

УДК 615.371

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ-КАНДИДАТОВ ВАКЦИН ПРОТИВ ЦЕНУРОЗА

Е.А. Колосова, П.В. Колосов, Ю.А. Меркульева, Д.Н. Щербаков

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия

Церебральный ценуроз (*Coenurosis cerebrealis*) – зоонозное паразитарное неврологическое заболевание, поражающее центральную нервную систему коз и овец. Ценуроз вызывается инфицированием некоторыми видами личинок ленточных червей (метацестодами) *Taenia*, такими как *T. Multiceps*, *T. Brauni*, *T. Serialis* и *T. Glomeratus* [1]. Козы и овцы выступают в качестве промежуточных хозяев, в то время как первичным хозяином являются домашние и дикие собаки, лисы и шакалы [2]. Ценуроз не оказывает значительное клиническое влияние на первичных хозяев, но приводит к увеличению показателя смертности среди молодых ягнят и козлят, что приводит к ежегодному ущербу более 4 млрд. руб. [3].

В настоящее время мероприятия по борьбе с ценурозом у мелкого домашнего скота основаны на использовании вакцин. Гаучи с соавт., разработана рекомбинантная вакцина, содержащая консервативные поверхностные белки личинок (онкосфер) *T. Multiceps* Tm16 и Tm18. Рекомбинантные антигены Tm16 и Tm18 синтезировали при помощи клеток *E.coli* BL21 (DE3) в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST), в качестве белка шаперона [4].

Целью нашей работы является конструирование на основе вектора pET21 рекомбинантных плазмид для экспрессии рекомбинантного антигена Tm16 слитого с разными белками шаперонами и оптимизация условий культивирования штаммов продуцентов.

В структуру вектора включен: промотор бактериофага T7, обеспечивающий эффективную транскрипцию мРНК, оператор LacO, регулирующий возможность экспрессии целевого гена, сайт связывания рибосомы (RBS), ген *AmpR*, кодирующий бета-лактамазу, расщепляющий антибиотик ампициллин, используемый как фактор селекции, и терминатор бактериофага T7, обеспечивающий терминацию транскрипции белка.

В качестве белков шаперонов использовали глутатион-S-трансферазу (GST) и прокариотическую дисульфид изомеразу (DsbC). Нуклеотидные последовательности, кодирующие GST и DsbC, находятся на N-конце слитого белка.

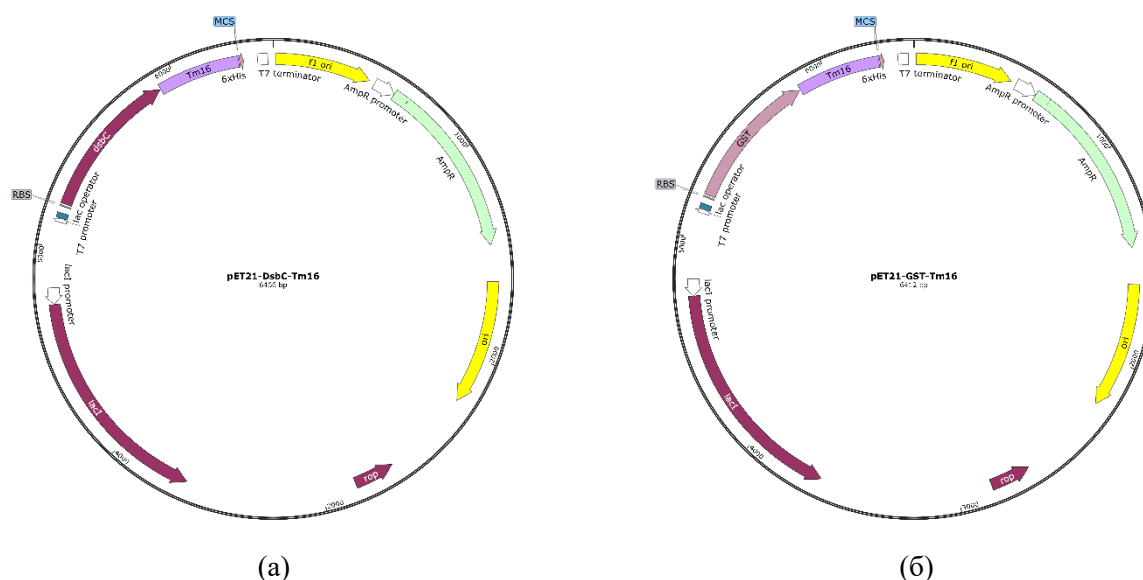


Рис. 1 – Генетическая карта векторов, кодирующие слитые белки: (а) – DsbC-Tm16; (б) – GST-Tm16

Ген Tm16 синтезировали в составе плазмиды pHG_Tm16, обрабатывали ферментами *Ple19I* и *PspXI*, очищали в 1,5 % агарозном геле и экстрагировали набором для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (Евроген, Россия).

Гены GST и DsbC синтезировали в составе плазмид pGEX-2T, обрабатывали FauNDI и Ple19I, очищали в 1,0 % агарозном геле и экстрагировали набором для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (Евроген, Россия).

Полученные последовательности клонировали в состав экспрессирующего вектора pET21 по сайтам рестрикции FauNDI и PspXI, таким образом, чтобы слитый белок находился в единой рамке считывания. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E.coli* Stb13 с добавлением в питательную среду антибиотика ампициллина. У полученных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и секвенировали для проверки отсутствия делеций и правильности сборки конструкций.

Полученными векторами pET21-GST-Tm16 и pET21-DsbC-Tm16 трансформировали штамм *E. coli* BL21 (DE3). Индивидуальные колонии культивировали в шейкер-инкубаторе в среде YTx2 при 37 °C при 180 об/мин до оптической плотности 0,4 при 600 нм. Далее индукцию проводили параллельно при 16 и 37 °C и с различным (0,1 mM и 1 mM) содержанием индуктора ИПТГ при 180 об/мин в течение 24 ч. Далее произвели отбор культуральной жидкости объемом 1 мл, отделили биомассу центрифугированием при 4500g при 4 °C в течении 15 мин., удалили супернатант и ресуспендировали в 100 мкл раствора, содержащего 8M мочевины, 500 mM хлорида натрия и 50 mM дигидрофосфата натрия, с pH 7,4. Идентификацию слитого белка в биомассе осуществляли посредством разделения белков в ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием Кумасси (рис. 2).

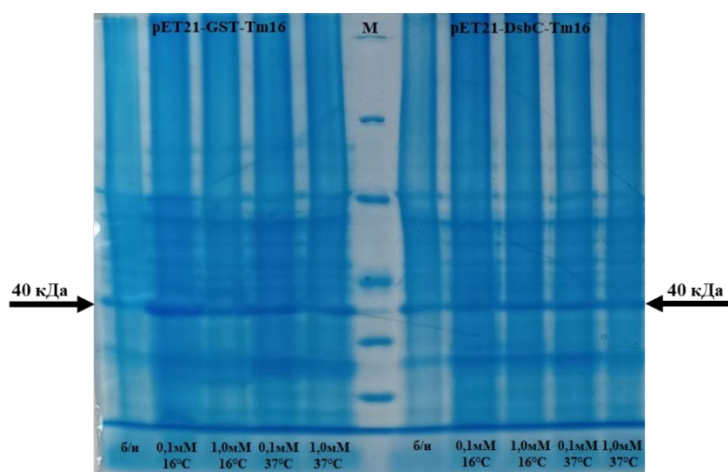


Рис. 2 – Электрофореграмма разделения белковых препаратов в ПААГ: М – маркер молекулярных масс

На рис. 2 можно наблюдать полосы, соответствующие слитым белкам DsbC-Tm16 и GST-Tm16 с ожидаемой молекулярной массой 39,5 кДа и 39,4 кДа соответственно. Наибольший синтез белка был достигнута при культивировании штамма *E.coli*, содержащего вектор pET21-GST-Tm16, при 16 °C с добавлением 0,1 mM ИПТГ в течении 24 ч.

Таким образом, в ходе работы на основе вектора pET21 были сконструированы вектора, содержащие 2 варианта шаперонов DsbC и GST, обеспечивающие синтез слитых белков, включающий рекомбинантный поверхностный белок онкосфер *T. multiceps* Tm16 в культуре *E.coli* BL21 (DE3). Показан синтез целевых слитых антигенов DsbC-Tm16 и GST-Tm16. Подобраны условия для максимальной продукции антигена Tm16.

Литература

1. Ahn S. et al. Cerebral Coenurosis of a Long-Tailed Goral, *Naemorhedus caudatus*, in Korea //The Korean Journal of Parasitology. – 2021. – Т. 59. – №. 1. – С. 55.
2. Scala, A.; Varcasia, A. Updates on morphobiology, epidemiology and molecular characterization of coenurosis in sheep. *Parassitologia* 2006, 48, 61–63.
3. Воробьева Т.Ю., Акбаев Р.М., Василевич Ф.И. Ценуроз церебральный: распространение, диагностика и меры борьбы // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2015. № 16.
4. Gauci C. et al. Vaccination with recombinant oncosphere antigens reduces the susceptibility of sheep to infection with *Taenia multiceps* //International journal for parasitology. – 2008. – Т. 38. – №. 8–9. – С. 1041–1050.