



УДК 616.981.42: 577.1; 616.013; 612.017

Характеристика антигенного комплекса, извлекаемого термоэкстракцией из клеток бруцелл в L-форме

К. Ю. Ястремская, Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев, Л. М. Михайлов,
А. И. Калиновский, Н. Л. Баранникова

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск

E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Аннотация. Методом термоэкстракции получен антигенный комплекс из клеток бруцелл в L-форме, дана характеристика его химического состава. Проведено электрофоретическое фракционирование полученного антигенного комплекса в блоках полиакриламидого геля в присутствии додецилсульфата натрия. С помощью иммуноблоттинга показано, что иммунохимической активностью обладала диффузная белковая фракция с молекулярной массой от 67,5 до 75,5 кДа. Показана высокая активность и специфичность антигенного комплекса в реакции иммунодиффузии и реакции кольцепреципитации.

Ключевые слова: бруцеллы, L-форма, термоэкстракт, антигенный комплекс.

Введение

Бруцеллёз – зоонозная инфекция, передающаяся людям посредством контакта с заражёнными животными или при употреблении инфицированного мяса, молока и молочных продуктов [2; 9; 11; 12]. Возбудителем бруцеллёза являются мелкие грамотрицательные бактерии – бруцеллы, относящиеся ко II группе патогенных для человека микроорганизмов [1; 12]. Бруцеллы отличаются высокой изменчивостью, могут переходить из S- в R- и, при определённых условиях, в L-форму. L-формы возникают при разнообразных воздействиях, препятствующих синтезу клеточных стенок [2; 17]. Начальной стадией образования L-форм является набухание бактерий, формирование гигантских шаровидных тел или нитевидных форм, проходящих определённые этапы преобразования, завершающихся образованием L-культур. Изменённые формы рассматриваются как свойство приспособительного характера [9; 17], между тем L-формы бруцелл способны длительно персистировать в макроорганизме и вызывать патологические изменения [2; 12]. Особенности антигенной структуры возбудителя в L-форме, связанные с полной или частичной утратой клеточной стенки, создают трудности при диагностике бруцеллёза. В связи с этим изучение и характеристика антигенов L-форм бруцелл актуально и является целью настоящей работы.

Материалы и методы

В работе использовали штамм бруцелл *Brucella abortus* И-206 в L-форме, из которого были получены три серии термоэкстракта (ТЭ) *B. abortus* И-206 (L): сер. 1, сер. 2, сер. 3.

Культуру бруцеллёзного микроба в L-форме выращивали на питательной среде для культивирования L-форм бруцелл [7] в термостате при температуре 37 ± 1 °С в течение 3–5 суток. Выросшую культуру смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР) pH $7,2 \pm 0,1$, инактивировали добавлением 2,5%-ного раствора формалина (об./об.) и выдерживали 24 часа при температуре 37 ± 1 °С. После контроля специфической стерильности [4] суспензию бактерий бруцелл доводили до концентрации $5 \cdot 10^{10}$ м.к./мл ЗФР pH $7,2 \pm 0,1$. Затем суспензию подвергали термообработке на водяной бане при температуре 100 ± 1 °С в течение 50 мин, охлаждали и центрифугировали при 7000 g в течение 1 ч. Надосадочную жидкость – термоэкстракт (ТЭ) – диализовали 24 ч против дистиллированной воды (dH_2O) с трехкратной сменой воды при температуре 4 ± 1 °С. Затем антигенный комплекс ТЭ осаждали добавлением трёх объёмов 96%-ного этанола и оставляли на 24 ч при температуре 4 ± 1 °С. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 45 мин, растворяли в минимальном количестве dH_2O , диализовали про-

тив dH₂O в течение 12–16 ч и лиофильно высушивали.

Содержание белка в полученном экстракте определяли по методу Лоури [15] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Определение общего содержания углеводов в экстракте осуществляли в реакции с фенолом и концентрированной серной кислотой согласно методике Р. Хансон и Дж. Филлипс с использованием глюкозы в качестве стандарта [10]. Показания оптической плотности в каждой пробе снимали при длине волны 488 нм против контрольного образца, приготовленного без глюкозы.

Содержание 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) определяли в реакции с тиобарбитуровой кислотой [10] после гидролиза антигенного комплекса в 0,02 N растворе H₂SO₄ в течение 20 мин, при температуре 100±1 °С, показания оптической плотности снимали при длине волны 548 нм.

Суммарное количество нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически согласно А. С. Спирину [8] в ультрафиолетовой области спектра при 270 и 290 нм с предварительным удалением на холоду кислоторастворимых (0,5 н. HClO₄) компонентов из анализируемого материала.

Для изучения однородности антигенного материала проводили электрофоретическое разделение белков в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS по Лэммли [13].

Иммунохимическое проявление полученных поверхностных антигенов L-форм бруцелл проводили в иммуноблоттинге [16], с иммуноглобулинами, выделенными из кроличьей гипериммунной сыворотки против бруцелл в L-форме [14].

Специфическую активность полученного экстракта проверяли в реакции иммунодиффузии (РИД) по Оухтерлони [3], на стекле в 1%-ном агаровом геле, с гипериммунной кроличьей сывороткой против бруцелл в L-форме [5]. Специфичность ТЭ проверяли с сыворотками

против гетерологичных микроорганизмов – сыворотка кишечной синеозной О:9 для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) сер. 99 (Санкт-Петербургский Н вакцин и сывороток), сыворотка диагностическая холерная О1 для реакции агглютинации (РА) сер. 219 (Иркутский научно-исследовательский противочумный институт), сыворотка диагностическая туляремиальная для РА сер. 183 (Иркутский научно-исследовательский противочумный институт), контролем служила сыворотка бруцеллезная диагностическая поливалентная для РА (Иркутский научно-исследовательский противочумный институт) Определение природы компонента, взаимодействующего с сывороткой в РИД, осуществляли обработкой полученного антигенного комплекса протеиназой К (Sigma, USA).

Определение преципитирующих свойств полученного антигенного комплекса проводили в реакции кольцепреципитации (РКП) [6].

Результаты и обсуждение

Из агаровой культуры клеток бруцелл в L-форме посредством термоэкстракции был получен антигенный комплекс. Анализ химического состава экстракта показал в среднем содержание: белка – 52,8 %, углеводов – 17,4 %, нуклеиновых кислот не более 2 %, КДО не более 0,02 % (табл.). Электрофоретический анализ распределения белков антигенного комплекса в блоках 15%-ного полиакриламидного геля в присутствии SDS показал наличие как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных компонентов. На электрофореграмме зафиксированы полипептиды с молекулярными массами от 6,5 до 116 кДа, доминантными являлись полипептиды с молекулярной массой 67,5 и 75,5 кДа, окрашиваемые красителем Coomassie R-250.

Результат проведенного иммуноблоттинга антигенного комплекса со специфическими иммуноглобулинами свидетельствует о том, что иммунохимической активностью обладают фракции ТЭ с молекулярными массами в пределах 67,5–75,5 кДа.

Таблица

Химический состав антигенного комплекса, извлекаемого термоэкстракцией из клеток бруцелл штамма *Brucella abortus* И-206 в L-форме

Антигенный комплекс	Белок, %	Углеводы, %	Нуклеиновые кислоты, %	КДО, %
<i>B. abortus</i> И-206 (L) сер. 1	63,2±1,4	16,3±0,5	0,57	0,02
<i>B. abortus</i> И-206 (L) сер. 2	41,5±0,3	19,4±0,5	2	0,015
<i>B. abortus</i> И-206 (L) сер. 3	53,8±0,2	18,2±1,0	0,87	0,017
Среднее значение	52,8±0,6	17,4±0,7	1,14	0,017

Полученный термоэкстракт обладает высокой активностью и специфичностью. В реакции иммунодиффузии на стекле в 1%-ном агаровом геле ТЭ образовывал одну линию преципитации с гомологичной сывороткой и не взаимодействовал с сыворотками против гете-

рологических микроорганизмов (рис.). Антигенный комплекс после обработки гидролизующей белки протеиназой К в РИД линий преципитаций не образовывал, что говорит о белковой природе компонента ТЭ, взаимодействующего со специфической сывороткой.

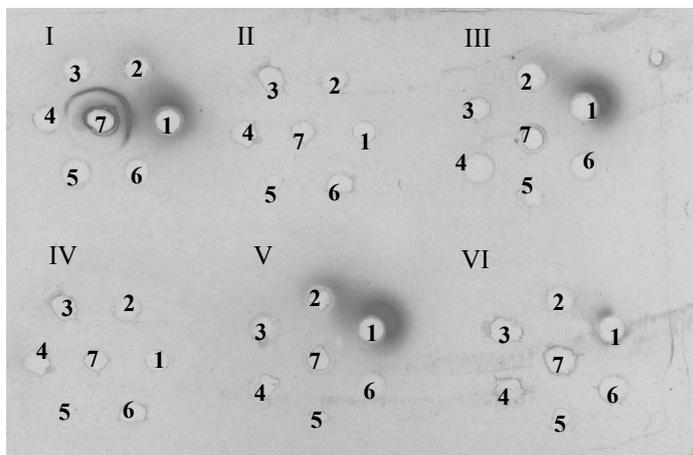


Рис. Реакция иммунодиффузии препарата термоэкстракта с использованием гомологичной и гетерологичных сывороток. I – сыворотка, полученная против клеток *B. abortus* И-206 (L); II – диагностическая сыворотка кишечной синеозной О:9 для РНГА сер. 99; III – диагностическая бруцеллезная поливалентная сыворотка для РА сер. 3; IV – диагностическая холерная сыворотка О1 для РА сер. 219; V – диагностическая туляремийная сыворотка для РА сер. 183; VI – диагностическая бруцеллезная поливалентная сыворотка для РА сер. 9. Разведение сыворотки: №№ 1–6 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 соответственно. № 7 – препарат термоэкстракта

Образование преципитата в РКП в виде глубокого кольца отмечалось при разведении термоэкстракта 1:160, с сыворотками против гетерологичных микроорганизмов результат отрицательный.

Заключение

Таким образом, посредством термоэкстракции из клеток бруцелл в L-форме был выделен антигенный комплекс. По химическому составу полученный термоэкстракт представляет собой белковополисахаридный комплекс, неоднородный по результату электрофоретического разделения в блоках ПААГ. Доминантными полипептидами являлись белки с молекулярной массой 67,5 и 75,5 кДа, эти же полипептиды были иммунохимически активны в иммуноблоттинге со специфичными иммуноглобулинами, выделенными из кроличьей гипериммунной сыворотки против бруцелл в L-форме. Полученный антигенный комплекс характеризуется высокой активностью и специфичностью в РИД и РКП. Дальнейшее изучение и выделение очищенных антигенов клеток бруцелл в L-форме послужит основой для по-

лучения диагностических препаратов и конструирования на их основе тест-систем.

Литература

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): СП 1.3.1285-03 – М., 2003. – 85 с.
2. Бруцеллез сельскохозяйственных животных / И. А. Косилов [и др.]. – Новосибирск, 1999. – 344 с.
3. Гусев А. И. Микрометод преципитации в агаре / А. И. Гусев // Иммунохимический анализ / под ред. Л. А. Зильбер. – М., 1968. – С. 99.
4. Методические рекомендации по контролю специфической стерильности биологических препаратов, приготовленных из бруцелл / О. С. Петухова [и др.]. – Иркутск, 1987. – 4 с.
5. Методические рекомендации по получению гипериммунной кроличьей сыворотки против бруцелл в L-форме / Л. М. Михайлов [и др.]. – Иркутск, 2005. – 4 с.
6. Никитин В. М. Справочник методов иммунологии / В. М. Никитин; под ред. М. В. Бочкарева. – Кишинёв, 1982. – 304 с.
7. Пат. 2416429 RU МПК G 01 N 33/531. Способ получения антигенного препарата из бруцелл в L-форме / Л. М. Михайлов [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГУЗ Иркутск НИПЧИ Сибири и ДВ Роспотребнадзора – № 2009120812/15; заявл. 01.06.2009; опубл. 20.04.2011, Бюл. № 11.

8. Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот / А. С. Спирин // Биохимия. – 1958. – Т. 23, вып. 5. – С. 656–662.
9. Триленко П. А. Бруцеллёз сельскохозяйственных животных / П. А. Триленко. – Л., 1976. – 280 с.
10. Хансон Р. Химический состав бактериальной клетки / Р. Хансон, Дж. Филлипс // Методы общей бактериологии : пер. с англ. : в 3 т. – М., 1984. – Т. 2. – С. 283–373.
11. Cutler S. J. Brucellosis – new aspects of an old disease / S. J. Cutler, A. M. Whatmore, N. J. Commander // J. of Applied Microbiology. – 2005. – Vol. 98, N 6. – P. 1270–1281
12. Hatten B. A. Intracellular Production of Brucella L Forms / B. A. Hatten, S. E. Sulkin // J. of Bacteriology. – 1966. – Vol. 91, N 1. – P. 285–296.
13. Laemmli U. K. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events / U. K. Laemmli, M. Favre // J. Mol. Biol. – 1973. – Vol. 80, N 4. – P. 575–599.
14. McKinney M. M. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid / M. M. McKinney, A. Parkinson // J. of Immunological Method. Elsevier. – 1987, N 96. – P. 271–278.
15. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275.
16. Towbin H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Stachelin, J. Gordon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76, N 9. – P. 4350–4354.
17. Ultrastructure of Brucella abortus L-Forms Induced by Penicillin in a Liquid and in a Semisolid Medium / B. A. Hatten [et al.] // J. of bacteriology. – 1969. – Vol. 99, N 2. – P. 611–618.

Characterization of the antigenic complex extracted from the cells of *Brucella* with the termoextraction in L-form

K. Yu. Yastremskaya, E. Yu. Markov, V. B. Nikolaev, L. M. Mikhailov,
A. I. Kalinovsky, N. L. Barannikova

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor, Irkutsk

Abstract. Obtained by the method of termoextraction antigenic complex from *Brucella* cells in an L-form, the characteristic of its chemical composition. Performed electrophoretic fractionation of the resulting antigenic complex in the polyacrylamide gel blocks in the presence of sodium dodecyl sulfate. With the help of Western blot showed that immunoreactive protein had a diffuse fraction with a molecular mass of 67.5 to 75.5 kDa. A high activity and specificity of the antigenic complex in the reaction of immunodiffusion and interfacial precipitin test.

Key words: *Brucella*, L-form, termoextrakt, antigenic complex.

Ястремская Ксения Юрьевна
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78
младший научный сотрудник
тел. 8(3952)22-01-35
E-mail: kseka13@mail.ru

Yastremskaya Kseniya Yurievna
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
junior research scientist
phone: 8(3952)22-01-35
E-mail: kseka13@mail.ru

Марков Евгений Юрьевич
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
66404, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78
доктор биологических наук
тел. 8(3952)22-01-35
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Markov Evgeny Yurievich
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
D. Sc. in Biology
phone: 8(3952)22-01-35
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Николаев Валерий Борисович
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78
кандидат медицинских наук
тел. 8(3952)22-01-35
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Nikolaev Valerii Borisovich
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
Ph.D. in Medicine
phone: 8(3952)22-01-35
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Михайлов Леонид Михайлович
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78
кандидат медицинских наук
тел. 8(3952)22-01-35
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Mikhailov Leonid Mikhailovich
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
Ph.D. in Medicine
phone: 8(3952)22-01-35
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Калиновский Александр Иннокентьевич
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78
доктор медицинских наук
тел. 8(3952)22-01-35
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Kalinovsky Alexander Innokentievich
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
D. Sc. in Biology
phone: 8(3952)22-01-35
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Баранникова Наталья Леонидовна
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78
врач-бактериолог
тел. 8(3952)22-01-35
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Barannikova Nataliyea Leonidovna
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
bacteriologist physician
phone: 8(3952)22-01-35
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru