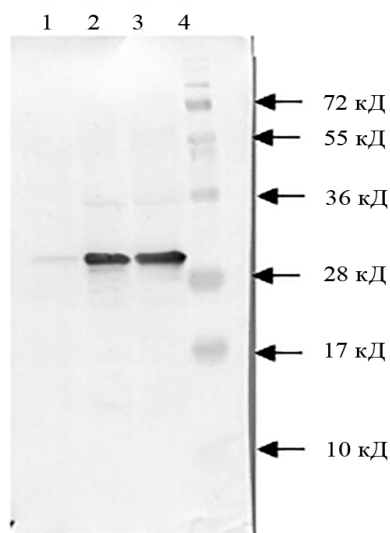


Рис. 4. Иммуноблот препаратов *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* с пулом сывороток больных Лайм-боррелиозом.

Трек 1 – лизат биомассы *B. choshinensis/dbpAAG*; 2, 3 – КЖ после ферментации клонов и центрифугирования; 4 – маркёры молекулярных масс.

shinensis. После решения проблемы достаточной продукции химерного рекомбинантного антигена DbrAA-G планируется его использование при конструировании серодиагностического теста для диагностики боррелиозов в формате иммунохроматографии.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР № 050 Роспотребнадзора «Мониторинг за циркуляцией возбудителей боррелиоза в отдельных регионах Российской Федерации и совершенствование средств диагностики боррелиозов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-11, 15, 17°19
см. REFERENCES)

12. 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 РФ № 2514230; 2014.
13. Leve Lionel., Mezhan-Leturnel Odil. Химерный белок, используемый для диагностики лайм-боррелиоза. Патент РФ № 2546246; 2015.
14. Leve Lionel., Mezhan-Leturnel Odil. Химерный белок боррелии, нуклеиновая кислота, кодирующая такой белок, экспрессирующая кассета, вектор, способ и набор для диагностики лайм-боррелиоза, вакцина для профилактики боррелиоза. Патент РФ № 2549698; 2015.
16. Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Ковалевский Ю.В. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов в России. *Паразитология*. 2002; 36 (3): 177-87.

REFERENCES

1. Hu L.T. In the clinic. Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* 2012; 157(3): 2-16.
2. Stanek G., Fingerle V., Hunfeld K.P., Jaulhac B., Kaiser R., et al. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 17(1): 69-79.
3. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012; 379(9814): 461-73.
4. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R.J., Bjoersdorff A., et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10(12): 1108-32.
5. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007; 49(1): 13-21.
6. Ang C.W., Notermans D.W., Hommes M., Simoons-Smit A.M., Herremans T. Large differences between test strategies for the detection of anti-*Borrelia* antibodies are revealed by comparing eight

ELISAs and five immunoblots. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30(8): 1027-32.

7. Hauser U., Lehnert G., Lobentanzer R., Wilske B. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(6): 1433-44.
8. Hunfeld K.P., Kraiczy P. When is the best time to order a Western blot and how should it be interpreted? *Curr. Probl. Dermatol.* 2009; 37: 167-77.
9. Goettner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., et al. Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(8): 3602-9.
10. Gerritzen A., Brandt S. Serodiagnosis of Lyme borreliosis with bead based immunoassays using multiplex technology. *Methods*. 2012; 56 (4): 477-83.
11. Porwancher R.B., Hagerty C.G., Fan J., Landsberg L., Johnson B.J., et al. Multiplex immunoassay for Lyme disease using VlsE1-IgG and pepC10-IgM antibodies: improving test performance through bioinformatics. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18(5): 851-9.
12. Beklemishev A.B., Rjabchenko A.V., Karavaev V.S. Recombinant chimeric polypeptides, carrying epitopes of various immunodominant proteins spirochet of the borrelia burgdorferi sensu lato complex, and method of diagnostics of tick-born borreliosis. Patent RF N 2514230; 2014. (in Russian)
13. Leve Lionel., Mezhan-Leturnel Odil. Chimeric Protein used for Lyme-Borreliosis Diagnostics. Patent RF N 2546246; 2014. (in Russian)
14. Leve Lionel., Mezhan-Leturnel Odil. Borrelia hybrid protein, nucleic acid coding this protein, expressing cartridge, vector, method and kit for diagnosing Lyme borreliosis, vaccine for borreliosis prevention. Patent RF N 2549698; 2015. (in Russian)
15. Heikkila T., Seppala I., Saxen H., Panelius J., Yrjanainen H., Lahdenne P. Species-specific serodiagnosis of Lyme arthritis and neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, and *B. garinii* by using decorin binding protein A. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(2): 453-60.
16. Korenberg Ye. I., Gorelova N.B., Kovalevskij U.V. The main features of natural foci tick-born borreliosis in Russia. *Parazitologiya*. 2002; 36 (3): 177-87. (in Russian)
17. Baranova E., Solov Ev P., Panfertsev E., Baranova A., Feduykina G., Kolombet L., Morshed M. G., Biketov S. Rational design of antigens to improve the serodiagnosis of tick-borne borreliosis in central regions of Russia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 807: 9-21.
18. Makoto M., Hiroshi H., Miyauchi A. Brevibacillus Expression System: Host-Vector System for Efficient Production of Secretory Proteins. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010; 11(3), 251-8.
19. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.

Поступила 27.03.18

Принята к печати 13.04.18