

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТВ10.4 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS В КЛЕТКАХ ESCHERICHIA COLI

И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, О.А. Добровольская, Е.Г. Богомолова,
Е.Н. Черняева, Р.И. Аль-Шехадат, А.С. Симбирцев

ФГУП Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. На сегодняшний день туберкулез является одним из самых распространенных и опасных заболеваний в мире. Туберкулез сегодня, как и в начале XX в. — основная причина смерти от инфекционных заболеваний, вызванных бактериальными агентами. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, в 2013 г. в мире туберкулезом заболело более 9 млн человек и около 1,5 млн заболевших погибло. Возбудителем туберкулеза является бактерия *Mycobacterium tuberculosis*, реже — родственные ей виды *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium africanum*. В основном в результате заражения бактериальная инфекция поражает легкие, однако возможно развитие заболевания и в других органах и тканях. На сегодняшний день эффективная вакцинация признана наиболее перспективной стратегией борьбы с туберкулезом. Однако на данный момент единственной зарегистрированной и разрешенной к применению противотуберкулезной вакциной является вакцина БЦЖ. В мире существует много разновидностей этой вакцины; все они производные одного штамма и незначительно различаются между собой по эффективности. Сомнительная эффективность вакцинации БЦЖ и побочные эффекты заставляют научное сообщество разрабатывать новые средства профилактики туберкулеза. Можно выделить ряд направлений разработки новых противотуберкулезных вакцин, одним из которых является создание субъединичных вакцин на основе рекомбинантных белков. Достоинства субъединичных вакцин заключаются в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могли бы вызвать нежелательные эффекты в организме. На данный момент идентифицирован ряд антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, перспективных для использования в качестве компонентов новых вакцин. Так, культуральный фильтрат *Mycobacterium tuberculosis* содержит иммунодоминантные секретируемые антигены, из которых одним из наиболее изученных является белок ТВ10.4. Белок ТВ10.4 специфичен для микобактерий, распознается на ранней стадии туберкулезной инфекции и способствует пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию IFN γ . Белок ТВ10.4 также обладает адьювантным действием при введении в комплексе с белками микобактерий. Учитывая эти свойства, рекомбинантный белок ТВ10.4 может быть использован для создания новых кандидатных вакцин против туберкулеза.

Ключевые слова: рекомбинантный ТВ10.4, вакцины, туберкулез, штамм-продуцент, культура клеток, способ очистки.

Адрес для переписки:

Духовлинов Илья Владимирович
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7,
ФГУП ГосНИИОЧБ ФМБА России.
Тел.: 8 (981) 881-82-01 (моб.).
E-mail: dukhovlinov@gmail.com

Contacts:

Il'ya V. Dukhovlinov
197110, Russian Federation, St. Petersburg, Pudozhskaya str., 7,
Research Institute of Highly Pure Biopreparations.
Phone: +7 (981) 881-82-01 (mobile).
E-mail: dukhovlinov@gmail.com

Библиографическое описание:

Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Добровольская О.А., Богомолова Е.Г., Черняева Е.Н., Аль-Шехадат Р.И., Симбирцев А.С. Получение рекомбинантного белка ТВ10.4 *Mycobacterium tuberculosis* в клетках *Escherichia coli* // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 315–322. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-315-322

Citation:

Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Dobrovolskaya O.A., Bogomolova E.G., Chernyaeva E.N., Al-Shekhadat R.I., Simbirtsev A.S. Production of recombinant TB10.4 *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 315–322. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-315-322

PRODUCTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* TB10.4 RECOMBINANT PROTEIN IN *ESCHERICHIA COLI*

Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Dobrovolskaya O.A., Bogomolova E.G., Chernyaeva E.N., Al-Shekhadat R.I., Simbirtsev A.S.

Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Nowadays tuberculosis is considered one of the most dangerous infectious diseases occurring everywhere, and it remains a cause of death of millions of people around the world. According to the World Health Organization data, in 2013 tuberculosis caused more than 9 million cases worldwide and about 1.5 million of infected people died. The causative agent of tuberculosis in most cases is *Mycobacterium tuberculosis*. But sometimes it can be *Mycobacterium bovis* or *Mycobacterium africanum*. Mainly as a result of infection, a bacterial infection affects the lungs, but the disease may develop in other organs and tissues. Now for the prevention of tuberculosis vaccination of newborns with attenuated vaccine BCG is widely used. The production of this vaccine is cheap and it is safe to use. Thus today, vaccination is the primary means of prevention of tuberculosis. However dubious efficacy and a number of side effects observed after vaccination, makes the scientific community to develop new effective methods for the treatment of tuberculosis. One of the ways to develop new vaccines against tuberculosis is to provide a subunit vaccine based on recombinant proteins. Advantages of subunit vaccines are that the preparation containing the purified protein is stable and secure, its chemical properties are known, it does not contain additional proteins and nucleic acids, which could cause undesirable effects in the human body. One of the most promising antigens for use as components in new vaccines is considered a low molecular weight secreted protein TB10.4. TB10.4 protein is recognized at an early stage of tuberculous infection and contributes to the proliferation of lymphocytes responsible for the production of IFN γ . TB10.4 protein also possesses an adjuvant effect when administered in combination with mycobacterial proteins. Given these properties, the recombinant protein TB10.4 can be used to generate new candidate vaccines against tuberculosis. During the study was created high-yield *E. coli* strain, which produces the recombinant protein TB10.4, selected the optimal protocol of induction of the gene encoding the protein. The protein was purified using metal affinity chromatography. The purity of the final preparation reached 98%.

Key words: recombinant TB10.4, vaccine, tuberculosis, producing strain, cell culture, purifying method.

Введение

Основной причиной смерти от инфекционных заболеваний сегодня, как и в начале XX в., является туберкулез [3]. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), туберкулезом ежегодно заболевает в мире около 9 млн человек, и около 1,5 млн заболевших умирает. Начиная с 90-х гг. XX в., в России произошло ухудшение эпидемической ситуации. По данным ФГБУ ЦНИИОИЗ МЗ РФ, в 2013 г. в Российской Федерации заболеваемость туберкулезом составила 63 случая на 100 тыс. населения, а смертность — 11,3 случая на 100 тыс. населения.

Возбудителем туберкулеза является патоген *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), реже — родственные ему виды *M. bovis* и *M. africanum*. Основным резервуаром и источником аэрогенной туберкулезной инфекции является бациллярный больной, выделяющий большое количество микобактерий с мокротой или слюной. Кроме того, заражение может происходить алиментарным путем — через употребление молока и молочнокислых продуктов от коров, пораженных *M. bovis*, или яиц от кур, инфицированных *M. avium*. Возможна и кон-

тактная передача инфекции через поврежденные кожные покровы, например, при доении больных животных. В результате аэрогенного заражения туберкулезный процесс чаще возникает в органах дыхания, при алиментарном инфицировании могут поражаться почки, легкие, кости и суставы, периферические лимфоузлы, мочеполовые органы, глаза, центральная нервная система. В зависимости от основных клинических проявлений различают легочную и нелегочные формы туберкулеза. Тем не менее, туберкулез легких остается наиболее распространенной и опасной формой заболевания [3].

Без лечения более половины случаев в течение 5 лет заканчиваются смертью. Если заболевание вызвано чувствительными к противотуберкулезным средствам штаммами микобактерий, правильно назначенное лечение практически всегда дает эффект. Однако в последние годы широкое распространение получили устойчивые к противотуберкулезным средствам штаммы микобактерий, лечение вызванного ими туберкулеза проходит крайне сложно. В связи с этим важным аспектом в борьбе с данным заболеванием является предупреждение развития заболевания — вакцинация [6].

В настоящее время для предупреждения туберкулеза широко используется вакцинирование новорожденных детей живой вакциной БЦЖ. БЦЖ представляет собой живой аттенуированный штамм *M. bovis*, сохранивший свои антигенные и иммуногенные свойства. Относительно невысокая стоимость производства этой вакцины и безопасность ее применения обеспечили широкое распространение вакцинирования как основного средства профилактики туберкулеза. Вакцинация БЦЖ в детском возрасте эффективна в отношении заболевания милиарной формой туберкулеза легких и туберкулезным менингитом. Однако в последние годы усиливаются сомнения относительно ее универсальности и эффективности. Необходимо отметить, что развитие туберкулеза на сегодняшний день выявляется не только у некачественно вакцинированных или невакцинированных детей, но и у лиц, которым вакцина БЦЖ была введена правильно и своевременно [2]. Завершенное 60-летнее изучение результатов вакцинации американских индейцев показало, что долгосрочная эффективность БЦЖ-вакцинирования составляет 52% [5]. Также следует отметить, что БЦЖ, подобно другим живым вакцинам, способна вызывать отрицательные побочные эффекты. Осложнения при вакцинации БЦЖ наблюдаются, в частности, у детей, инфицированных ВИЧ еще до рождения. Принципиальным недостатком вакцины БЦЖ является постепенное (в течение 3–7 лет) снижение поствакцинального иммунитета. Согласно результатам контролируемых исследований, это приводит к практически полному отсутствию защитного эффекта уже через 10 лет после вакцинации [11]. В то же время использование БЦЖ для ревакцинации, направленной на поддержание противотуберкулезного иммунитета, по данным экспертов ВОЗ, признается неэффективным [15], и это подтверждают результаты рандомизированного исследования, проведенного в Бразилии с участием более 300 тыс. школьников в возрасте от 7 до 14 лет [10].

Таким образом, к настоящему времени назрела необходимость разработки вакцин нового поколения как наиболее эффективных иммунопрофилактических средств борьбы с туберкулезом, в первую очередь с его легочной формой.

Одним из направлений разработки новых противотуберкулезных вакцин является создание субъединичных вакцин на основе рекомбинантных белков [3]. Субъединичными называют вакцины, которые содержат только отдельные компоненты патогенного микроорганизма,

эпитопы антигенов, активно распознаваемые иммунной системой. Достоинства субъединичных вакцин заключаются в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен, его физико-химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могли бы вызвать нежелательные эффекты в вакцинируемом организме [8].

К началу 2000 г. было получено несколько вариантов субъединичных вакцин, однако их протективный эффект при испытаниях оказался в ряде случаев непредсказуемым и сильно варьировал [13]. Изучение генома *M. tuberculosis* штамма H37Rv показало, что он содержит 3995 открытых рамок считывания, но лишь для 52% из них удалось предсказать функциональную активность. Анализ протеома позволил выявить не менее 1800 клеточных и 800 секретиромых белков [14].

Удалось идентифицировать ряд антигенов *M. tuberculosis*, перспективных для использования в качестве компонентов новых вакцин. К ним относятся, в частности, иммунодоминантные секретиромые антигены, присутствующие в культуральном фильтрате *M. tuberculosis*, среди которых наиболее изучены антигены семейства ESAT-6 (Early Secret Antigen Target-6). Специфические белки данного семейства обладают высокой иммуногенностью. Среди них наибольшую иммуногенность по уровню антиген индуцированного синтеза γ -интерферона (IFN γ) мононуклеарными клетками периферической крови доноров демонстрирует белок TB10.4 с молекулярной массой 10,4 kDa. Он распознается на ранней стадии туберкулезной инфекции и способствует пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию IFN γ . Белок TB10.4 также обладает адьювантным действием при введении в комплексе с белками микобактерий [1]. Учитывая эти свойства, белок TB10.4 является перспективным антигеном для разработки кандидатных вакцин против туберкулеза.

Наиболее эффективной системой для разработки рекомбинантных белковых антигенов является система экспрессии на основе клеток *E. coli*, которая и была выбрана в данном исследовании для получения рекомбинантного белка TB10.4 *Mycobacterium tuberculosis*.

Материалы и методы

Синтез и клонирование гена, кодирующего белок TB10.4. Синтез последовательности гена *tb10.4 M. tuberculosis* длиной 351 п.о. осуществляли методом ПЦР с использованием

перекрывающихся олигонуклеотидов [9], полученных с помощью синтезатора ДНК ASM-800 (БИОССЕТ, Россия). Последовательность гена соответствовала аналогичному гену *tb10.4* *M. tuberculosis* штамма H37Rv [4]. В общей сложности для синтеза гена *tb10.4* длиной 351 п.н. было использовано 13 праймеров. Синтезированную последовательность выделяли из агарозного геля после проведения электрофореза и клонировали в плазмидном векторе pGEM-T Easy. После секвенирования ген *tb10.4*, не содержащий замен, переклонировали в векторе pET28a(+) по сайтам рестрикции XhoI и NdeI. Данная плаزمида содержит в своем составе фрагмент, кодирующий полигистидин, находящийся в рамке трансляции на N-конце последовательности. Таким образом, любая клонированная в вектор нуклеотидная последовательность экспрессируется в виде белка, слитого с полигистидином для удобства его дальнейшей очистки с использованием иммобилизованной металлоаффинной хроматографии. Клонированный в плазмиде pET28a(+) ген *tb10.4* также секвенировали.

Создание штамма-продуцента белка TB10.4. Для экспрессии гена, кодирующего белок TB10.4, использовали клетки *E. coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, США) с генотипом F-ompT_hsdSB (rB-mB-)galdc_m rne131 (DE3), содержащие в геноме λDe3 лизоген и мутацию *rne131*. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности. Получать непротеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах позволяют *lon*- и *ompT*-мутации по генам протеаз. Трансформацию компетентных клеток плазмидой pET28a(+)*tb10.4* осуществляли методом электропорации.

Для быстрого скрининга рекомбинантных клонов *E. coli* на наличие плазмид pET28a(+)*tb10.4*, плазмидную ДНК выделяли из 2 мл культуры и анализировали электрофорезом в агарозном геле.

Для проверки наличия вставки в плаزمиде проводили реакцию ПЦР. Реакцию проводили в объеме 50 мкл. В качестве матрицы брали материал одной отдельной колонии размером около 1 мм. Реакцию проводили с помощью Taq-полимеразы с использованием праймеров T7 promoter primer, T7 terminator primer в термоциклере C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) в течение 35 циклов: 20 с при 95°C, 20 с при 50°C, 60 с при 72°C. Для достраивания образовавшихся цепей ДНК проводили допол-

нительный цикл: 5 мин при 72°C. Результат ПЦР анализировали электрофорезом в агарозном геле.

Индукция экспрессии гена *tb10.4*. Осуществляли подбор оптимального прокола индукции экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок TB10.4. Для этого проводили индукцию экспрессии гена с помощью изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) в трех концентрациях и при различных температурах.

Индукцию экспрессии гена ИПТГ осуществляли следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение ночи в LB среде (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый), содержащей канамицин в концентрации 25 мкг/мл. Разводили культуру свежей LB средой в 50 раз и выращивали в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин +37°C до достижения культурой клеток оптической плотности 0,6–0,8 оптических единиц при длине волны 600 нм. После этого осуществляли индукцию экспрессии целевого гена добавлением ИПТГ к культуре до конечной концентрации 0,1; 0,5 или 1 мМ. Затем инкубировали при определенной температуре в термостатированном шейкере роторного типа при 200 об./мин в течение ночи. Для подбора оптимального протокола индукции инкубировали культуру при +37°C, +25°C и при +16°C. После чего клетки концентрировали с помощью центрифугирования.

Далее отбирали аликвоту клеток для анализа. Контроль экспрессии осуществляли с помощью диск-электрофореза лизата клеток после индукции. Электрофорез клеточных лизатов проводили в 16%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) [12]. Осаждали лизат и анализировали растворимость белка: наносили супернатант и осадок на 16%-ный ПААГ и проводили электрофорез в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез).

Определение локализации целевого белка TB10.4. Клетки штамма-продуцента после индукции отмывали от питательной среды натрий-фосфатным буфером. Далее определяли локализацию целевого белка по следующей схеме. Клетки подвергали трем циклам соникации на льду по 30 с с перерывом в 2 мин. После этого клетки концентрировали центрифугированием при 10 000g в течение 20 мин. Далее отбирали аликвоты супернатанта и осадка

телец включения для анализа. Контроль осуществляли с помощью диск-электрофореза супернатанта и телец включения после солиubilизации. Электрофорез проводили в 16%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) [12].

Очистка рекомбинантного белка ТВ10.4. Очистку рекомбинантного белка ТВ10.4 проводили с использованием метода иммобилизованной металлоаффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-НТУ сефарозы [7]. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 6 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка. Клетки штамма-продуцента после индукции отмывали от питательной среды натрий-фосфатным буфером и лизировали с помощью 3 циклов соникации на льду по 30 с перерывом в 2 мин. После чего клетки концентрировали центрифугированием при 10 000g в течение 20 мин. Затем проводили солиubilизацию телец включения ресуспендированием осадка клеток в буфере, содержащем 500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0; 8 М мочевины; 500 мМ хлористый натрий; 10 мМ имидазол.

Колонку, содержащую Ni-НТУ сефарозу, предварительно уравнивали буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0; 8 М мочевины; 500 мМ хлористый натрий; 10 мМ имидазол). Солиubilизованные тельца включения наносили на колонку. Далее промывали колонку двумя объемами буфера для нанесения. После этого промывали колонку тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0; 8 М мочевины; 500 мМ хлористый натрий; 30 мМ имидазол). Элюировали белок с помощью 4 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатный буфер; рН 8,0; 8 М мочевины; 500 мМ хлористый натрий; 200 мМ имидазол). Собирали фракции по 1 мл, концентрацию белка в них определяли по методу Бредфорда. Далее материал анализировали с помощью диск-электрофореза в 16%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе [12].

Оценка чистоты полученного препарата белка после иммобилизованной металлоаффинной хроматографии. Электрофореграмма препарата белка ТВ10.4 была проанализирована с помощью программы ImageJ. Программа предназначена для денситометрического анализа данных различных экспериментов. В ручном режиме были размечены дорожки, затем отмечены полосы, соответствующие белкам в рам-

ках каждой из дорожек. Программа оценивает плотность каждой из полос за вычетом фона, что позволяет рассчитать чистоту целевого белка.

Результаты

Создан высокопродуктивный штамм-продуцент рекомбинантного белка ТВ10.4 *M. tuberculosis* на основе клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных вектором рЕТ28a(+)*tb10.4*.

Рассчитанная молекулярная масса белка ТВ10.4 составила 12,5 kDa, рI 6.02. Молекулярная масса полученного белка совпала с расчетной.

Подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гена *tb10.4*. Экспрессия гена индуцируется при использовании индуктора ИПТГ во всех трех исследуемых концентрациях (0,1; 0,5 или 1 мМ).

При этом важной особенностью является то, что индукция наблюдается только при инкубации культуры клеток с индуктором в течении ночи при +16°C, а при температурах +37°C и +25°C индукции экспрессии гена не происходит.

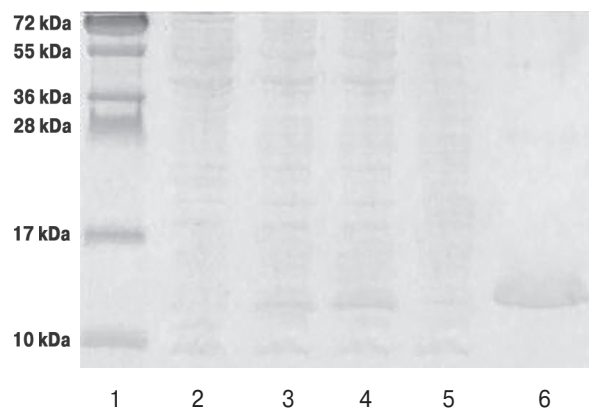


Рисунок 1. Электрофореграмма результатов индукции экспрессии гена *tb10.4* с использованием 0,1 мМ ИПТГ; результатов определения локализации белка ТВ10.4; результатов очистки белка ТВ10.4

- 16% ПААГ; 0,1% ДДС-Na
1. Маркер молекулярного веса (Fermentas).
 2. Лизат клеток штамма-продуцента до индукции.
 3. Лизат клеток штамма-продуцента после индукции с использованием 0,1 мМ ИПТГ.
 4. Тельца включения.
 5. Супернатант.
 6. Высокоочищенный препарат рекомбинантного белка ТВ10.4, полученный после проведения металлоаффинной хроматографии.

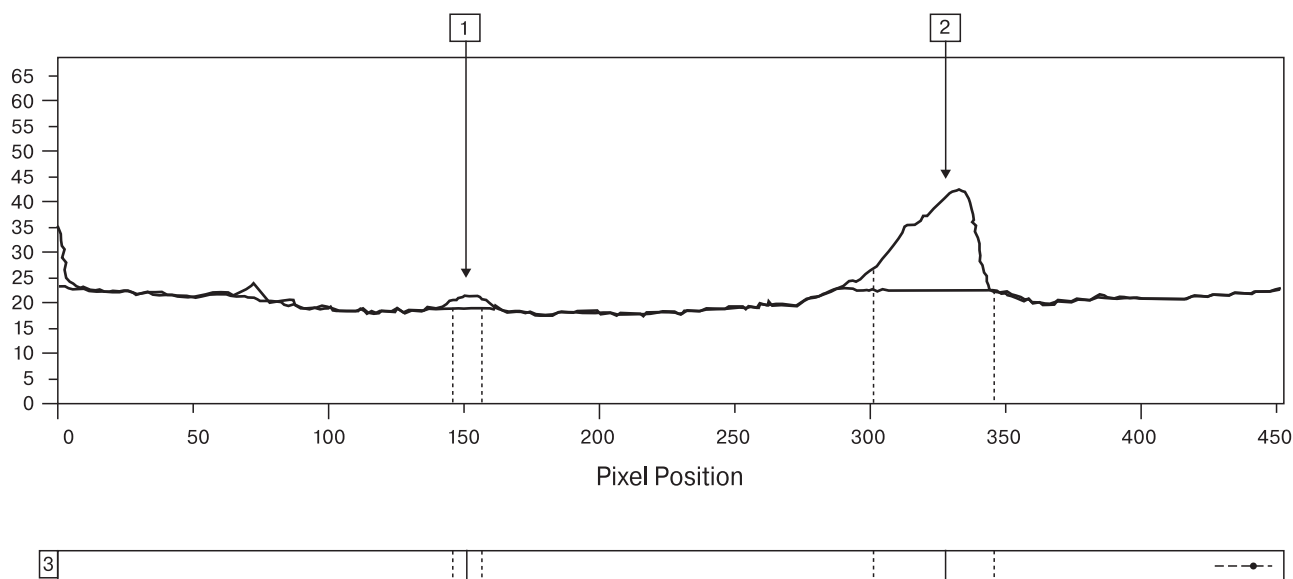


Рисунок 2. Денситограмма результатов анализа электрофореграммы высокоочищенного препарата рекомбинантного белка ТВ10.4 в программе ImageJ

При изучении динамики биосинтеза рекомбинантного белка ТВ10.4 в клетках штамма-продуцента выявили максимальный уровень экспрессии гена *tb10.4* после индукции экспрессии 0,1 мМ ИПТГ при температуре +16°C, который составил 15% от общего количества клеточного белка. При анализе локализации белка ТВ10.4 было показано, что белок находится в тельцах включения (рис. 1). Это обусловило выбор способа очистки белка в денатурирующих условиях.

Получен высокоочищенный рекомбинантный белок ТВ10.4 с использованием металлоаффинной хроматографии с сорбентом Ni-НТУ сефарозой. По результатам денситометрического анализа электрофореграммы с помощью программы ImageJ рассчитали, что чистота целевого белка составляет 95,9% (рис. 2).

Использование созданного штамма и выбранного протокола индукции позволяет получить до 50 мг высокоочищенного белка ТВ10.4 из 1 л питательной среды.

Обсуждение

В настоящее время основным средством профилактики туберкулеза является вакцинирование детей аттенуированной вакциной БЦЖ. Показано, что вакцина БЦЖ имеет ряд недостатков, которые дают основание сомневаться в ее универсальности и эффективности. В то же время эффективная вакцинация, направленная на предупреждение формирования «открытых» форм туберкулеза, является важнейшим фактором, ограничивающим

распространение инфекции. Таким образом, необходимость разработки и создания принципиально новых, безопасных иммунопрофилактических и терапевтических средств является приоритетной задачей.

Проблема создания безопасной и простой в производстве и использовании вакцины против туберкулеза, имеющей низкую стоимость, может быть решена за счет использования высокоочищенного рекомбинантного белка или смеси белков. Ввиду этого, использование высокоочищенных рекомбинантных белков, полученных в клетках *E. coli*, в качестве активного вещества вакцины, является наиболее перспективным вариантом. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением в организм живого бактериального штамма, пусть и аттенуированного. Также выбранный белок не несет функций природного белка и, соответственно, не может вызывать побочных эффектов, характерных для вакцин, полученных с использованием живых аттенуированных бактерий.

Показано, что среди антигенов *M. tuberculosis* с протективной активностью центральное место занимают секретируемые белки. Белок ТВ10.4 является секретируемым белком, а также обладает адьювантным действием при введении в комплексе с белками микобактерий, что позволяет рассматривать данный белок в качестве перспективного агента для создания противотуберкулезной вакцины.

Целью исследования являлось получение высокоочищенного рекомбинантного белка

ТВ10.4. Для ее достижения был произведен ряд действий: получен ген, кодирующий рекомбинантный белок ТВ10.4, создан вектор рЕТ28a(+)*tb*10.4, создан высокопродуктивный штамм *E. coli* BL21(DE3)*p*ЕТ28a(+)*tb*10.4 — продуцент рекомбинантного белка ТВ10.4. В работе использовался ген, оптимизированный по кодоновому составу, что увеличило уровень экспрессии. Далее был подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гена, кодирующего белок ТВ10.4, обеспечивающий высокий выход белка при наименьших затратах. Была наработана биомасса, содержа-

щая рекомбинантный белок ТВ10.4, белок был очищен с использованием металлоаффинной хроматографии.

Таким образом, нами был получен высокопродуктивный штамм-продуцент белка ТВ10.4, разработан оптимальный протокол индукции экспрессии целевого гена и способ очистки рекомбинантного белка, который позволяет получать до 50 мг высокоочищенного белка ТВ10.4 из 1 л культуральной среды. Полученный белок может быть использован в качестве компонента кандидатной вакцины против туберкулеза.

Список литературы/References

1. Поливалентные вакцины, содержащие рекомбинантные вирусные векторы: пат. 012037 США: МПК C12N 7/01, C12N 15/34, C12N 15/31, C12N 15/861, A61K 39/04 / Хавенга М.Я.Э. (Нидерланды), Вогелс Р. (Нидерланды), Седофф Д. (США), Хоун Д. (США), Скейки Я.А.В. (США), Радошевич К. (Нидерланды); заявитель и патентообладатель Круселл Холланд Б.В. (Нидерланды), Эйрас Глоубал Тиби Вэксин Фаундейшн (США); патент. поверенный Медведев В.Н. (Россия). — № 200701084, заявл. 2005.11.15, опубл. 2006.05.26. [*Polivalentnye vaksiny, soderzhashchie rekombinantnye virusnye vektory* [Polyvalent vaccines containing recombinant viral vectors]: *pat.* 012037 США: МПК C12N 7/01, C12N 15/34, C12N 15/31, C12N 15/861, A61K 39/04 / Khavenga M.Ya.E. (Netherlands), Vogels R. (Netherlands), Sedoff D. (USA), Khoun D. (USA), Skeiki Ya.A.V. (USA), Radoshevich K. (Netherlands); applicant and patentee Krusell Kholand B.V. (Netherlands), Eiras Global Tibi Vexin Foundation (USA); patent attorney Medvedev V.N. (Russia). — № 200701084, Appl. 2005.11.15, publ. 2006.05.26. (*In Russ.*)]
2. Стукова М.А., Заболотных Н.В., Виноградова Т.И., Гергерт В.Я., Апт А.С., Капрельянц А.С., Ерохин В.В., Яблонский П.К., Киселев О.И. Профилактика туберкулеза: современные подходы к разработке противотуберкулезных вакцин // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. № 11. С. 45–52. [Stukova M.A., Zabolotnykh N.V., Vinogradova T.I., Gergert V.Ya., Apt A.S., Kaprel'yants A.S., Erokhin V.V., Yablonskii P.K., Kiselev O.I. Prevention of tuberculosis: current approaches to development of vaccines. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, no. 11, pp. 45–52. (*In Russ.*)]
3. Татьков С.И., Дейнеко Е.В., Фурман Д.П. Перспективы создания противотуберкулезных вакцин нового поколения // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 15, № 1. С. 114–129. [Tat'kov S.I., Peineko E.V., Furman D.P. Prospects for designing a new generation of anti-tuberculosis vaccine. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2011, vol. 15, no. 1, pp. 114–129. (*In Russ.*)]
4. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, vol. 393, no. 6685, pp. 537–544.
5. Haile M., Källenius G. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2005, vol. 18, no. 3, pp. 211–215.
6. Iem V., Somphavong S., Buisson Y., Steenkeste N., Breyse F., Chomarat M., Sylavanh P., Nanthavong P., Rajoharison A., Berland J.L., Paboriboune P. Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to antibiotics in Lao PDR: first multicentric study conducted in 3 hospitals. *BMC Infect. Dis.*, 2013, vol. 13, no. 1, 275 p. doi: 10.1186/1471-2334-13-275
7. Invitrogen. Ni-NTA purification system. User manual. Catalog nos. K950-01, K951-01, K952-01, K953-01, K954-01, R901-01, R901-10, R 901-15. Version C. 25-0496, 2006, 32 p.
8. Lindenstrøm T., Agger E.M., Korsholm K.S., Darrah P.A., Aagaard C., Seder R.A., Rosenkrands I., Andersen P. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182, no. 12, pp. 8047–8055. doi: 10.4049/jimmunol.0801592
9. Majumder K. Ligation-free gene synthesis by PCR: synthesis and mutagenesis at multiple loci of a chimeric gene encoding OmpA signal peptide and hirudin. *Gene*, 1992, vol. 110, no. 1, pp. 89–94. doi: 10.1016/0378-1119(92)90448-X
10. Rodrigues L.C., Pereira S.M., Cunha S.S., Genser B., Ichihara M.Y., de Brito S.C., Hijjar M.A., Dourado I., Cruz A.A., Sant'Anna C., Bierrenbach A.L., Barreto M.L. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomised trial. *Lancet*, 2005, vol. 366, no. 9493, pp. 1290–1295. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67145-0
11. Russell D.G., Barry C.E., Flynn J.L. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. *Science*, 2010, vol. 328, no. 5980, pp. 852–856. doi: 10.1126/science.1184784
12. Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 166, no. 2, pp. 368–379.
13. Sharma A.K., Khuller G.K. Recombinant mycobacterial proteins future directions to improve protective efficacy. *Indian J. Exp. Biol.*, 2001, vol. 39, no. 12, pp. 1214–1219.

14. Skjot R.L.V., Oettinger T., Rosenkrands I., Ravn P., Brock I., Jacobsen S., Andersen P. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, no. 1, pp. 214–220. doi: 10.1128/IAI.68.1.214-220.2000
15. WHO. BCG vaccine. *WHO Wkly Epidemiol. Rec.*, 2004, vol. 79, no. 4, pp. 27–38.

Авторы:

Духовлинов И.В., к.б.н., начальник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Федорова Е.А., научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Добровольская О.А., младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Богомолова Е.Г., младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Черняева Е.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Аль-Шехадат Р.И., к.б.н., зам. начальника лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Симбирцев А.С., д.м.н., профессор, директор ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Fedorova E.A., Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Dobrovolskaya O.A., Junior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Bogomolova E.G., Junior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Chernyaeva E.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Al-Shekhadat R.I., PhD (Biology), The Deputy Head, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.05.2015
Отправлена на доработку 15.06.2015
Принята к печати 17.08.2015

Received 25.05.2015
Revision received 15.06.2015
Accepted 17.08.2015