

Антигенные свойства рекомбинантного аналога белка легумаин трематоды *Opisthorchis felineus*, вызывающей описторхоз у человека

Разумов И.А., Львова М.Н., Пономарева Е.П., Катохин А.В., Петренко В.А., Сазонов А.Э., Огородова Л.М., Новицкий В.В., Сивков А.Ю., Мордвинов В.А.

Antigenic properties estimation for legumain protein recombinant analogue of trematoda *Opisthorchis felineus*, causing human opisthorchiasis

Razumov I.A., Lvova M.N., Ponomareva Ye.P., Katokhin A.V., Petrenko V.A., Sazonov A.E., Ogorodova L.M., Novitsky V.V., Sivkov A.Yu., Mordvinov V.A.

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Разумов И.А., Львова М.Н., Пономарева Е.П. и др.

Работа посвящена оценке применимости белка легумаин возбудителя описторхоза *O. felineus* для иммунодиагностики этого заболевания. Рекомбинантный белок (rOF49-leg), клонированный и экспрессированный в *E. coli*, в иммуноферментном анализе (ИФА) продемонстрировал различие в иммунореактивности между инфицированными и здоровыми сыворотками. Эти результаты показывают потенциальную пригодность этого антигена для разработки серодиагностических тестов на описторхоз.

Ключевые слова: *Opisthorchis felineus*, описторхоз, рекомбинантные белки, легумаин, иммунодиагностика.

We estimated potential of protein legumain from opisthorchiasis agent *O. felineus* for application in immunodiagnosis of this disease. Bacterially expressed recombinant protein (rOF49-leg) showed strong difference in Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) between infected and negative sera. These results suggest the potential of this antigen for development of serodiagnostic test for human opisthorchiasis.

Key words: *Opisthorchis felineus*, opisthorchiasis, recombinant proteins, legumain, immunodiagnosis.

УДК 577.322:616-097

Введение

Печеночный сосальщик *Opisthorchis felineus* относится к представителям семейства *Opisthorchiidae* класса *Trematoda* [8]. Описторхоз, вызываемый *O. felineus*, является серьезным эндемичным заболеванием, широко распространенным на территории России, особенно в Западной Сибири [1]. Известны также описторхоз, возбудителем которого является другой представитель описторхид — *O. viverrini*, в Юго-Восточной Азии, и клонорхоз (китайский описторхоз), вызываемый *Clonorchis sinensis*, в Восточной Азии [15]. Описторхоз характеризуется повреждением гепа-

тобилиарной системы, а также может провоцировать развитие холангиокарциномы [13]. Мировой опыт показывает, что для более успешного и эффективного решения проблем, связанных с описторхозом, необходимо развитие современных методов диагностики, профилактики и лечения этого заболевания. К настоящему времени практически нет данных об иммунном ответе организма-хозяина на отдельные белки-антигены *O. felineus*.

Описаны несколько рекомбинантных белков описторхид *O. viverrini* и *C. sinensis*, полученных в прокариотической системе [4, 5, 9, 10, 12, 16]. Наибольший интерес представляют работы, где авторы, используя

протеомные данные и результаты скрининга библиотек кДНК, выявили гены возможных белково-иммуногенов *O. viverrini* и *C. sinensis* и провели конструирование и клонирование плазмид, несущих эти гены. Далее были получены рекомбинантные аналоги этих белков, и методами иммуноблотта и ИФА было проведено тестирование взаимодействия позитивных сывороток от пациентов больных описторхозом с этими рекомбинантными белками. Полученные результаты указывают на возможность использования данных рекомбинантных аналогов белков этих трематод в иммунодиагностике [10, 12, 16].

Легумаин (аспарагенил эндопептидаза) относится к классу цистеиновых протеаз, который гидролизует пептиды и белки по аспарагину с С-конца белка (база данных MEROPS, clan CD, family C13). Этот белок описан в составе секреторно-экскреторного продукта для многих трематод: *O. viverrini*, *C. sinensis*, *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* [6, 9]. Ген легумаин *C. sinensis* был экспрессирован с использованием системы экспрессии QIAExpress фирмы QIAGEN [7]. При использовании в иммунодиагностике рекомбинантного аналога белка *C. sinensis*, полученного с помощью прокариотической системы экспрессии, была показана высокая чувствительность и специфичность взаимодействия человеческих сывороток с указанным белком: 71,4 и 100% соответственно [7].

Цель данной работы заключалась в определении возможности использования в иммунодиагностике описторхоза рекомбинантного аналога белка легумаин *O. felineus* (rOF49-leg). В рамках поставленной цели был получен клон кДНК, содержащий фрагмент транскрипта гена, кодирующего белок легумаин *O. felineus*, затем приготовлены конструкции для экспрессии клонированного фрагмента, наработан и очищен рекомбинантный белок и проведен анализ его антигенных свойств.

Материал и методы

Коммерческие наборы фирм: Bio-Rad (Aurum Total RNA Mini Kit); Fermentas (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits); Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAquick PCR Purification Kit; QIAquick Nucleotide Removal Kit; QIAexpress kit type IV; QIAprep Spin Miniprep Kit; Applied Biosystems (Terminator Cycle Se-

quencing Kit v. 3.1); ЗАО «Вектор-Бест (Описторхоз-IgG-ИФА-БЕСТ; Описторхоз-IgG-контрольная панель).

Ферменты и маркеры молекулярных весов: в работе использовали Phusion ДНК-полимеразу (Finnzyme, Finland), Taq ДНК-полимеразу («СибЭнзим», г. Новосибирск), эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI и *Bgl*II («СибЭнзим», г. Новосибирск). Во всех реакциях использовали растворы и условия, рекомендованные производителем. Для определения длины фрагментов нуклеиновых кислот использовали λ ДНК/BssI («СибЭнзим», г. Новосибирск). Для определения молекулярных весов белковых препаратов использовали маркеры молекулярных масс белков фирмы Fermentas (Литва).

Олигонуклеотиды. Последовательности праймеров для клонирования легумаина: FLegOF 5'-cacggatccGTTGGAAGCTGCCGGTGTGTC-3' и RLegOF 5'-cgcaagcttTTAGGAACAGACGTTGTGGACC-3', внутренние праймеры для секвенирования легумаина: FLegINOF 5'-TACGTGGAGGCTTGTTACTCTG-3' и RLegINOF 5'-GCCAGCTTG-ATTACCTT-3'. Олигонуклеотиды приготовлены фирмой «Биоссет» (г. Новосибирск).

Создание генно-инженерной конструкции для получения рекомбинантного белка. Для выделения суммарной РНК из *O. felineus* использовали набор для выделения РНК (Aurum Total RNA Mini Kit), а для получения кДНК был использован набор RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits согласно инструкции компании-изготовителя. Выделение ПЦР-фрагментов, конструирование рекомбинантных ДНК и рестриционный анализ проводили по стандартным методикам [11]. Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили в ЦКП СО РАН «Геномика». Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили в программе Sequence Scanner 1.0.

Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного белка. Для получения рекомбинантного белка легумаин использовали штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene, США). Этот штамм, трансформированный плазмидной ДНК pMALTEV-legumain, обозначен как *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pMALTEV-legumain. После добавления IPTG до конечной концентрации 0,3 ммоль трансформированную культуру выращивали при температуре 30 °С в 500 мл жидкой среды LB с добавлением ампициллина натриевой соли и при перемешивании со скоростью 180 об/мин. После индукции IPTG

и инкубации суспензию центрифугировали при 4 000g в течение 20 мин при 4 °С и осадок растворяли в буфере (20 ммоль TrisHCl (pH 7,5), 200 ммоль NaCl, 1 ммоль ЭДТА). Далее суспензию из биомассы подвергали обработке ультразвуком (ультразвуковой дезинтегратор Vibra CellTM-Sonics) на льду (пять раз по 10 с при 300 Вт с 30-секундными паузами между обработками). Смесь центрифугировали при 15 000g 20 мин при температуре 40 °С, полученные супернатант и осадок анализировали на наличие целевого белка с помощью денатурирующего полиакриламидного гелеэлектрофореза (ДСН-ПААГ-ЭФ).

Очистку гибридного белка maltose binding protein (MBP)-legumain проводили с помощью аффинной хроматографии. При прохождении через колонку с амилозой (Amylose resin-New England Biolabs) гибридный белок связывался, затем его элюировали раствором мальтозы с концентрацией 10 ммоль. Очистку проводили по протоколу производителя. Полученные клеточные лизаты штамма-производителя и очищенные рекомбинантные белки анализировали методом белкового электрофореза по методу [3] в 10—12%-м геле.

Концентрацию белка определяли путем измерения оптической плотности по протоколу Bio-Rad-protein assay на спектрофотометре с использованием калибровочной кривой, построенной для препаратов очищенного бычьего сывороточного альбумина (BSA) (молекулярная масса 55 кДа) с известными концентрациями.

Иммуноблотт и иммуноферментная реакция. Перенос белков после ЭФ проводили по методу Н. Towbin и соавт. [14], а проведение или постановку иммуноферментной реакции осуществляли, как описано ранее [2]. ИФА с рекомбинантным белком в качестве антигена проводили, используя компоненты тест-системы фирмы «Вектор-Бест» (Россия), в соответствии с инструкцией производителя. Измерение оптической плотности проводили с помощью планшетного фотометра Multiscan EX (ThermoLabSystems, Финляндия) при длине волны 492 нм.

Результаты представлены на графике в виде среднего арифметического значения оптической плотности. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Программное обеспечение. Для разработки схемы клонирования целевых генов использовали программный пакет Vector NTI 9 (InforMax, США). Расчет олиго-

нуклеотидных праймеров для ПЦР и подбор условий реакции выполняли с помощью компьютерной программы OLIGO, расчет температуры отжига праймеров проводили с помощью калькулятора на сайте Finnzyme (http://www.finnzymes.fi/tm_determination.html). При проведении компьютерного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей применяли программы, представленные на сайтах NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> и <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), EXPASY (www.expasy.org), а также программы SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), PSIPRED 3.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>), NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Результаты и обсуждение

С помощью коммерческого набора для выделения РНК была выделена суммарная РНК из 20 взрослых особей *O. felineus*. Образцы РНК использовали для получения кДНК с помощью соответствующего коммерческого набора. Далее кДНК использовали для реакции амплификации, для наработки фрагмента легумаина *O. felineus*, не содержащего сигнальный пептид. С этой целью были разработаны специфические праймеры, содержащие сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Hind*III, а также дополнительные нуклеотиды, необходимые для воссоздания правильной рамки трансляции. В ходе амплификации с использованием этих праймеров был получен фрагмент, соответствующий по длине рамке трансляции гена легумаина *O. felineus* без сигнального пептида, которая составляет 1 245 нуклеотидов. Для получения конструкции рекомбинантной плазмиды, кодирующей белок легумаин *O. felineus*, этот фрагмент клонировали в экспрессирующий вектор. С этой целью был выбран вектор pMALTEV, чтобы преодолеть свойство нерастворимости, показанное для рекомбинантных белков легумаина *C. sinensis* и *O. viverrini* [7, 9]. В этом векторе рекомбинантный легумаин должен экспрессироваться в составе гибридной конструкции с мальтозосвязывающим белком (MBP), повышающим растворимость. Эта конструкция обозначена как legumain-MBP 100 кДа. На рис. 1 представлена схема плазмиды pMALTEV-legumain и способ ее конструирования. Таким образом, в результате была получена рекомбинантная конструкция для прокариотической

экспрессии полноразмерного гена легумина *O. felinus*. Плазмида pMALTEV-legumain содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептид legumain-MBP длиной 797 аминокислотных остатков ($\approx 89,4$ кДа), включая 420 аминокислот белка легумина ($\approx 47,9$ кДа).

Для получения рекомбинантного белка легумина использовали штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS, трансформированный плазмидной ДНК pMALTEV-legumain и обозначенный как *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pMALTEV-legumain. Образец биомассы анализировался с помощью белкового электрофореза по Лэммли на наличие экспрессии целевого продукта и его растворимости (рис. 2).

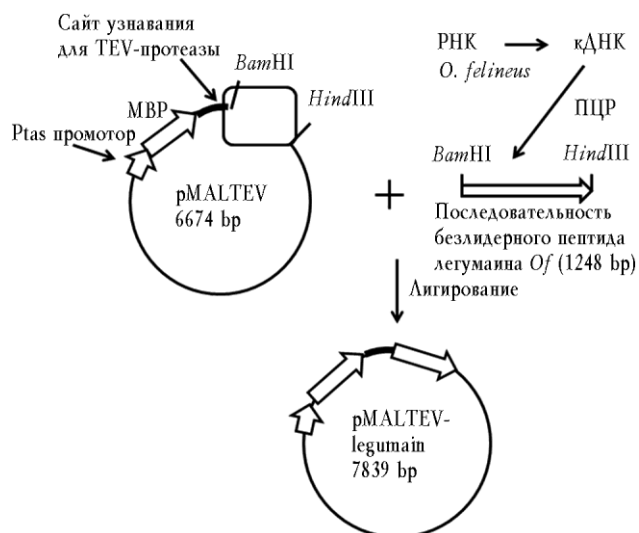


Рис. 1. Схема конструирования плазмиды pMALTEV-legumain: BamHI, HindIII — уникальные сайты узнавания для соответствующих эндонуклеаз рестрикции, в скобках указаны координаты их сайтов

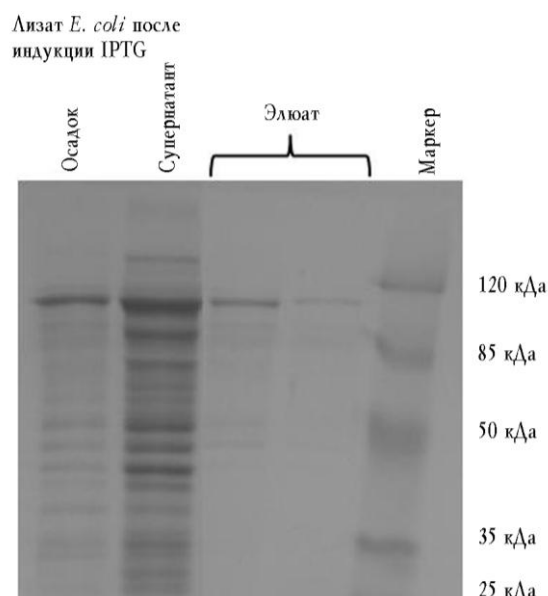


Рис. 2. Электрофореграмма. Экспрессия и очистка белка legumain-MBP, синтезирующегося под контролем рекомбинантной плазмиды pMALTEV-legumain в клетках штамма-производителя *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS-pMALTEV-legumain

Изопропил- β -D-тиогаляктозид (ИПТГ) обеспечивает индукцию синтеза рекомбинантного гибридного белка MBP-legumain с уровнем экспрессии при росте на жидких питательных средах до 40 мг целевого белка на 1 л культуральной жидкости. Цифровая обработка электрофореграмм показала, что чистота белка после аффинной хроматографии достигает 67—88%.

С этой целью выявляли взаимодействие рекомбинантного белка legumain-MBP с набором из двух позитивных сывороток от больных описторхозом и двух негативных сывороток (ЗАО «Вектор-Бест»). Выявление антител в сыворотках крови проводили с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) с использованием в качестве антигена полипептида legumain-MBP. Образцы сыворотки тестировались трижды. На рис. 3 показаны усредненные значения для позитивных (ПС) и негативных (НС) сывороток, полученные в этом анализе, позволившем получить позитивную оценку для антигенных свойств у рекомбинантного белка. На рис. 3 отмечены звездочкой точки, демонстрирующие достоверные различия между позитивными и негативными сыворотками. Результаты этого первичного анализа показывают, что legumain-MBP способен связываться с антителами позитивных сывороток больных описторхозом и не реагирует с антителами негативных сывороток (ЗАО

«Вектор-Бест»). Дальнейшее исследование рекомбинантного белка с применением большего количества позитивных сывороток позволит более точно оценить его антигенные свойства.

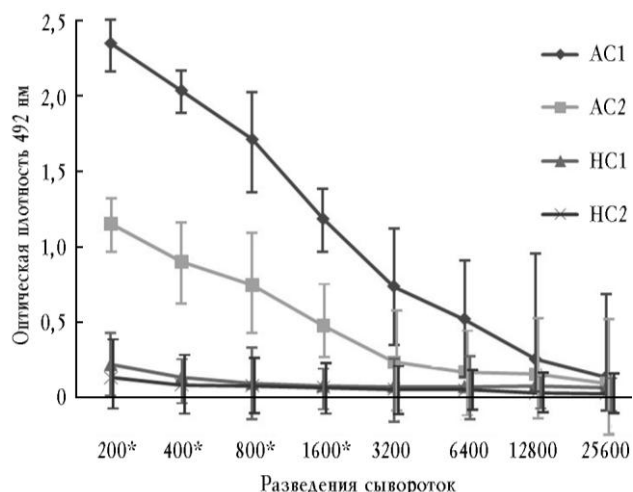


Рис. 3. Результаты тестирования взаимодействия позитивных анти-сывороток от больных описторхозом и отрицательных или нормальных сывороток с препаратом рекомбинантного белка legumain + МВР в ИФА

Определение специфичности взаимодействия антител позитивной сыворотки больного описторхозом с рекомбинантным легумином *O. felineus* осуществляли методом иммуноблотта. Белки, разделенные электрофорезом в полиакриламидном геле, как описано выше [2], переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Millipore, США). Появление ярких сине-фиолетовых или коричневых полос (в зависимости от использованного проявляющего раствора) подтверждает, что рекомбинантный легумин *O. felineus* ($\approx 47-48$ кДа) связывается с антителами позитивной сыворотки от больного описторхозом. С антителами негативной сыворотки реакции не наблюдали (рис. 4).

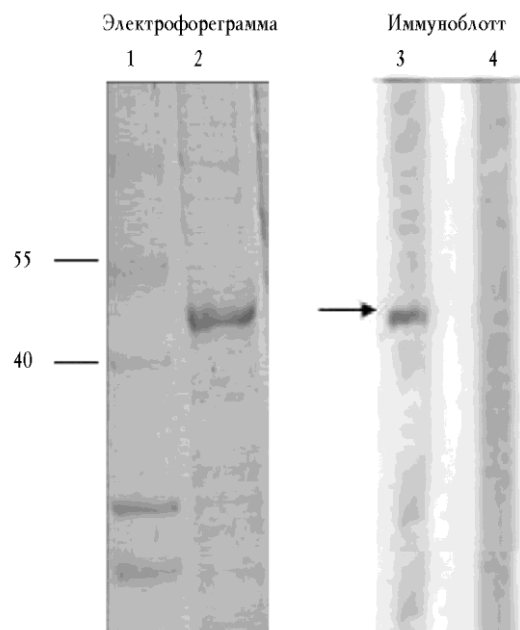


Рис. 4. Выявление методом иммуноблотта белка-мишени в препаратах рекомбинантного белка легумина для антител референс-сыворотки от больного описторхозом: 1 — маркеры молекулярного веса (Fermentas); 2 — очищенный рекомбинантный аналог белка легумина *O. felineus*; 3 — взаимодействие антител позитивной сыворотки от больного описторхозом с очищенным рекомбинантным аналогом белка легумина *O. felineus* ($\approx 47-48$ кДа); 4 — отсутствие реагирования с антителами негативной сыворотки здорового пациента

Заключение

Таким образом, в процессе работы был создан штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pMALTEV-legumain — продуцент рекомбинантного полипептида легумина, сохранившего антигенные свойства легумина *O. felineus*. Этот штамм обеспечивает при культивировании на жидких питательных средах биосинтез указанного полипептида в растворимой форме с уровнем экспрессии не ниже 40 мг рекомбинантного гибридного белка на 1 л культуральной жидкости. Растворимость гибридного белка обеспечивается экспрессией легумина совместно с мальтозосвязывающим белком (МВР). Благодаря наличию в плазмиде pMALTEV-legumain нуклеотидной последовательности, кодирующей специфический сайт узнавания TEV-протеазы, обеспечивается в дальнейшем отщепление целевого белка легумина от МВР и получение очищенного рекомбинантного легумина *O. felineus*. Этот рекомбинантный аналог, по-видимому, может быть использован для проведения или совершенствования

иммунодиагностики описторхоза, вызываемого печеночным сосальщиком *O. felinus*, а также для получения специфических антител к этому паразиту и генно-инженерных вакцин против описторхоза.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, проект № 16.512.11.2129.

Литература

1. Государственный доклад // Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. М., 2009. С. 349—350.
2. Котелкин А.Т., Разумов И.А., Локтев В.Б. Получение и характеристика мышинных гибридом, секретирующих моноклональных антитела к основному растворимому антигену *Opisthorchis felinus* // Мед. паразитология и паразитарные болезни. 1999. Т. 3. С. 6—10.
3. Остерман А.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. 1981. С. 37—64.
4. Eursithichai V., Viyanant V., Vichasri-Grams S. et al. Molecular Cloning and Characterisation of a Glutathione S-Transferase Encoding Gene From *O.viverrini* // Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 2004. V 22. P. 219—228.
5. Hong S.-J., Yun Kim T., Gan X.-X. et al. Clonorchis sinensis: glutathione S-transferase as a serodiagnostic antigen for detecting IgG and IgE antibodies. // Experimental parasitology. 08.2002. V. 101. P. 231—234.
6. Hu F., Yu X. et al. Clonorchis sinensis: expression, characterization, immunolocalization and serological reactivity of one excretory/secretory antigen-LPAP homologue // Exp. Parasitol. 2007. V. 117 (2). P. 157—221.
7. Ju J.W., Joo H.N. et al. Identification of a serodiagnostic antigen, legumain, by immunoproteomic analysis of excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* adult worms // Proteomics. V. 9 (11). P. 3066—3144.
8. King S., Scholz T. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview // The Korean Journal of Parasitology. 2001. V. 39. P. 209—221.
9. Laha T., Srija J., Srija B. et al. Asparaginase endopeptidase from carcinogenic liver fluke *O.viverrini* and its potential for serodiagnosis // Int. J. Infect. Dis. 2008. V. 12 (6). P. e49—e59.
10. Li S., Shin J.G., Cho P.Y. et al. Multiple recombinant antigens of *C.sinensis* for serodiagnosis of human clonorchiasis // Parasitol Res. 2011. V. 108. P. 1295—1302.
11. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
12. Shen C., Lee J.A. et al. Serodiagnostic applicability of recombinant antigens of *Clonorchis sinensis* expressed by wheat germ cell-free protein synthesis system // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2009. V. 64 (3). P. 334—343.
13. Srija B., Kaewkes S., Sithithaworn P. et al. Liver Fluke Induces Cholangiocarcinoma // PLoS Medicine. 2007. V. 4. P. 1148—1155.
14. Towbin H., Staekelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels tonitrocellulose sheets. Procedure and some applications. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350—4354.
15. World Health Organization Study Group. Geneva, 2005. P. 243.
16. Zhao Q.P., Moon S.U. et al. Evaluation of *Clonorchis sinensis* recombinant 7-kilodalton antigen for serodiagnosis of clonorchiasis // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2004. V. 11 (4). P. 814—821.

Поступила в редакцию 09.10.2012 г.

Утверждена к печати 09.10.2012 г.

Сведения об авторах

- И.А. Разумов** — д-р биол. наук, зав. лабораторией молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).
- М.Н. Львова** — науч. сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).
- Е.П. Пономарева** — науч. сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).
- А.В. Катохин** — канд. биол. наук, науч. сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).
- В.А. Петренко** — науч. сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).
- А.Э. Сазонов** — д-р мед. наук, лаборатория молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).
- Л.М. Огородова** — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАМН, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ (г. Томск).

Разумов И.А., Львова М.Н., Пономарева Е.П. и др. Антигенные свойства рекомбинантного аналога белка лезумаин трематоды...

В.В. Новицкий — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

А.Ю. Сивков — канд. биол. наук, науч. сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

В.А. Мордвинов — д-р биол. наук, науч. сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

Для корреспонденции

Сивков Антон Юрьевич, тел. 8 (383) 363-49-01-2205; e-mail: sivkov@bionet.nsc.ru