

А.Ю.Гончарова, Н.И.Микшис, О.М.Кудрявцева, М.Ф.Болотникова, Л.В.Новикова,
Г.Г.Красичков, Т.В.Аленкина, Ю.А.Попов

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К БЕЛКАМ S-СЛОЯ *B. ANTHRACIS* И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СПЕЦИФИЧНОСТИ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Получены очищенные препараты белков S-слоя возбудителя сибирской язвы – Sap и EA1. Разработана схема иммунизации лабораторных животных, позволившая получить поликлональные кроличьи антитела к белкам Sap и EA1 в высоком титре. В твердофазном иммуноферментном анализе и дот-иммуноанализе с использованием поликлональных анти-Sap и анти-EA1 антител протестировано 12 штаммов сибиреязвенного микроба, 53 штамма близкородственных бацилл и 4 штамма других гетерогенных бактерий. При изучении специфичности полученных антител выявлены перекрестные взаимодействия с отдельными штаммами *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mycoides* и *B. megaterium*. Специфичность поликлональных анти-EA1 и анти-Sap антител составила 75 и 83 % соответственно. Чувствительность реакции при использовании поликлональных антител к белкам S-слоя *B. anthracis* составила 10^5 – 10^6 м.кл.

Ключевые слова: *B. anthracis*, поликлональные антитела, S-слой, белки Sap и EA1, иммуноферментный анализ.

Сибирская язва – острое зооантропонозное заболевание, широко распространенное во многих странах мира, в том числе на территории России. Способность возбудителя этой инфекции – *Bacillus anthracis* – к спорообразованию позволяет ему длительное время сохраняться в жизнеспособном состоянии в окружающей среде, создавая постоянную угрозу возникновения эпизоотий и эпидемий сибирской язвы. Кроме того, не исключена вероятность использования спор *B. anthracis* для биотеррористических актов. Рассылка в США в 2001 г. контаминированной спорами *B. anthracis* корреспонденции привела к заболеванию одиннадцати и гибели пяти человек от легочной формы сибирской язвы. Все это определяет актуальность исследований, направленных на совершенствование диагностики сибиреязвенной инфекции.

Основой экспериментальных иммунодиагностических тест-систем, предназначенных для выявления возбудителя сибирской язвы, чаще всего служат антитела к споровым антигенам или к компонентам сибиреязвенного токсина [1, 6, 9]. Использование протеомного анализа позволило установить, что наряду с классическими антигенами, у возбудителя сибирской язвы серологической активностью обладают около 50 белков [5]. Среди них присутствуют и белки поверхностного S-слоя *B. anthracis* – Sap и EA1. Синтез компонентов S-слоя детерминируется генами, расположенными на хромосоме *B. anthracis*, в отличие от сибиреязвенного токсина, кодируемого плазмидными генами. Установлено, что Sap и EA1 последовательно присутствуют на клеточной поверхности. В процессе роста возбудителя сибирской язвы происходит саморегулируемое переключение от Sap-S-слоя к EA1-S-слою [7, 8].

Целью исследования было получение белков S-слоя, а также поликлональных антител к ним и оценка возможности их использования в конструировании диагностических препаратов.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовали 12 штаммов сибиреязвенного микроба, 53 штамма близкородственных бацилл (*B. cereus* – 9 штаммов, *B. subtilis* – 15, *B. thuringiensis* – 15, *B. mycoides* – 2, *B. megaterium* – 6, *B. mesentericus* – 4 и *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* – по 1) и по 1 штамму *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhi* и *Francisella tularensis*. Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (Саратов) и Государственного института стандартизации и контроля им. Л.А.Тарасевича (Москва).

Питательные среды. В качестве питательных сред для выращивания бактериальных штаммов использовали L-бульон и агар, (Difco, США). Для выделения белков S-слоя штаммы *B. anthracis* выращивали на оригинальной среде (S-бульоне), предложенной J.Farchaus *et al.* [4] и содержащей (г/л): триптон – 33,0; дрожжевой экстракт – 20,0; L-гистидин – 2,0; натрия хлорид – 7,4; Na_2HPO_4 – 8,0; KH_2PO_4 – 4,0; глюкозу – 2,0 (pH 7,4).

Лабораторные животные. В работе использовали кроликов массой от 2 до 2,5 кг.

Получение антигенов S-слоя сибиреязвенного микроба. Выделение и очистку Sap проводили согласно процедуре, описанной J.Farchaus *et al.* [4].

Выделение EA1 проводили по модифицированной методике J.Ezzell и G.Abshire [3]. Штаммы *B. anthracis* выращивали 16 ч с аэрацией при температуре 37 °C в S-бульоне. Бульонные культуры центрифугировали в течение 30 мин при 10000 об/мин и температуре 5 °C. Клеточную массу ресуспендировали до 0,1 г/мл в экстрагирующем SDS-буфере, содержащем 5 ммоль трис-гидрохлорида, 5 ммоль 2-меркаптоэтанола и 1 % SDS (pH 9,8) и прогревали на водяной бане 30 мин при температуре 70 °C. После центрифугирования супернатант фильтровали

через мембранные фильтры (Millipore, США) с диаметром пор 0,22 мкм. Очистку экстракта проводили хроматографически с использованием в качестве носителя гидроксиапатита (Sigma, США). Элюцию белка EA1 проводили градиентом концентрации фосфата фосфатно-солевого буфера. На последнем этапе препарат диализовали против бидистиллированной воды в течение ночи при температуре 4 °С.

Получение поликлональных антител. Иммунизацию кроликов для получения иммунных сывороток к белкам S-слоя сибиреязвенного микроба проводили по трем схемам. Схема 1 [4]: антигены S-слоя вводили кроликам внутримышечно в дозе 100 мкг с полным адьювантом Фрейнда (в объемном соотношении 1:1) трехкратно. Интервал между первой и второй иммунизацией составил 4 недели, между второй и третьей – 5 сут. Схема 2: антигены вводили кроликам дважды внутримышечно с полным адьювантом Фрейнда и трижды внутривенно в количестве 100 мкг на одну инъекцию с недельными интервалами. Схема 3: очищенные белки в возрастающих дозах (40–60–80–100–120 мкг) вводили кроликам дважды внутримышечно с полным адьювантом Фрейнда и 5 раз внутривенно с недельными интервалами. Титр специфических антител определяли в твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА). Выделение специфических антител из иммунных сывороток осуществляли путем трехкратного осаждения насыщенным раствором сульфата аммония. Полученные иммуноглобулины освобождали от солевых примесей диализом против 0,9 % раствора натрия хлорида в течение ночи при температуре 4 °С.

Постановка иммуноферментных реакций. Для получения супернатантов штаммы выращивали в L-бульоне в течение 16 ч с аэрацией при температуре 37 °С (до концентрации $1 \cdot 10^8$ м.кл./мл). Клетки осаждали центрифугированием в течение 30 мин при скорости вращения ротора 10000 об/мин и температуре 4 °С, а супернатанты стерилизовали через мембранные фильтры (Millipore, США) с диаметром пор 0,22 мкм. Для проведения дот-иммуноанализа препараты супернатантов или микробных взвесей в концентрации $1 \cdot 10^8$ м.кл./мл (по стандарту мутности) наносили по 3 мкл в десяти- или двукратных разведениях на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C (Amersham, США) и инкубировали в растворе 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). Затем мембрану последовательно инкубировали с кроличьими антителами к соответствующему антигену в разведении 1:200, с мечеными пероксидазой антителами диагностическими против кроличьих иммуноглобулинов (Медгамал, Россия) в разведении 1:1000. Окрашивали мембрану раствором диаминобензидина в течение 30 мин, после чего проводили учет реакции.

Для постановки ТИФА в каждый ряд 96-луночного планшета вносили по 100 мкл исследуемых супернатантов или бактериальных взвесей. После периода инкубации проводили блокировку свободных

сайтов 1 % раствором БСА. Затем в лунки последовательно вносили двукратные разведения кроличьих антител к соответствующим антигенам и меченные пероксидазой антитела диагностические против кроличьих иммуноглобулинов (Медгамал, Россия) в разведении 1:1000. В качестве хромогенного субстрата применяли ортофенилендиамин. Результаты регистрировали с помощью спектрофотометра Multiskan Plus Version 2.01 при длине волны 492 нм.

Результаты и обсуждение

Паракристаллический S-слой сибиреязвенного микроба состоит из двух протеинов – Sap и EA1. Белок Sap синтезируется на начальных стадиях роста микроорганизма, затем в паракристаллической решетке происходит его замещение на EA1, сопровождающееся выделением Sap в супернатант. Белок EA1, напротив, прочно связан с клеточной стенкой и в культуральном фильтрате не обнаруживается [8]. Различия в механизме продукции компонентов S-слоя обусловило различные подходы к выбору штаммов-продуцентов и выделению интересующих нас протеинов.

Ранее нами было установлено, что бесплазмидные производные штаммов *B. anthracis* различаются по способности к продукции белка Sap [2]. Из девяти тестированных бесплазмидных культур сибиреязвенного микроба активными продуцентами белка Sap являются только четыре, в том числе производные штаммов *B. anthracis* Sterne 34F2, *B. anthracis* 71/12. Ввиду подверженности протеинов S-слоя сибиреязвенного микроба протеолитической дегградации, в их популяциях селектированы протеазодефицитные варианты – *B. anthracis* 71/12pfPrt[–] и *B. anthracis* Sterne ΔTPrt[–]. Данные штаммы по результатам электрофоретических исследований являются эффективными источниками белка Sap, они не синтезируют капсулу и токсин, характеризуются низкой активностью протеолитических ферментов.

Для выделения белка Sap S-слоя сибиреязвенного микроба культуру *B. anthracis* 71/12pfPrt[–] засекали в S-бульон и инкубировали при температуре 37 °С с аэрацией в течение 18 ч. Клеточную массу осаждали центрифугированием, супернатанты фильтровали. Хроматографическую очистку проводили с использованием различных носителей – сефарозы CL-4B, Macro Prep 50Q и гидроксиапатита. Выход белкового продукта составил 60–80 мг Sap на 1 л исходной культуры.

Для выделения белка EA1 использовали штамм *B. anthracis* СТИΔТ, обладающий сниженной активностью протеаз. Его культуру выращивали в S-бульоне при температуре 37 °С с аэрацией в течение 16 ч. Микробную взвесь центрифугировали, клеточную массу ресуспендировали в экстрагирующем SDS-буфере и прогревали при температуре 70 °С. Образовавшийся экстракт клеточных стенок фильтровали и диализовали. Очищенный препарат EA1

получали при помощи ионообменной хроматографии на гидроксипатите. Выход составил около 80 мг протеина EA1 на 1 л исходной культуры.

Протеины, выделенные из штаммов *B. anthracis* 71/12pfPr⁺ и *B. anthracis* СТИАТ, были охарактеризованы по молекулярной массе, формируемым паракристаллическим ультраструктурам, аминокислотному составу и расположению на клеточной поверхности и идентифицированы как компоненты S-слоя сибиреязвенного микроба – Sap и EA1.

На следующем этапе оптимизировали схему иммунизации лабораторных животных для получения поликлональных антител к белкам S-слоя. Первоначально антигены S-слоя вводили кроликам внутримышечно в дозе 100 мкг с полным адъювантом Фрейнда трехкратно с интервалами 4 недели и 5 сут, как было предложено J.Farchaus *et al.* [4] (рисунок, схема 1). Титры антител к протеинам S-слоя в ИФА составили 1:256 – 1:512. Изменение графика иммунизаций за счет дополнительных внутривенных инъекций препаратов и сокращение интервалов между ними до 1 недели позволило увеличить титр сывороток до 1:2000 (рисунок, схема 2). Наилучшей же оказалась следующая схема: семикратная иммунизация кроликов с интервалом в одну неделю возрастающими дозами белковых препаратов (от 40 до 120 мкг). Первые две инъекции осуществлялись внутримышечно, остальные – внутривенно. Разработанная методика позволила получить кроличьи антитела к белкам Sap и EA1 с титрами – 1:4000 – 1:8000 (рисунок, схема 3).

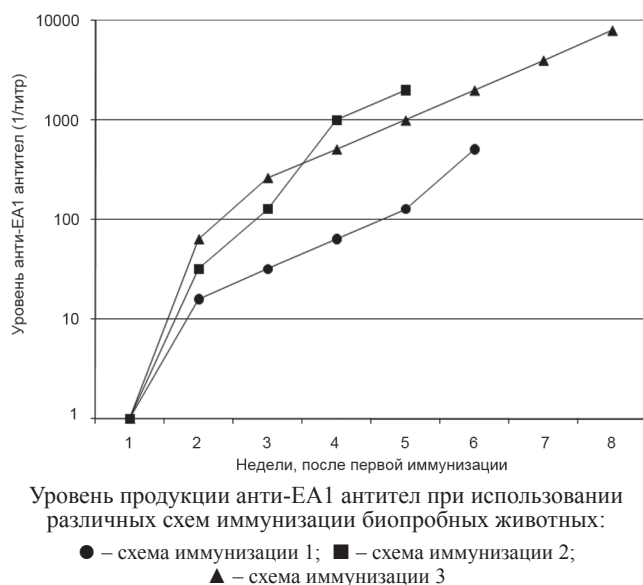
Специфичность поликлональных антител к белкам S-слоя изучали в ИФА с культурами *B. anthracis* и близкородственных бактериальных видов: *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, а также гетерологичных микроорганизмов: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *F. tularensis* и *S. typhi*. Для постановки реакций использовали бактериальные взвеси, начиная от максимальной концентрации $1 \cdot 10^8$ м.кл./мл. Учитывая то обстоятельство, что бе-

лок Sap выделяется в процессе роста сибиреязвенного микроба в среду культивирования, тестировали не только взвеси, но и супернатанты исследуемых штаммов, выращенных до той же концентрации микробных клеток.

При проведении дот-анализа отмечали положительную реакцию взаимодействия поликлональных анти-EA1 антител возбудителя сибирской язвы со штаммами *B. anthracis* и отрицательную – со штаммами *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *F. tularensis* и *S. typhi*. Тестирование бактериальных взвесей близкородственных видов (таблица) в трех случаях выявило выраженные перекрестные реакции. Штаммы *B. cereus* 96, *B. subtilis* 35, *B. mesentericus* 5 реагировали с антителами к EA1 до концентраций, определенных для культур сибиреязвенного микроба – $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ м.кл./мл. Неспецифические взаимодействия до концентрации $1 \cdot 10^7$ м.кл./мл обнаруживали еще у 4 штаммов *B. cereus*. Отдельные штаммы *B. subtilis* – 2, *B. mycoides* – 1 и *B. megaterium* – 2 давали положительную реакцию только в концентрации $1 \cdot 10^8$ м.кл./мл. При использовании взвесей бациллярных штаммов специфичность полученных поликлональных кроличьих антител к белку EA1 по данным ИФА составила около 75 %. В случаях постановки дот анализа с поликлональными анти-Sap антителами показатель специфичности оказался несколько выше – 83 %. Взаимодействие белков S-слоя сибиреязвенного микроба как с анти-Sap, так и с анти-EA1 антителами объясняется наличием у них высокомолекулярных участков аминокислотных последовательностей [7]. Чувствительность реакций находилась в пределах $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ м.кл./мл.

Тестирование полученных поликлональных антител в ИФА (ИФА, дот-анализ) с использованием супернатантов бактериальных штаммов выявило перекрестные взаимодействия лишь у 4 штаммов *B. cereus* и 1 *B. subtilis*, что составляет около 10 % от общего числа штаммов близкородственных бактериальных видов, взятых в эксперимент (таблица).

Таким образом, из штаммов-продуцентов белков S-слоя – *B. anthracis* 71/12pfPr⁺ и *B. anthracis* СТИАТ выделены и очищены препараты белков Sap и EA1. С помощью разработанной схемы иммунизации получены поликлональные кроличьи антитела к белкам Sap и EA1 в высоком титре. В ИФА с поликлональными анти-Sap и анти-EA1 антителами протестировано 69 штаммов различных бактериальных видов, преимущественно бациллярных. Перекрестные реакции выявлены для отдельных штаммов *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mycoides* и *B. megaterium*. Специфичность поликлональных антител к белкам S-слоя возбудителя сибирской язвы в дот-анализе с различными микробными взвесями составила от 75 до 83 %, в зависимости от используемых антител. При исследовании супернатантов у 10 % всех тестированных бациллярных штаммов отмечены перекрестные взаимодействия антигенов с анти-Sap и анти-EA1 антителами.



Результаты исследования в дот-анализе штаммов близкородственных бактериальных видов с поликлональными антителами к белкам S-слоя

Штаммы близкородственных бактериальных видов	Антитела к белку EA1		Антитела к белку Sap		Штаммы близкородственных бактериальных видов	Антитела к белку EA1		Антитела к белку Sap	
	супернатант	взвесь	супернатант	взвесь		супернатант	взвесь	супернатант	взвесь
<i>B. cereus</i>					<i>B. thuringiensis</i>				
569	-	+	-	-	482/3	-	-	-	-
др-7	-	-	-	-	8a	-	-	-	-
336	-	-	-	-	15a	-	-	-	-
8	+	+	-	+	351	-	-	-	-
96	+	+	+	+	2090	-	-	-	-
104	+	+	+	+	19/31	-	-	-	-
108	+	+	+	+	482/7	-	-	-	-
1	-	-	-	-	35 v.galeriae	-	-	-	-
687 var.alb.	-	-	-	-	17/5	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>					48	-	-	-	-
35	+	+	+	+	toumanoffi	-	-	-	-
36	-	-	-	-	13M v.galeriae	-	-	-	-
38	-	-	-	-	10M v.finitimus	-	-	-	-
37	-	+	-	+	10B v.finitimus	-	-	-	-
168	-	-	-	-	tompsoni 11M	-	-	-	-
430	-	-	-	-	<i>B. megaterium</i>				
350	-	-	-	-	5	-	+	-	+
33	-	-	-	-	2	-	-	-	-
IE-20	-	-	-	-	3	-	+	-	-
IE-21	-	+	-	-	6	-	+	-	+
IE-26	-	-	-	-	654	-	-	-	-
IE-4	-	-	-	-	1	-	-	-	-
BD366	-	-	-	-	<i>B. mesentericus</i>				
BD407	-	-	-	-	5	-	+	-	+
WB600	-	-	-	-	6	-	-	-	-
<i>B. mycoides</i>					66	-	-	-	-
2	-	-	-	-	1277	-	-	-	-
10	-	+	-	-	<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	+
<i>B. stearothermophilus</i>	-	-	-	-					

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бондарев В.П., Филиппов А.В., Дармов И.В. и др. Разработка иммуноферментной моноклональной тест-системы для обнаружения протективного антигена *Bacillus anthracis*. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1 (93):66–69.
- Микуш Н.И., Корсакова А.Ю., Болотникова М.Ф. и др. Продукция белков S-слоя штаммами *Bacillus anthracis*. Биотехнология. 2004; 5:22–33.
- Ezzell J., Abshire T. Immunological analysis of cell-associated antigens of *Bacillus anthracis*. Infect. Immun. 1988; 56(2):349–356.
- Farchaus J., Ribot W., Downs M., Ezzell J. Purification and characterization of the major surface array protein from the avirulent *Bacillus anthracis* Delta Sterne-1. J. Bacteriol. 1995; 177(9):2481–2489.
- Gat O., Grosfeld H., Ariel N. Search for *Bacillus anthracis* potential vaccine candidates by a functional genomic-serologic screen. Infect. Immun. 2006; 74 (7):3987–4001.
- Mabry R., Brasky K., Geiger R. et al. Detection of anthrax toxin in the serum of animals infected with *Bacillus anthracis* by using engineered immunoassays. Clin. Vaccine Immunol. 2006; 13(6):671–677.
- Mesnage S., Tosi-Couture E., Mock M. et al. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. Mol. Microbiol. 1997; 23:1147–1155.
- Mock M., Fouet A. Anthrax. Microbiol. Rev. 2001; 55:647–671.
- Sastry K., Tuteja U., Batra H. Generation and characterization of monoclonal antibodies to protective antigen of *Bacillus anthracis*. Indian. J. Exp. Biol. 2003; 41:123–128.

A.Yu.Goncharova, N.I.Mikshis, O.M.Kudryavtseva, M.F.Bolotnikova, L.V.Novikova, G.G.Krasichkov, T.V.Alenkina, Yu.A.Popov

Obtaining of Polyclonal Antibodies against *B. anthracis* S-layer Proteins and Study of their Specificity in Enzyme Immunoassay

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Purified preparations of *B. anthracis* S-layer proteins – Sap and EA1 were obtained. Developed was the scheme of laboratory animals' immunization, that enabled to receive rabbits' polyclonal antibodies against Sap and EA1 proteins in high titer. 12 strains of *B. anthracis*, 53 strains of closely-related bacilli and 4 strains of other heterogeneous bacteria were tested in enzyme-linked immunosorbent assay and DOT-immunoassay with the use of polyclonal anti-Sap and anti-EA1 antibodies. Analysis of specificity of the obtained antibodies revealed cross-reactions with *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mycoides* and *B. megaterium*. The specificity of polyclonal anti-EA1 and anti-Sap antibodies was 75 and 83 % respectively. Sensitivity of reaction was 10^5 and 10^6 m.c. in applying polyclonal antibodies against *B. anthracis* S-layer proteins.

Key words: *B. anthracis*, polyclonal antibodies, S-layer, Sap and EA1 proteins, enzyme immunoassay.

Об авторах:

Гончарова А.Ю., Микуш Н.И., Кудрявцева О.М., Болотникова М.Ф., Новикова Л.В., Красичков Г.Г., Аленкина Т.В., Попов Ю.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Goncharova A.Yu., Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Bolotnikova M.F., Novikova L.V., Krasichkov G.G., Alenkina T.V., Popov Yu.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 18.11.09.