



УДК 579.881.11:577.21

## ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ФРАГМЕНТОВ ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА SPA ВОЗБУДИТЕЛЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО СЫПНОГО ТИФА

© 2000 г. В. В. Емельянов

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН,  
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Поступила в редакцию 30.09.99 г. Принята к печати 30.03.2000 г.

Фрагменты гена видоспецифического протективного антигена SPA *Rickettsia prowazekii*, клонированные ранее в  $\lambda$ gt11, были переклонированы с соблюдением рамки считывания в экспрессионный вектор pQE30. Показано, что кодируемые этими фрагментами полипептиды синтезируются в *Escherichia coli* в количестве до 100 мкг на 1 мл клеточной культуры и накапливаются в клетках как тельца включения. Частично очищенные антигены использованы в иммуноферментных анализах с сыворотками людей, переболевших сыпным тифом, клещевыми риккетсиозами и инфекционными болезнями другой этиологии. Установлено, что один из двух рекомбинантных белков реагирует в иммуноблоттинге и ELISA с гомологичными сыворотками и не реагирует с гетерологичными. Иммунореактивность в ELISA рекомбинантных антигенов и денатурированного прогреванием SPA оказалась сходной, но существенно более низкой, чем иммунореактивность нативного SPA. Представленные результаты и данные других авторов показывают, что проблема серодиагностики эпидемического сыпного тифа с использованием рекомбинантных антигенов остается открытой.

*Ключевые слова:* эпидемический сыпной тиф; *Rickettsia prowazekii*; рекомбинантные антигены; иммуноферментный анализ; серодиагностика.

### ВВЕДЕНИЕ

Эпидемический сыпной тиф (ЭСТ) вызывается бактериальным агентом *Rickettsia prowazekii*, который наряду с возбудителем эндемического сыпного тифа *R. typhi* и непатогенным видом *R. canada* входит в группу риккетсий сыпного тифа (TG). Род *Rickettsia* кроме TG включает группу возбудителей клещевых риккетсиозов, или пятнистых лихорадок (SFG), и несколько видов бактерий, не составляющих отдельной группы. Наряду с непатогенными для человека видами к группе SFG относятся возбудители пятнистой лихорадки Скалистых гор – *R. rickettsii*, средиземноморской лихорадки – *R. conorii*, клещевого риккетсиоза Северной Азии – *R. sibirica*, Астраханской пятнистой лихорадки и несколько возбудителей сходных риккетсиозов [1]. Род *Rickettsia* входит в семейство Rickettsiaceae, представленное исключительно облигатными внутриклеточными паразитами эукариотов [2]. В то время как переносчики *R. typhi* и риккетсий SFG являются

одновременно и хозяевами этих бактерий, *R. prowazekii* переносится от человека к человеку платяной вошью, которая служит вектором, но не природным резервуаром возбудителя.

ЭСТ существует как в виде острого инфекционного заболевания, так и в виде его рецидивной формы (болезнь Брилля–Цинссера). Известно, что носителями *R. prowazekii* становятся люди, ранее переболевшие ЭСТ, у которых заболевание может возникнуть при различных неблагоприятных условиях. Социальные потрясения (прежде всего войны) всегда сопровождалась вспышками ЭСТ. В наше время ЭСТ продолжает оставаться опасным заболеванием, особенно в неблагополучных странах [3, 4]. В связи с этим его своевременная диагностика имеет важное значение.

Наиболее надежный способ обнаружения *R. prowazekii*, основанный на полимеразной цепной реакции, едва ли может быть использован в широких масштабах [4]. Для серодиагностики необходимы культивирование риккетсий в куриных эмбрионах, их выделение и очистка, что сопряжено с большими затратами и риском заражения. Идеальным подходом к решению проблемы диагностики ЭСТ могло бы быть клонирование и экспрессия в безопасных микроорганизмах генов *R. prowazekii*, кодирующих видоспецифические антигены или эпитопы, с последующей очисткой

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; ЭСТ – эпидемический сыпной тиф; СВ – карбонатный буфер, pH 9.6; ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ; IPTG – изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид; LB – среда Лурия–Бертани; PBS – стандартный фосфатно-солевой буфер, pH 7.4.

Тел.: (095) 193-55-52; e-mail: sileks@online.ru.

рекомбинантных белков простыми методами. Именно этот подход был использован в предлагаемой работе и в работах зарубежных исследователей.

Исследованиями Дэша и соавт. показано, что наилучшим антигеном для иммунодиагностики (равно как и иммунопрофилактики) ЭСТ является поверхностный водорастворимый антиген SPA [5]. Этот синтезируемый в наибольших количествах белок *R. prowazekii* с *M* 134 кДа образует на поверхности клеток паракристаллический S-слой (slime layer), который легко отторгается при инкубации риккетсий в гипотонических буферах. Очищенный SPA обладает протективным эффектом и нетоксичен [5]. Известно, что белок содержит моно-, ди- и триметилированные остатки Lys [6, 7]. Из естественного патогенного штамма Брейнль *R. prowazekii* клонирован и секвенирован ген предшественника SPA (pSPA). Показано, что С-концевая часть белка, кодируемого этим геном, отсутствует в зрелом SPA (mSPA) [8, 9]. С использованием моноклональных антител к антигену *R. prowazekii*, *R. typhi* и *R. canada* проведен его детальный эпитопный анализ [9]. Дэш и соавт. синтезировали перекрывающиеся декапептиды, охватывающие весь белок, и исследовали их иммунореактивность с различными антителами. Авторы предположили, что низкая реактивность полученных пептидов может быть связана с отсутствием метильных групп на остатках лизина [10].

Недавно одновременно появились короткие публикации Дэша и соавт. [11] и Емельянова [12] о клонировании фрагментов гена SPA *R. typhi* и *R. prowazekii* в экспрессионных векторах. Было показано, что синтезируемые в *E. coli* полипептиды накапливаются в клетках в больших количествах в виде телец включения. В предлагаемой работе сообщается о результатах использования продуктов экспрессии клонированных фрагментов гена SPA в качестве антигенов для иммуноблоттинга и ELISA.

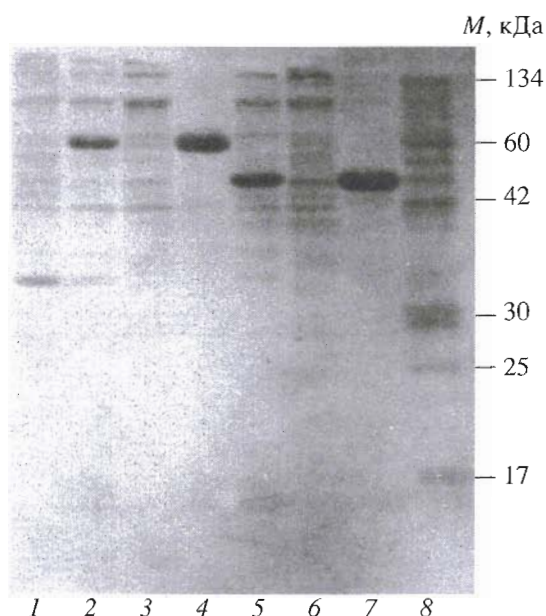
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фрагменты геномной ДНК штамма Брейнль *R. prowazekii* были ранее клонированы в экспрессионном фаговом векторе  $\lambda$ gt11 с использованием *EcoRI/NotI*-адаптора [13]. Скринингом клонотики с сывороткой человека, переболевшего ЭСТ (конвалесцентная сыворотка), было отобрано 5 клонов, экспрессирующих белки с антигенной специфичностью поверхностного антигена SPA. С помощью вестерн-блоттинга было показано, что в клетках клонов  $\lambda$ gt11P1-1 и  $\lambda$ gt11P2-1 (далее P1-1 и P2-1) синтезируются составные с  $\beta$ -галактозидазой белки (fusion-proteins) с *M* 180 (F1) и 160 кДа (F2), соответственно, которые не обладают кросс-реактивной активностью с антителами сыворотки конвалесцента, аффинно очищен-

ными на антигенах соответствующих клонов [13]. В предварительных исследованиях было установлено, что ДНК-вставки клонов P1-1 и P2-1 кодируют С-концевой сегмент mSPA и преимущественно С-концевой сегмент pSPA, соответственно, и что они частично перекрываются. Сообщалось также об использовании составных с  $\beta$ -галактозидазой белков в иммуноблоттинге с конвалесцентными сыворотками [14].

Основной задачей данного исследования была оценка перспективности использования рекомбинантных антигенов для иммунодиагностики ЭСТ. На первом этапе проводилось детальное физическое картирование и характеристика клонированных в векторе  $\lambda$ gt11 ДНК-вставок. Результаты сопоставлялись с физической картой и нуклеотидной последовательностью гена pSPA [8]. В работе использовались вышеупомянутые клоны P1-1 и P2-1, экспрессирующие составные белки, и выбранный наугад иммунопозитивный клон P1-3, не экспрессирующий отдельного полипептида. ДНК-фрагменты были ориентированы относительно промотора *lacZ*, переклонированы в pBlueScript II K/S+ и детально картированы с использованием ряда рестрикционных эндонуклеаз. Показано, что *EcoRI*-вставки клонов P1-1, P2-1 и P1-3 с размерами 1.6, 2.2 и 2.7 т.п.о., соответственно, перекрываются в 3'-концевой области гена. Сайты *EcoRI* отсутствуют в клонированных фрагментах и в опубликованной нуклеотидной последовательности гена pSPA [8]. Результаты Саузерн-гибридизации изолированных фрагментов с геномной ДНК *R. prowazekii*, обработанной *EcoRV*, *EcoRI*, *Clal* и *HindIII* (данные не приведены), оказались в полном соответствии с рестрикционной картой [8]. Секвенирование области перекрывания обнаружило полное совпадение соответствующих нуклеотидных последовательностей трех клонов между собой и с опубликованной нуклеотидной последовательностью гена pSPA и позволило точно локализовать 3'-концы вставок клонов P1-1 и P1-3 и 5'-конец вставки клона P2-1. Известно, что ген кодирует полипептид из 1644 а. о., содержащий на N-конце типичную лидерную последовательность [8, 15]. Показано, что ДНК-вставки P1-1, P2-1 и P1-3 кодируют соответственно следующие фрагменты аминокислотной последовательности pSPA:  $\approx$ 770–1321, 1175–1644 и  $\approx$ 450–1350.

Для повышения уровня экспрессии рекомбинантных SPA вставки клонов P1-1 и P2-1 с соблюдением рамки считывания были переклонированы из pBlueScript в экспрессионный вектор pQE30 (см. "Эксперимент. часть"). Соответствующие рекомбинантные антигены P1 и P2 накапливались в клетках иммунопозитивных клонов в виде телец включения, что позволило достаточно просто получить их в очищенном виде (рис. 1, дорожки 4, 7). Уровень экспрессии рекомбинантных SPA в при-



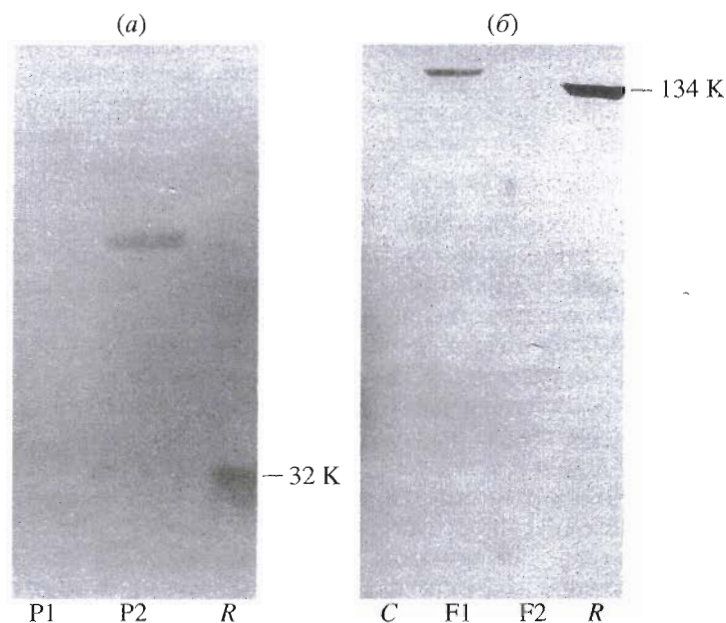
**Рис. 1.** Электрофореграмма окрашенного кумасси 10% ПААГ после SDS-электрофореза. Клетки *E. coli*, содержащие: 1 – рQE30, 2 – рAES1, 5 – рAES2; 8 – клетки *R. prowazekii*. Надосадочные жидкости (3, 6) и отмытые 2% Тритоном X-100 осадки (4, 7) после центрифугирования лизатов клеток *E. coli*, экспрессирующих антигены P1 (3, 4) и P2 (6, 7). Справа даны мол. массы белков внешней мембраны *R. prowazekii* [16].

сутствии IPTG составил 50–100 мкг на 1 мл суспензии *E. coli*. Молекулярные массы антигенов P1 (61 кДа) и P2 (50 кДа) хорошо согласуются с таковыми для составных белков F1 и F2, учитывая мо-

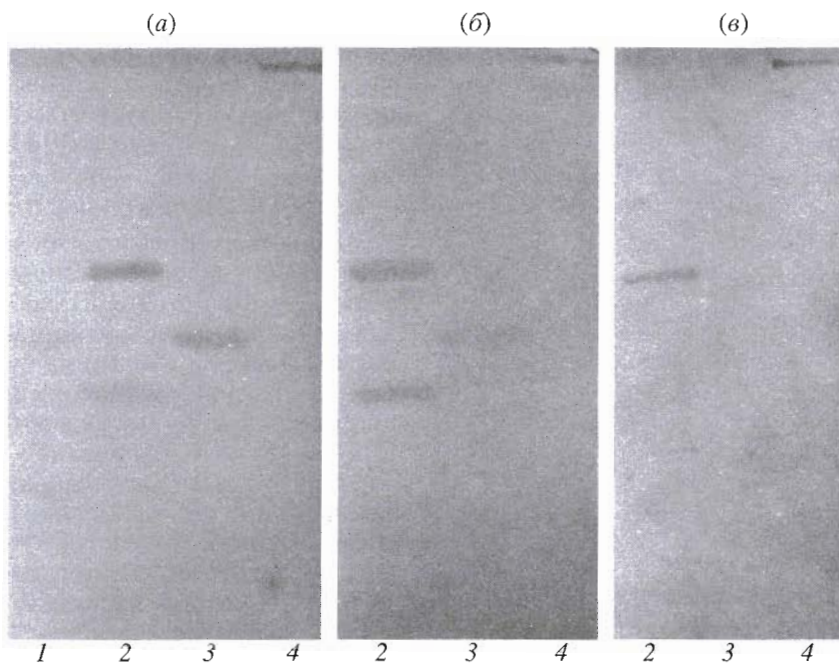
лекулярную массу  $\beta$ -галактозидазы, равную  $\approx 117$  кДа. Антигены P1 и P2 использовались в иммуноблоттинге с теми же сыворотками, что и составные белки. Следует отметить, что результаты вестерн-блот-анализа P1 и P2 и соответствующих им составных белков F1 и F2 полностью согласуются между собой.

Выше отмечалось, что зрелый белок mSPA не содержит C-концевого полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания гена *spa* [8, 9]. На основании изучения аминокислотных последовательностей гомологичного рSPA *R. rickettsii* было высказано предположение, что он идентичен интегральному белку внешней мембраны с  $M$  32 кДа [15]. Выравнивание соответствующих аминокислотных последовательностей рSPA *R. rickettsii* и *R. prowazekii* показывает, что этот гипотетический белок состоит из 291 а.о. Если это действительно так, антиген клона P2-1 содержит 179 а.о. C-концевой части mSPA и полную аминокислотную последовательность белка 32 кДа.

Антигены, экспрессируемые клонами P1-1 и P2-1, исследовались в иммуноблоттинге с моноспецифическими кроличьими антителами к SPA и к белку внешней мембраны 32 кДа. В полном соответствии с предположениями было показано, что антиген клона P2-1, но не клон P1-1 реагирует с антителами к белку 32 кДа, в то время как с антителами к SPA реагирует только антиген клона P1-1 (рис. 2). Известно, что белок 32 кДа не реагирует в вестерн-блоттинге с сыворотками людей, переболевших ЭСТ [3]. Следовательно, этот белок реагирует с антителами конвалесцентов



**Рис. 2.** Иммунореактивность составных белков F1 и F2 и соответствующих рекомбинантных белков P1 и P2 с моноспецифическими антителами к белку наружной мембраны 32 кДа (а) и SPA (б). Антигены  $\lambda$ gt11-лизогена (С) и *R. prowazekii* (R). Позиции SPA (134 К) и белка 32 кДа (32 К) отмечены.



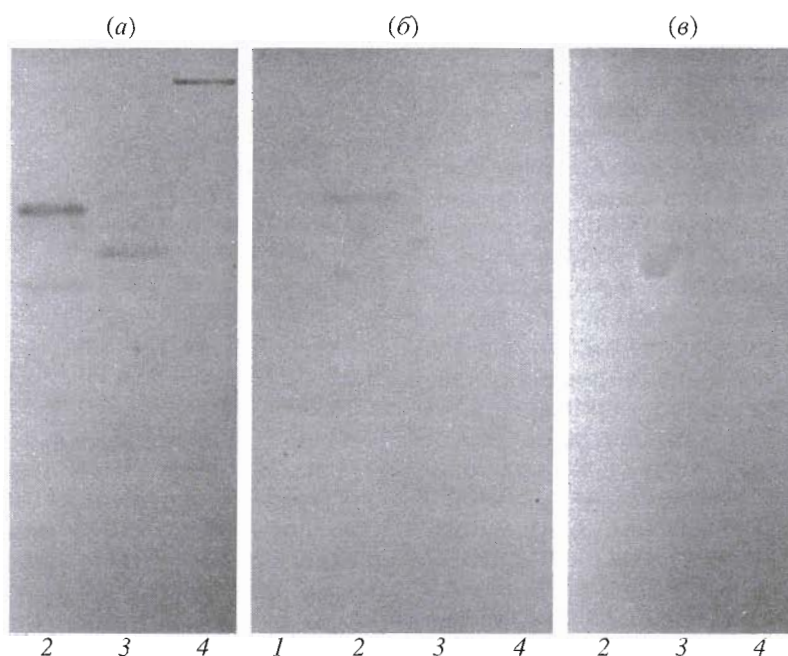
**Рис. 3.** Иммунореактивность рекомбинантных антигенов с сыворотками больных эпидемическим сыпным тифом, отобранными на 9-й (а) и 20-й (б) день и через 1 год (в) после начала заболевания. Белки нерекombинантного клона (1), рекомбинантных клонов, экспрессирующих P1 (2) и P2 (3), и нативный SPA (4), выделенный из клеток *R. prowazekii* [16], разделялись SDS-электрофорезом в 10% ПААГ.

только в том случае, когда он входит в состав предшественника SPA. Можно предположить, что pSPA синтезируется и экспортируется клетками риккетсий как полипротеин, содержащий N-концевой лидерный пептид, а отщепление C-концевого полипептида происходит вне клетки под действием бактериальной или хозяйской протеиназы. Это объяснение делает понятным наличие в сыворотках конвалесцентов антител к предшественнику SPA. Интересно, что у авирулентного мутанта *R. rickettsii* нарушен C-концевой процессинг, и клетки мутанта экспортируют pSPA [17].

Очевидно, что антитела к pSPA должны появляться на начальной стадии инфекционного процесса. Рекомбинантные антигены P1 и P2, фактически представляющие mSPA и pSPA, соответственно (см. выше), исследовались в иммуноблоттинге с сыворотками конвалесцентов, полученными в разные сроки после начала заболевания ЭСТ (рис. 3). Показано, что P2 несколько лучше реагирует с ранними сыворотками (9-й день), чем с сыворотками умеренных сроков (около 1 месяца), и не реагирует с поздними (1 или 2 года) сыворотками. Напротив, P1 реагирует со всеми указанными сыворотками. Эти данные позволяют заключить, что антитела против pSPA вырабатываются в период активного размножения *R. prowazekii*, а когда инфекция становится латентной, в организме продолжают вырабатываться антитела главным

образом к mSPA. Таким образом, возникает заманчивая перспектива определения с использованием антигенов P1 и P2 сроков сыпнотифозной инфекции.

Рекомбинантные антигены P1 и P2 использовались в иммуноблоттинге с гомологичными и гетерологичными конвалесцентными сыворотками (рис. 4). Поскольку практической задачей была не разработка препаратов для иммунодиагностики, а лишь оценка перспективности генно-инженерного подхода, в исследовании использовалось ограниченное число сывороток конвалесцентов. Оба антигена, а также нативный SPA реагируют не только с сывороткой человека, переболевшего ЭСТ, но и с сывороткой больного эндемическим сыпным тифом. Иммунореактивный полипептид с большей, чем у P1, электрофоретической подвижностью в некоторых препаратах P1, очевидно, представляет собой продукт протеолитической деградации. С сывороткой человека, переболевшего Астраханским риккетсиозом, реагируют SPA и P2, но не P1. Эти результаты легко объяснить. Известно, что центральная и C-концевая области SPA кросс-реактивны с моноклональными антителами к белкам риккетсий TG [9]. О высокой гомологии отщепляемых C-концевых пептидов pSPA *R. prowazekii* (TG) и *R. rickettsii* (вид SFG как и возбудитель Астраханской пятнистой лихорадки) говорилось выше. Показано, что с P2 реагировало большинство сывороток людей, пе-



**Рис. 4.** Вестерн-блоттинг рекомбинантных антигенов и нативного SPA с гомологичной (а) и гетерологичными (б, в) антисыворотками. Частично очищенные антигены нерекombинантного клона (1) и клонов, экспрессирующих P1 (2) и P2 (3), SPA риккетсий (4). Нитроцеллюлозные мембраны обрабатывали сыворотками людей (разведение 1 : 1000), переболевших ЭСТ (а), эндемическим сыпным тифом (б) и Астраханским риккетсиозом (в).

реболевших риккетсиозом Северной Азии или Астраханской пятнистой лихорадкой. Следует заметить, что сыворотки больных ЭСТ и болезнью Брилля–Цинсера одних и тех же сроков одинаково реагировали с рекомбинантными антигенами. Антиген P1 не реагировал с нормальными сыворотками и с сыворотками людей, переболевших клещевыми риккетсиозами и другими инфекционными заболеваниями (лихорадка КУ, туляремия). Из этих данных следует, что использование в иммуноблоттинге антигена P1 позволяет различать сыворотки людей, зараженных риккетсиями TG и SFG.

Поскольку вестерн-блоттинг едва ли может широко применяться в диагностической практике, рекомбинантные белки применялись в качестве антигенов для ELISA. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами иммуноблоттинга. С антигенами P1 и P2, использованными в концентрации 2 мкг/мл, титры гомологичных конвалесцентных сывороток составляли 1 : 2000–1 : 4000. Титры сывороток людей, переболевших клещевыми риккетсиозами, были 1 : 100–1 : 200 с P1 и 1 : 800 с P2. Другими словами, в разведении 1 : 200 с P1 реагировали только гомологичные сыворотки. Для сравнения, при использовании нативного SPA, изолированного при инкубации очищенных клеток *R. prowazekii* в гипотоническом Трис-буфере [18], титры сывороток сыпнотифозных больных достигали 1 : 500000, а титры гетерологичных сывороток составляли 1 : 1000.

При этом SPA использовался в концентрации 0.1 мкг/мл. Столь значительные различия в иммунореактивности рекомбинантных антигенов и нативного полноразмерного белка кажутся поразительными, в особенности учитывая то, что P1 составляет почти половину молекулы mSPA.

Как уже упоминалось выше, SPA риккетсий метилирован. Дэш и др. сообщили о значительном увеличении реактивности в иммуноблоттинге рекомбинантного антигена, представленного N-концевыми 241 а. о. SPA *R. typhi*, после химического метилирования [11]. Однако обработка P1 и P2 йодистым метилом *in vitro* не привела к увеличению их иммунореактивности в блоттинге и ELISA. Хотя эффективность метилирования не определялась, два наблюдения могут указывать на то, что белки реагировали с  $\text{CH}_3\text{I}$ . Во-первых, метилирование P1 (pH 10 при высушивании) приводило к уменьшению его подвижности в SDS-ПААГ-электрофорезе (не показано), что может быть связано с влиянием метильных групп на конформацию белка, и во-вторых, растворимость белков в 8 М мочеvine после проведения реакций метилирования ухудшалась.

Разумеется, специфичности метилирования *Lys in vivo* и *in vitro* могут различаться. Однако нативные SPA различных штаммов *R. prowazekii* обладают сравнимой иммунореактивностью, несмотря на различия в метилировании *Lys* [6, 7]. Было естественно предположить, что низкая иммунореактивность рекомбинантных белков в сравне-

нии с нативным SPA в большей мере связана с белковой конформацией, чем с наличием метилированных остатков Lys. Известно, что высокая реактивность и специфичность нативного SPA в иммунологических реакциях обусловлены главным образом конформационными эпитопами. Денатурация SPA при 60°C в течение 0.5 ч приводит к снижению его реактивности и специфичности [18]. Нативный SPA был прогреет в указанных условиях и использован в ELISA с гомологичными и гетерологичными сыворотками. Результаты титрования оказались сходны с таковыми для P1, но отличными от результатов титрования с нативным SPA. Во-первых, денатурированный белок мог быть использован в концентрации не менее 0.5 мкг/мл. Во-вторых, титры гомологичных сывороток с этим антигеном составили 1 : 10000, а гетерологичных – 1 : 1000. Таким образом, низкая иммунореактивность искусственных антигенов может быть обусловлена их аномальной конформацией. В связи с этим весьма вероятно, что истинная ренатурация солубилизованных в мочеvine P1 и P2 не имела места. Использованные в работе способы ренатурации (диализ и ступенчатое разбавление) дали одинаковые результаты при титровании в ELISA, в то время как при одномоментном разбавлении антигенов карбонатным буфером результаты были хуже.

В заключение следует сказать, что серодиагностика ЭСТ с использованием клонированных фрагментов видоспецифического антигена неожиданно оказалась сложной проблемой. По-видимому, для ее решения требуется клонирование и экспрессия полноразмерного SPA или по крайней мере клонирование и скрининг с конвалесцентной сывороткой (может быть непосредственно *in situ*) таких фрагментов, конформация которых соответствовала бы конформации нативного антигена.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Бактериальные штаммы, векторы и среды.** Бактериофаговый вектор  $\lambda$ gt11 и штаммы *E. coli* для клонирования в этом векторе были описаны ранее [19]. Для переклонирования и субклонирования исходных *NotI*-вставок использовался плазмидный вектор pBlueScript II K/S+ (Stratagene, США). Чтобы получить высокий уровень синтеза рекомбинантных белков, фрагменты ДНК были переклонированы из соответствующих плазмид в экспрессионный вектор pQE30 (QIAGEN, США), кодирующий на N-конце 6 остатков His. В качестве бактериального хозяина для полученных на этом этапе рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* M-15, содержащий плазмиду pREP4. Эта плазида несет ген *lacI* и обеспечивает устойчивость к канамицину. Трансформанты выращивали в LB-бульоне или агаре, содержа-

щем 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина (протоколы QIAGEN).

Культивирование *R. prowazekii* в куриных эмбрионах и очистка клеток риккетсий осуществляли как описано ранее [6].

**Выделение плазмидных ДНК** щелочным лизисом и экстракцию фаговых и хромосомных ДНК, а также приготовление и трансформацию компетентных клеток плазмидными ДНК проводили согласно Силхэви и др. [20]. Рестрикционное картирование и электрофорез ДНК в агарозных и полиакриламидных гелях осуществляли с использованием опубликованных методик [21].

**Переклонирование фрагментов гена SPA в pQE30.** *NotI*-фрагменты, переклонированные из  $\lambda$ gt11-рекомбинантов в pBlueScript, выделяли электропереносом на DEAE-мембрану NA45 как это делалось ранее [13]. После экстракции фенолом, смесью фенол-хлороформ и хлороформом и переосаждения спиртом липкие концы фрагментов достраивались в полимеразной реакции с использованием 1 ед. акт. ДНК-полимеразы фага T4 на 1 мкг ДНК. Реакционная смесь (20 мкл) содержала 60 мМ Трис-HCl (pH 8.5), 7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дитиотреит, 50 мкМ dNTP и 2 мкг BSA. ДНК-фрагменты переосаждали спиртом и клонировали (по тупым концам) в *SmaI*-сайт pQE30. При этом подходе, основанном на знании рамки трансляции *EcoRI/NotI*-адаптора, использованного для клонирования в  $\lambda$ gt11, и рамки трансляции pQE30, в клонированных фрагментах гена сохраняется непрерывность рамки считывания, начинающейся с иницирующего ATG-кодона плазмидного вектора. Бактериальные клоны, экспрессирующие рекомбинантные антигены, отбирали иммуноскринингом с сывороткой человека, переболевшего ЭСТ. С этой целью колонии трансформантов перепечатывали на нитроцеллюлозные фильтры, предварительно импрегнированные 3 мМ IPTG, и выращивали на свежих чашках, содержащих соответствующие антибиотики. Для лизиса клеток фильтры аккуратно помещали в чашки Петри, содержащие лизирующий раствор (PBS с 1% BSA и 0.2 мг/мл лизоцима), на 30 мин при комнатной температуре. Разрушение липидных мембран осуществляли обработкой подсушенных фильтров парами хлороформа в вакуумном эксикаторе. Фильтры тщательно очищали от клеточных обломков в PBS, содержащем 0.3% Твин-20, помещали в полиэтиленовые пакетики и обрабатывали как в предыдущей работе [13].

**Сверхэкспрессия рекомбинантных антигенов в *E. coli*.** Клетки иммунопозитивных клонов выращивали ночь при 37°C, разбавляли в соотношении 1 : 50 свежим LB, содержащим 3 мМ IPTG, и индуктировали 4 ч при 37°C. В предварительных экспериментах было показано, что рекомбинантные антигены накапливаются в клетках *E. coli* в

виде телец включения [12]. Клетки осаждали низкоскоростным центрифугированием, отмывали 1 раз буфером ТЕ (20 мМ Трис-НСl, рН 7.8, содержащий 2 мМ EDTA) с переосаждением, суспендировали в ТЕ (1/10 исходного объема клеточной культуры) и лизировали лизоцимом в конечной концентрации 0.2 мг/мл в течение 15 мин с двумя циклами замораживания–оттаивания. Для полноты разрушения клеток к лизату добавлялся дезоксихолат Na до 0.3%. Вязкость лизата устраняли ультразвуковой обработкой. Тельца включения осаждали центрифугированием при 12000g 10 мин и дважды отмывали с переосаждением центрифугированием буфером ТЕТ (ТЕ, содержащий 2% Тритон X-100) и 1 раз ТЕ. Осадок высушивали в вакуумном эксикаторе. Белки растворяли в 8 М мочеvine (иногда с добавлением 0.5 М 2-меркаптоэтанола) до концентрации 5 мг/мл и анализировали SDS-ПААГ-электрофорезом и вестерн-блоттингом. Концентрацию частично очищенных белков определяли по методу Лоури [22]. Вставки рекомбинантных плазмид рAES1 и рAES2 из клонов, экспрессирующих рекомбинантные антигены Р1 и Р2, соответственно, контролировали рестрикционным анализом.

Ренатурацию денатурированных мочеvine белков для использования в ELISA осуществляли диализом против 50 мМ Трис-НСl, рН 7.8, содержащего 0.005% Твин-20, 1 М мочеvine и 1 мМ 2-меркаптоэтанол, или против 50 мМ СВ, или ступенчатым разбавлением этими буферами.

**Электрофорез белков и вестерн-блоттинг.** Суммарные белки клеток *E. coli*, лизогенизированных рекомбинантными фагами и фагом  $\lambda$ gt11, частично очищенные рекомбинантные антигены Р1 и Р2, а также SPA риккетсий разделяли SDS-электрофорезом в 10% ПААГ по методу Лэммли [23]. Антигены Р1 и Р2 наносили на дорожки гелей в количестве 100 нг, нативный SPA – 20 нг. Перенос белков на нитроцеллюлозные мембраны осуществляли в аппарате для полусухого электропереноса (БиоКонтроль, Москва) в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем. Мембраны обрабатывали точно как было описано ранее [13]. В качестве вторых (проявляющих) антител использовали антитела против иммуноглобулинов человека (Sigma, США) и кролика (BioRad, США), конъюгированные с пероксидазой хрена. Связанную с мембраной пероксидазу проявляли в PBS, содержащем 0.5 мг/мл 3,3'-диаминобензидина и 0.03%  $H_2O_2$ .

**Химическое метилирование рекомбинантных белков.** После отмыва буфером ТЕТ тельца включения отмывали буфером с рН 7.5 или 10, белки высушивали и обрабатывали йодистым метилом в соответствии с опубликованным методом [24]. 1 мг сухого белка тщательно суспендировали в 100 мкл октана, добавляли  $CH_3I$  (5 мкл), и суспен-

зию инкубировали 24 ч при 75°C с встряхиванием. Взвесь центрифугировали, осадок отмывали дважды октаном с центрифугированием, высушивали и растворяли как указано выше. Проводили также реакцию метилирования парами  $CH_3I$  в вакууме [24].

**Иммуноферментный анализ (ELISA).** Антигены и антисыворотки титровали обычным методом ELISA. С твердой фазой связывали антигены из серийных разведений, приготовленных на 50 мМ СВ. Рекомбинантные белки использовали в концентрациях 10–0.1 мкг/мл. В контроле использовали выделенный из клеток *R. prowazekii* [16] практически чистый нативный SPA в концентрации 1–0.02 мкг/мл. Сыворотки титровали против 0.1 мкг/мл SPA и против 2 мкг/мл рекомбинантных антигенов. Сигналы детектировали в 60 мМ Na-ацетатном буфере, рН 4.5, содержащем 0.4 мг/мл орто-фенилендиамина и 0.03%  $H_2O_2$ , при длине волны 492 нм.

Автор благодарен И.В. Тарасевич, В.Ф. Игнатович и сотрудникам лаб. экологии риккетсий ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН за предоставление конвалесцентных сывороток, а также Н.Г. Демьяновой (ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов) за определение нуклеотидных последовательностей. Исследования частично финансировались Государственной научнотехнической программой России “Новейшие методы биоинженерии”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drancourt M., Raoult D. // FEMS Microbiol. Rev. 1994. V. 13. P. 13–24.
2. Емельянов В.В., Сеницын Б.В. // Генетика. 1999. Т. 35. С. 733–743.
3. Ereemeeva M.E., Balayeva N.M., Raoult D. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1994. V. 1. P. 318–324.
4. Raoult D., Roux V., Ndihokubwayo J.B., Bise G., Baudon D., Martet G., Birtles R. // Emerg. Infect. Dis. 1997. V. 3. P. 357–360.
5. Bourgeois A.L., Dasch G.A. // Rickettsiae and Rickettsial Diseases / Eds W. Burgdorfer, R.L. Anacker. New York: Acad. Press, 1981. P. 71–80.
6. Rodionov A.V., Ereemeeva M.E., Balayeva N.M. // Acta Virol. 1991. V. 35. P. 557–565.
7. Turco J., Winkler H.H. // Infect. Immun. 1994. V. 62. P. 3172–3179.
8. Carl M., Dobson M.E., Ching W.-M., Dasch G.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 8237–8241.
9. Ching W.-M., Carl M., Dasch G.A. // Mol. Immunol. 1992. V. 29. P. 95–105.
10. Ching W.-M., Wang H., Jan B., Dasch G.A. // Infect. Immun. 1996. V. 64. P. 1413–1419.
11. Ching W.-M., Ni Y.-S., Kaplan H., Zhang Z., Dasch G.A. // Abstracts of 13th Sesqui-Annual Meeting of the American Society for Rickettsiology. Pennsylvania, USA. 1997. Abstract № 40.

12. Emelyanov V.V. // Ibid. 1997. Abstract № 65.
13. Emelyanov V.V. // Microb. Pathog. 1993. V. 15. P. 7–16.
14. Emelyanov V.V. // Abstracts of 11th Sesqui-Annual Meeting of the American Society for Rickettsiology. Georgia, USA. 1994. P. 47.
15. Gilmore R.D., Jr., Cieplak W., Policastro P.F., Hackstadt T. // Mol. Microbiol. 1991. V. 5. P. 2361–2370.
16. Емельянов В.В. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 1196–1205.
17. Hackstadt T., Messer R., Cieplak W., Peacock M.G. // Infect. Immun. 1992. V. 60. P. 159–165.
18. Dasch G.A. // J. Clin. Microbiol. 1981. V. 14. P. 333–341.
19. Young R.A., Davis R.W. // Science. 1983. V. 222. P. 778–782.
20. Silhavy T.J., Berman M.L., Enquist L.W. Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1984.
21. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
22. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
23. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
24. Taralp A., Kaplan H. // J. Prot. Chem. 1997. V. 16. P. 183–193.

## Characterization of Recombinant Fragments of the Protective Antigen SPA of Epidemic Typhus Agent

V. V. Emelyanov<sup>#</sup>

*Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences,  
ul. Gamaleya 18, Moscow, 123098 Russia*

Fragments of a gene for species-specific protective antigen SPA of *Rickettsia prowazekii* earlier cloned in  $\lambda$ gt11 were recloned into the in-frame expression vector pQE30. Polypeptides encoded by these fragments were shown to be synthesized in *Escherichia coli* with a yield of up to 100  $\mu$ g/ml of culture and to be accumulated in the cells as inclusion bodies. The partially purified antigens were used in enzyme immunoassay with the sera of humans convalescing from epidemic typhus, tick-borne rickettsioses, and other infectious diseases. One of two recombinant proteins was shown to react in immunoblotting and ELISA with homologous, but not with heterologous, sera. The immunoreactivities in ELISA of the recombinant antigens and heat-denatured SPA proved to be similar, but substantially lower than that of the native SPA. These data as well as the data of other investigators show that serodiagnostics of epidemic typhus using recombinant antigens remains a problem.

*Key words: epidemic typhus, Rickettsia prowazekii, recombinant antigens, immunoenzyme analysis, serodiagnostics*

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 193-5552, e-mail: sileks@online.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.