

УДК 57.083.3

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕНА С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 45 КДА ИЗ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

¹Алфредо Элдер, ¹Вершинина В.И., ²Хаертынов К.С., ²Герасимова С.В.,
³Уразов Н.Г., ²Хаертынова И.М.

¹ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань, e-mail: public.mail@ksu.ru;

²ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия»
Минздравсоцразвития России, Казань, e-mail: rkb2_rt@mail.ru;

³ГАУЗ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТЗ», Казань, e-mail: centre_spid@tatar.ru

В настоящей работе описан метод получения из клеток *M. tuberculosis* антигенного препарата с молекулярной массой 45 кДа, обладающей серологической активностью с сыворотками больных с установленным диагнозом туберкулеза в реакциях иммуноблоттинг. Данный результат предполагает, что на полученном антигене проявляется 100% чувствительность, что вызывает определенные сомнения. По литературным данным известно, что 100% противотуберкулезные антитела (ПТАТ) выявляются только при фиброзно-кавернозном туберкулезе и при бактериовыделении [13], во всех остальных формах туберкулеза процент выявляемости ПТАТ был значительно ниже. Таким образом, в результате проведенной работы из клеток *M. tuberculosis* был получен антигенный препарат с молекулярной массой 45 кДа, который содержит менее 5% балластных белков. Предположительно этот антиген представляет собой гликопротеин, локализованный на поверхности бактериальной клетки. Данное предположение основывается на щадящем приеме обработки бактериальных клеток (10% водный раствор-ДМСО) и на сходстве молекулярных масс 45–47 кДа антигенного комплекса

Ключевые слова: антиген, микобактерия туберкулез, иммуноблоттинг

A METHOD FOR OBTAINING AN ANTIGEN WITH A MOLECULAR WEIGHT OF 45KDA FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

¹Alfredo Elder, ¹Vershinina V.I., ²Khaertynov K.S., ²Gerasimova S.V.,
³Urazov N.G., ²Khaertynova I.M.

¹Kazan (Volga) Federal University, Kazan, e-mail: public.mail @ksu.ru;

²Kazan State Medical Academy, the Health Ministry of Russia, Kazan, e-mail: rkb2_rt@mail.ru;

³National Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases MH pT3, Kazan,
e-mail: centre_spid@tatar.ru

This work describes a method for obtaining an antigenic product with a molecular mass of 45 kDa from *M. tuberculosis* cells. The antigenic product reacts with the serum of patients diagnosed with tuberculosis during immunoblot analysis. This result which suggests that the derived antigen exhibited 100% sensitivity is questionable. From literature, it is known that 100% of anti-tuberculosis antibodies are only observed during fibrous-cavernous tuberculosis and bacterial discharge. In all the other forms of tuberculosis, the percentage detection of anti-tuberculosis antibodies was significantly lower. Thus, we have obtained from *M. tuberculosis* cells, an antigenic product with a molecular mass of 45 kDa with less than 5% ballast proteins. We assume that this antigen is a glycoprotein localized on the surface of the bacterial cell. This assumption is based on the sparingly treatment of bacterial cells (10% aqueous DMSO), and on the similarity in molecular mass to that of the antigen complex, 45–47 kDa.

Keywords: antigen, *Mycobacterium tuberculosis*, immunoblotting

Серологические методы наиболее удобны для диагностики инфекционных болезней, так как для анализа используется легко доступный клинический материал: сыворотка или плазма крови человека. Однако эти методы, включая метод ИФА, не обладают достаточной чувствительностью для диагностики туберкулеза [2]. Так, при использовании препарата, выделенного из клеточных стенок микобактерий H37Rv и содержащего антиген с молекулярной массой 38–42 кДа, противотуберкулезные антитела (ПТАТ) были выявлены только у 76,7% больных туберкулезом и у 70,0% больных инфильтративным туберкулезом [1]. При

использовании антигенного комплекса с молекулярной массой 45–47 кДа чувствительность метода составила 40% [5]. На использованных в недавнем прошлом антигенных препаратах у лиц с установленным диагнозом туберкулез противотуберкулезные антитела (ПТАТ) обнаруживаются в 100% случаях только при фиброзно-кавернозном туберкулезе и при бактериовыделении [3]. Однако пациенты с фиброзно-кавернозной формой заболевания составляют небольшую часть общего количества больных туберкулезом. При очаговом туберкулезе ПТАТ обнаруживают только в 31% случаев, а при туберкулезе бронхов – в 15,5% слу-

чаев [3]. По данным Чуканова В.И. и соавт. ПТАТ выявляют у больных туберкулезом в среднем в 71 % случаев [4].

При использовании отдельных рекомбинантных антигенов *Mycobacterium tuberculosis* выявляемость ПТАТ в сыворотках больных туберкулезом за исключением ВИЧ-инфицированных пациентов также невысока – около 60 % [8]. Есть данные, что использование набора значительного количества рекомбинантных антигенов приводит к улучшению результата: ПТАТ выявляли у 93 % больных туберкулезом [6,11].

Цель настоящей работы заключалась в получении антигенного препарата из *Mycobacterium tuberculosis*, который отличался бы высокой активностью и специфичностью.

Материалы и методы исследования

Культуру *Mycobacterium tuberculosis* штамм «Академия», выращивали на твердой питательной среде Левенштейна-Йенсена в течение 40–60 дней, затем переносили в жидкую питательную среду Сотона. Нарращивание бактериальной массы в последней проводили в аппарате «Bacteck» при 37 °С в течение 7–10 суток.

Антигенный препараты из *Mycobacterium tuberculosis* получали обработкой бактериальных клеток 10% диметилсульфоксидом (ДМСО) с последующей дезинтеграцией стеклянными шариками в гомогенизаторе.

Белковые фракции исходного, промежуточного и конечного препаратов выявляли с помощью электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ) по Леммли [7].

Для определения молекулярной массы антигенов использовали набор белков «Broad Range» (BIO-RAD).

Гель-фильтрацию выполняли на колонках размером 2×100 см, заполненных соответственно сефадексами G-200.

Полученные антигенные препараты анализировали с помощью иммуноблотинга [10]. Иммуноблоттинг выполняли по методике, описанной в инструкции к набору «NEW LAV BLOT 1» (BIO-RAD).

Результаты исследования и их обсуждение

Бактериальные клетки, выращенные на среде Сотона, осадили центрифугированием в течение 30 минут при 8000 g и трижды промывали фосфатным буфером (рН 7,4) с 0,15 М NaCl. Клетки суспендировали в 10% водном растворе ДМСО и в течение 30 минут гомогенизировали. Гомогенат подвергали исчерпывающему диализу против дистиллированной воды в течение ночи против 0,05 М трис-НСl буфера с рН 7,4–7,6. Центрифугированием в течение 30 минут при 8000 g освобождались от обломков клеток. Полученный ДМСО-экстракт служил в дальнейшем исходным материалом для получения антигенных препаратов из *Mycobacterium tuberculosis*.

Для выделения антигенных фракций ДМСО-экстракты использовали различные подходы: экстракция растворителями при различных значениях рН, высаливание, а также метод гель-фильтрации.

На первом этапе очистки рН ДМСО-экстракта доводили до значения 3,5–4,0 уксусной кислотой и выдерживали в течение 24 часов при температуре 4 °С. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 20 минут. Осадок растворяли 0,05 М трис-НСl (рН 7,4–7,6) в 1/2 первоначального объема, ДМСО-экстракта рН доводили 2 М раствором NaOH до значения 7,4–7,6.

Способы получения антигенных препаратов *Mycobacterium tuberculosis*

Препараты	Способы фракционирования
А	Осадок ДМСО-экстракта после обработки уксусной кислотой (3,5–4,0)
Б	Супернатант из (А)
В	Препарат (А) + 30% этанола
Г	Препарат (Б) после доведения до рН-4,0
Д	Препарат (в) + 70% этанола
Е	Препарат (в) + (NH ₄) ₂ SO ₄

Иммуноблоты, полученные на материале осадка и супернатанта, представлены на рис. 1 (а и б соответственно). Их анализ показывает, что спектры серопозитивных фракций осадка и супернатанта мало чем отличаются между собой. В тоже время легко заметить индивидуальные различия в спектрах серопозитивных фракций, которые проявляются с сыворотками 4 больных туберкулезом. Наибольшая вари-

бельность по серологической активности наблюдается для белков, имеющих молекулярные массы 11–13,5; 15,5–22; 24,5–30 и 53 кДа. Что касается белков с молекулярной массой 45 кДа, то антиген к ним встречается во всех исследуемых сыворотках. Следует отметить, что белки с молекулярной массой 45 кДа более полно представлены в препаратах, полученных на основе супернатантов.

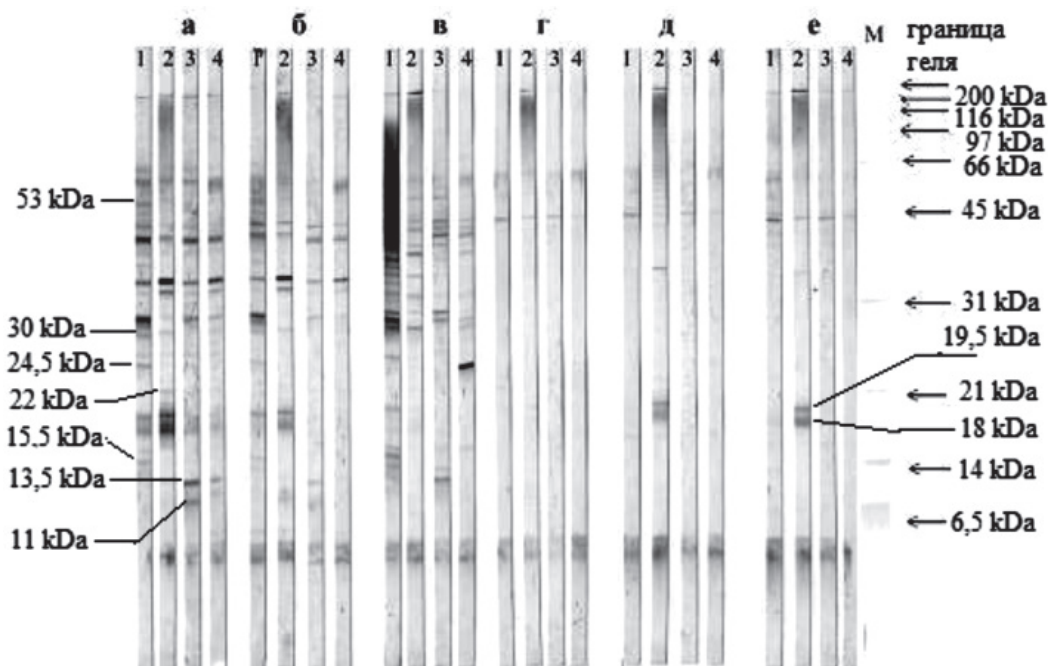


Рис. 1. Иммуноблотинги антигенных препаратов *Mycobacterium tuberculosis*, полученных разными способами, с сыворотками больных туберкулезом

Поэтому было проведено дополнительное осаждение супернатанта 30% этанолом. Из рис. 1, в видно полученные в результате осаждения этанола белки обладали выраженной серологической активностью. Обращает внимание тот факт, что сыворотка пациента № 1 весьма активно реагирует с фракциями в диапазоне М.м. 31 – 200 кДа, а сыворотка больного № 4 с белками мажорной фракции с М.М. 24,5 кДа.

Анализ антигенного спектра препарата Г свидетельствует о том, что большая доля серологической активности приходится на белки с низкой массой 6,5 кДа и на белки с молекулярной массой более 45 кДа.

В препаратах Д, полученных из того же супернатанта при внесении в него 70% этанола, спектр серопозитивных фракций мало отличался от антигенного спектра препарата Г. Исключение представлял спектр серопозитивных фракций пациента № 2. В его сыворотке присутствуют антитела, с которыми активно реагируют белки, имеющие молекулярную массу 18 и 19,5 кДа. Дополнительное осаждение сульфатом аммония не повлияло на антигенное состояние препарата.

Ввиду своеобразного распределения активности, которая в основном располагалась в области молекулярных масс более 45 кДа и менее 1 кДа, для дальнейшей очистки использовали метод гель-фильтрации.

Гель-фильтрацию сульфат-аммонийного осадка проводили на колонках 2×100 см с сефадексами G-200. Материал элюировался двумя пиками.

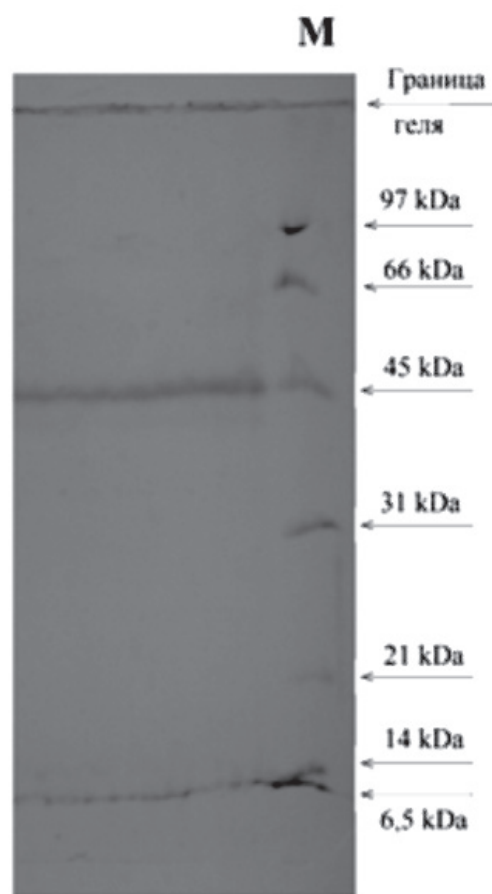


Рис. 2. Электрофорез антигенного препарата в 12,5% ПААГ (по Леммли). Локализацию белковых фракций выявляли, используя краситель Кумасси ярко-голубой G-250

На рис. 2 представлена электрофореграмма материала 1 пика, которая свидетельствует о достаточной однородности препарата. Следует отметить, что при окрашивании белков, фракционированных в геле, азотнокислым серебром обнаруживаются минорные фракции, на долю которых приходится менее 5% от общего количества белка.

На рис. 3 представлены иммуноблоты, полученные на материале первого пика с 24 сыворотками пациентов больных туберкулезом легких. Видно, что на всех иммуноблотах весьма четко представлена

одна серопозитивная фракция с молекулярной массой в 45 кДа.

Следует отметить, что в этом эксперименте использовали произвольно взятые сыворотки пациентов больных легочной формой туберкулеза. Данный результат предполагает, что на полученном антигене проявляется 100% чувствительность, что вызывает определенные сомнения. По литературным данным известно, что 100% противотуберкулезные антитела (ПТАТ) выявляются только при фиброзно-кавернозном туберкулезе и при бактериовыделении [10], во всех остальных формах туберкулеза процент выявляемости ПТАТ был значительно ниже.

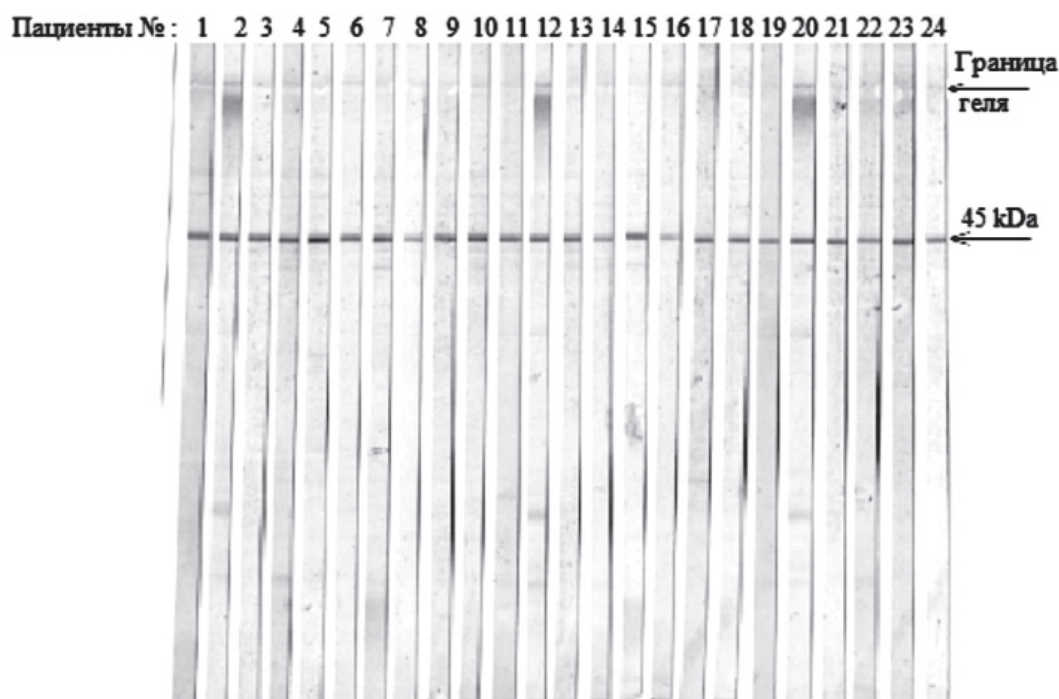


Рис. 3. Иммуноблоты, полученные на антигене 45 кДа с 24 сыворотками больных туберкулезом легких

Таким образом, в результате проведенной работы из клеток *M. tuberculosis* был получен антигенный препарат с молекулярной массой 45 кДа, который содержит менее 5% балластных белков. Предположительно этот антиген представляет собой гликопротеин, локализованный на поверхности бактериальной клетки. Данное предположение основывается на щадящем приеме обработки бактериальных клеток (10% водный раствор-ДМСО) и на сходстве молекулярных масс 45–47 кДа антигенного комплекса, описанного в статьях [5, 9].

Вывод

Предложен способ выделения серологических активных антигенных с молекуляр-

ной массой 45 кДа из *M. tuberculosis* штамм «Академия» включают обработку клеток 10% раствором ДМСО с осаждением и фракционированием супернатанта уксусной кислотой, этанолом и хроматографией на сефадефа g-200

Белок с молекулярной массой 45 кДа обладал выраженной серологической активностью в реакциях иммуноблотинга сыворотками больных с установленным диагнозом туберкулеза.

Список литературы

1. Адамбеков Д.А., Курманов Р.А., Баенский А.В., Литвинов В.И. Диагностическое значение изучения специфического противотуберкулезного иммунитета у больных при туберкулезе и другой легочной патологии. // Проблемы туберкулеза. – 1997. – № 3. – С. 20–22.

2. Гладкова С.Е., Решетников С.С., Пряхина В.Н. Опыт применения тест-системы «АТ-Туб-Бест» для диагностики туберкулеза. // *Новости «Вектор-Бест»*. – 2006. – № 4 (42). – С. 2–4.
3. Карпов А.В. Сравнительная эффективность раннего выявления туберкулеза иммунологическими методами // *Вестник Новгородского государственного университета*. – 1998.
4. Чуканов В.И., Слогодская Л.В. Особенности диагностики и эффективность лечения больных туберкулезом легких без бактериовыделения. // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. – 2007. – № 11. – С. 22–25.
5. Diagbouga S., Fumoux F., Zoubga A., Sanou P.T., Marchal G. Immunoblot analysis for Serodiagnosis of tuberculosis Using a 45/47- Kilodalton Antigen Complex of Mycobacterium tuberculosis. // *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology*. – 1997, May. – Vol. 4, № 3. – P. 334–338.
6. Houghton R.L., Lodes M.J., Dillon D.C., Reynolds L.D., day C.H., McNeill P.D., Hendrickson R.C., Skkeiky Y.A.W., Sampaio D.P., Bararo R., Lyashchenko K.P., Reed S.G. Use of Multi-epitope Polypeptides in Serodiagnosis of Active Tuberculosis. // *Clin diagn Lab Immunol*. – 2002 July. – № 9(4). – С. 883–891.5
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. – *Nature*, London, 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
8. Mukherjee S., Daifalla N., Zhang Y., Douglass J., Brooks L., Vedvick T., Houghton R., Reed S.G., Campos-neto A. Potential Serological Use of a Recombinant Protein That Is a Replica of a Mycobacterium tuberculosis Protein Found in the Urine of Infected Mice. // *Clin diagn Lab Immunol*. – 2004 March. – № 11(2). – P. 280–286
9. Roman F., Horn C., Pescher P., Namane A., Riviere M., Puzo G., Barzu O. and Marchal G. Deglycosylation of the 45/47 Kilodalton Antigen Complex of Mycobacterium tuberculosis Decreases Its Capacity To Elicit In Vivo or In Vitro Cellular Immune Responses // *Infection and Immunity*. – 1999. – Vol. 67, № 11. – P. 5567–5572.
10. Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350, 1979.
11. Waters W.R., Palmer M.V., Bannantine J.P., Whipple D.L., Greenwald R., Esfandiari J., Andersen P., McNair J., Pollock J.M., Lyashchenko K.P. Antigen recognition by serum antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis* // *Clin diagn Lab Immunol*. – 2004 September. – № 11(5). – P. 849–855.
3. Karpov A.V. Comparative effectiveness of early detection of tuberculosis by immunological methods // *Bulletin of the Novgorod State University*, 1998.
4. Chukanov V.I., Slogotskaya L.V. Features of diagnosis and effective treatment of patients with pulmonary tuberculosis without bacteria // *Problems of Tuberculosis and Lung Disease*, 2007, no. 11, pp. 22–25.
5. Diagbouga S., Fumoux F., Zoubga A., Sanou P.T., Marchal G. Immunoblot analysis for Serodiagnosis of tuberculosis Using a 45/47- Kilodalton Antigen Complex of Mycobacterium tuberculosis. // *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology*, 1997, May, Vol. 4 no. 3, pp. 334–338.
6. Houghton R.L., Lodes M.J., Dillon D.C., Reynolds L.D., day C.H., McNeill P.D., Hendrickson R.C., Skkeiky Y.A.W., Sampaio D.P., Bararo R., Lyashchenko K.P., Reed S.G. Use of Multi-epitope Polypeptides in Serodiagnosis of Active Tuberculosis. // *Clin diagn Lab Immunol*. 2002 July; 9(4): 883–891.5
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, London, 1970, Vol. 227, pp. 680–685.
8. Mukherjee S., Daifalla N., Zhang Y., Douglass J., Brooks L., Vedvick T., Houghton R., Reed S.G., Campos-neto A. Potential Serological Use of a Recombinant Protein That Is a Replica of a Mycobacterium tuberculosis Protein Found in the Urine of Infected Mice. // *Clin diagn Lab Immunol*. 2004 March; 11(2): 280–286
9. Roman F., Horn C., Pescher P., Namane A., Riviere M., Puzo G., Barzu O. and Marchal G. Deglycosylation of the 45/47 Kilodalton Antigen Complex of Mycobacterium tuberculosis Decreases Its Capacity To Elicit In Vivo or In Vitro Cellular Immune Responses // *Infection and Immunity*, 1999 V.67 № 11. P. 5567-5572..
10. Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350, 1979.
11. Waters W.R., Palmer M.V., Bannantine J.P., Whipple D.L., Greenwald R., Esfandiari J., Andersen P., McNair J., Pollock J.M., Lyashchenko K.P. Antigen recognition by serum antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis* // *Clin diagn Lab Immunol*. 2004 September; 11(5): 849–855.

References

1. Adambekov D.A., Kurmanov R.A., Baensky A.V., Litvinov V.I. Diagnostic value of the study of a specific anti-tuberculosis immunity in patients with tuberculosis and other lung diseases // *Problems of tuberculosis*. 1997, no. 3, p. 20–22.
2. Gladkov S.E., Reshetnikov S.S., Pryakhin V. Experience of using a test system «АТ-Туб-Бест» for the diagnosis of tuberculosis // *News «Vector-Best»* no. 4 (42) 2006, pp. 2–4.

Рецензенты:

Ильинская О.Н., д.б.н., профессор кафедры биохимии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань;

Коксин В.П., д.х.н., старший научный сотрудник лаборатории Республиканского центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Казань.

Работа поступила в редакцию 26.11.2012.