

С.С.Ветчинин¹, П.Х.Копылов¹, Н.В.Киселева¹, А.М.Баранов¹,
Е.В.Баранова¹, Е.В.Галкина¹, А.И.Борзилов¹,
И.Я.Калачев²

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К БЕЛКАМ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* ШТАММА С-141

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk;

²Филиал института биоорганической химии РАН им. академиков М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова, Пущино, Московская обл.

Моноклональные антитела получали к очищенным мембранным белкам *B. pseudomallei* с молекулярными массами 29 (p29) и 45 кДа (p45). Антитела клонов 4F2 и 1G11 специфически взаимодействовали в непрямом иммуноферментном анализе (ИФА) и иммуноблоте с белком p29 *B. pseudomallei* и *Burkholderia mallei*. Антитела клона 3G4 обладали сродством преимущественно к белковой структуре, связанной с ЛПС этих микроорганизмов. Результаты анализа взаимодействия антител 4F2 и 1G11 с антигенами клеточных лизатов различных возбудителей подтвердили их высокую специфичность к белку p29 *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, белки наружных мембран, моноклональные антитела.

Клинические формы мелиоидоза варьируют от острой септической до хронически протекающей инфекции. Септическая форма встречается примерно у 60 % пациентов, большинство из которых умирает в течение 2–3 дней, при этом до 20 % больных погибает при проведении антибиотикотерапии. До четверти пациентов остаются носителями инфекции с рецидивами после хемо- и антибиотикотерапии [15]. Возбудитель мелиоидоза в хронической фазе инфекции может скрытно персистировать месяцы и годы, индуцируя неожиданные проявления болезни, которые появляются на фоне иммуносупрессивных состояний, вследствие травм, ожогов, после введения стероидов, цитостатиков, на фоне диабета, бактериальных и химических интоксикаций [3]. В связи с этим чрезвычайно важна не только ранняя диагностика мелиоидоза для эффективного лечения, но и периодический контроль как в процессе лечения заболевших, так и после него.

Последнее десятилетие характеризуется увеличением интенсивности исследований, посвященных антигенам бактерий *B. pseudomallei* [1, 2, 6]. Среди них мембранные белки традиционно являются диагностически значимыми. В частности, описана перспективность использования для идентификации возбудителя мелиоидоза антител к поверхностным белкам 19,5, 30, 39 кДа [7, 13]. Проведенная нами ранее *in vitro* оценка иммуногенности антигенов бактерий рода *Burkholderia* показала, что перспективными кандидатами для использования в составе потенциальных вакцин являются мембранные белки p29 (29 кДа) и p45 (45 кДа) [4, 5]. Цель настоящего исследования состояла в получении моноклональных антител (МКАТ) к высокоочищенным мембранным белкам 29 и 45 кДа возбудителя мелиоидоза и исследование возможности использования МКАТ для диагностики.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования. В работе использовали бактериальные штаммы из коллекции ФГУН ГНЦ ПМБ: *B. pseudomallei* С-141, *B. mallei* С-5, *Proteus vulgaris* 104g, *Micobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia pseudotuberculosis* Pfeifer, *Yersinia enterocolitica* H2604, *Bacillus cepacia* ATCC 17759, *B. cepacia* ВТХ, *B. cepacia* ATCC 17769, *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Legionella pneumophila* ATCC 33153, *Salmonella typhimurium* 79, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Francisella tularensis* 15/10.

Для выделения мембранных белков использовали культуру штамма *B. pseudomallei* С-141, выращенную на плотной питательной среде (ППС) на основе агара, содержащего LB с добавлением 1 % глицерина, 1,2 мМ MgSO₄·7 H₂O и 0,1 мМ FeSO₄·7 H₂O. Культивирование проводили в течение 24 ч при 37 °С, после чего микробные клетки смывали раствором 0,15 М NaCl. В суспензии определяли концентрацию живых клеток высевом десятикратных разведений на ППС и контролировали чистоту культуры микроскопией мазков, окрашенных по Граму. Суспензию клеток стерилизовали γ -облучением в дозе 1,2·10⁴ Зв, замораживали и хранили при –70 °С. Стерильность облученных препаратов подтверждали бактериологически и биопробами на золотистых хомьяках.

Выделение мембран. Фракции мембран получали из разрушенных ультразвуком клеток *B. pseudomallei* по методу Gotoh *et al.* [9]. Очищенные мембраны суспендировали в 0,5 мл 30 мМ трис-НСl (рН 8,0) буферного раствора и определяли в пробах концентрацию общего белка, активность сукцинатдегидрогена-

зы по восстановлению 2,6-дихлорфенолиндофенола, замораживали и хранили при -70°C [12].

Электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофорез как в аналитическом, так и препаративном вариантах, проводили по методу Лэмли в редуцирующих условиях [10]. Перед разделением пробы смешивали в соотношении 1:1 с буфером, содержащим 125 мМ трис-НСI (рН 6,8), 4 % додецилсульфата натрия, 20 % глицерина, 10 % 2-меркаптоэтанола, 0,02 % бромфенолового синего и прогревали на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Белки в гелях окрашивали Кумасси G-250, для выявления ЛПС использовали метод Fomsgaard *et al.* [8].

Выделение мембранных белков. После электрофоретического разделения мембранные белки экстрагировали из измельченных полос полиакриламидного геля (2,5 мм \times 3,0 мм \times 140 мм) буферным раствором, содержащим 30 мМ трис-НСI (рН 8,0), 6 М мочевины, 2 % тритона X-100 и осаждали при -20°C двойным объемом ацетона. Осадки промывали ацетоном, сушили, растворяли в ФСБР, содержащим 2 % нонаноил-N-метилглуконида (Sigma, США) и анализировали в ДСН электрофорезе. Пробы, содержащие гомогенные белки с одинаковой молекулярной массой, объединяли и подвергали повторной очистке тем же способом. Очищенные препараты хранили при -70°C .

Выделение липополисахаридов. Липополисахариды (ЛПС) *V. pseudomallei* получали водно-фенольной экстракцией [14].

Получение моноклональных антител. Мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно 100 мкг антигенов р29 и р45 с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1, через 30 дней проводили повторную иммунизацию с неполным адьювантом. Далее следовали три внутривенные инъекции по 20 мкг соответствующих антигенов с десятидневными промежутками. Для гибридизации использовали спленоциты мышей с титрами сыворотки в иммуноферментном анализе (ИФА) не менее 1:10000. Слияние миеломных клеток линии РЗ-Х63-Аg8.653 со спленоцитами иммунных мышей проводили с использованием 50 % полиэтиленгликоля (вес/объем) и 5 % ДМСО (объем/объем), рН 8,0 [11]. Селекцию гибридных клеток проводили на среде RPMI 1640, содержащей 20 % (объем/объем) эмбриональной сыворотки телят, 1 мМ L-глутамина, 1 мМ гипоксантина, 0,1 мМ тимидина и 0,3 мкМ аминокперина (Sigma, США). Скрининг гибридных клеток, продуцирующих МКАТ, проводили с помощью ИФА. Выбранные продуценты клонировали методом предельных разведений. Для получения препаративных количеств МКАТ мышам линии BALB/c вводили внутривенно 0,5 мл пристана (Химмед, Россия) и через две недели – $1 \cdot 10^7$ гибридных клеток. Моноклональные антитела выделяли из асцитической жидкости мышей аффинной хроматографией на колонках, упакованных сефарозой с иммобилизованным белком А.

Иммуноблот. Белки переносили на нитроцеллю-

лозные мембраны в режиме постоянного тока 380 мА в течение 1,5 ч. Неспецифическое связывание блокировали 5 % раствором (вес/объем) обезжиренного молока в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,05 % (объем/объем) твина-20 (ФСБТ). Дальнейшие этапы включали инкубации мембран в растворах МКАТ и конъюгата антимишанных антител с пероксидазой хрена (Sigma, США). Продолжительность инкубаций составляла 1 ч при 37°C . Окраску проводили раствором, содержащим 2,2 мМ 3,3'-диаминобензидина, 0,02 % NiCl_2 и 0,015 % перекиси водорода в 50 мМ трис буфере (рН 7,4).

Иммуноферментный анализ. Планшеты сенсibiliзировали соответствующими мембранными белками, растворенными в 0,1 М карбонатном буфере (рН 9,6), по 1 мкг в лунку в течение 18 ч при 4°C . Неспецифическую сорбцию блокировали ФСБТ, содержащим 5 % фетальной сывороткой телят (объем/объем). Для промежуточных промывок и разведения рабочих растворов МКАТ и конъюгата антимишанных антител с пероксидазой хрена использовали этот же буфер. Длительность инкубаций не превышала 1 ч при 37°C . Субстратом служил 0,1 % раствор о-фенилендиамина и 0,03 % перекиси водорода в 50 мМ цитрат-фосфатном буфере (рН 5,0). Реакцию останавливали через 10 мин добавлением в рабочие лунки 50 мкл 2 М раствора серной кислоты.

Определение подклассов мышинных моноклональных антител проводили с использованием ИФА-набора реагентов (Sigma, США) по инструкции производителя.

Результаты и обсуждение

Характеристика выделенных мембран и мембранных белков. Очищенные препараты мембран различались белковым составом и содержанием ЛПС. Наименьшее значение активности сукцинатдегидрогеназы соответствовало фракциям тяжелой части градиента сахарозы. Электрофорез показал наличие мажорных и минорных белков в препаратах мембран, положение которых в полиакриламидных гелях в основном соответствовало литературным данным [9]. Использование 6 М раствора мочевины обеспечивало высокий уровень экстракции мембранных белков (до 120 мкг белка из одной полосы геля после препаративного электрофореза). После оценки иммуногенности [4, 5] препараты белков р29 и р45, выбранные для внутривенной иммунизации мышей и анализа МКАТ, повторно разделяли электрофорезом, экстрагировали и осаждали ацетоном (рис. 1, линии 2, 3, 4, 5).

Получение гибридом и анализ моноклональных антител. После гибридизации клетки высевали на 96-луночные планшеты, содержащие селективную среду. Скрининг культуральной жидкости (КЖ) на наличие моноклональных антител дал положительную реакцию в 8 лунках для белка р29 и 4 лунках для р45. Их повторная проверка в ИФА с дополнительно

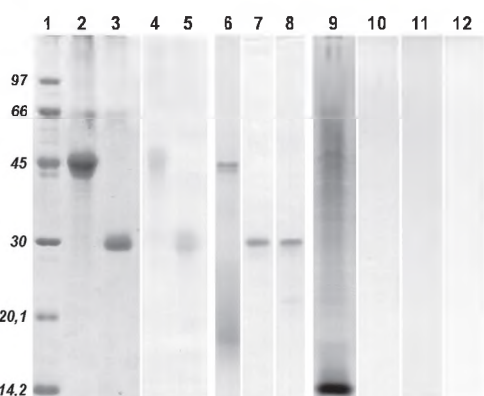


Рис. 1. Электрофорез и иммуноблот препаратов очищенных белков р45, р29 и ЛПС *B. pseudomallei*:

Числами в верхней части геля обозначены номера линий: 1 – маркеры молекулярных масс, кДа; курсивом справа; 2, 4, 6 – белок р45; 3, 5, 7, 8 – белок р29; 9, 10, 11, 12 – ЛПС *B. pseudomallei* С-141. Гель окрашен кумаси G-250, линии 1 – 3; окраска серебром с окислением, линии 4, 5, 9; блоты обработаны моноклональными антителами: 3G4 – линии 6, 10; 1G11 – линии 7, 11; 4F2 – линии 8, 12

очищенными белками показала уменьшение взаимодействия антител для большинства КЖ. Только для КЖ лунок 1G11, 4F2 (белок р29) и для 3G4 (белок р45) связывание МКАТ с белками сохранялось на первоначальном уровне. Обработка белковых препаратов протеиназой К приводила к потере взаимодействия антигена с МКАТ гибридом 1G11, 4F2 и 3G4 в ИФА, что свидетельствовало о сродстве антител именно к белковой части препарата. Гибридные клетки этих лунок клонировали и использовали для наработки МКАТ как в культуре клеток, так и в мышах.

Моноклональные антитела полученных гибридом относились к IgG1. В непрямом твердофазном ИФА и иммуноблоте моноклональные антитела не взаимодействовали с ЛПС возбудителя мелиоидоза (рис. 1, линии 10, 11, 12). Специфичность полученных МКАТ к белкам р29 и р45 проверяли иммуноблотом (рис. 1, линии 6, 7, 8). Моноклональные антитела 1G11 и 4F2 выявляли мажорную полосу в области 29 кДа, совпадающую с молекулярной массой специфического белка. Антитела клона 3G4 выявляли в препарате р45, не только ожидаемую полосу в области 45 кДа, но и дополнительную диффузную полосу с наибольшей интенсивностью окраски в области 17 кДа. (рис. 1, линия 6).

Перекрестную активность МКАТ 3G4, 1G11, 4F2 анализировали в иммуноблоте с панелью антигенных препаратов 17 микроорганизмов, включая *B. pseudomallei* С-141 и *B. mallei* С-5. Антигенные препараты представляли собой ультразвуковые дезинтеграты микроорганизмов. По данным иммуноблота МКАТ, 3G4 активно взаимодействовали не только с антигенным профилем *B. pseudomallei*, но и *B. mallei* в диапазоне молекулярных масс от 55 до 15 кДа. Характер взаимодействия свидетельствует о сложной природе специфической мишени для данных антител (рис. 2А, линии 17, 18). Моноклональные антитела клонов 1G11 и 4F2 показали высокую специфичность к р29 *B. pseudomallei* и *B. mallei* (рис. 2Б

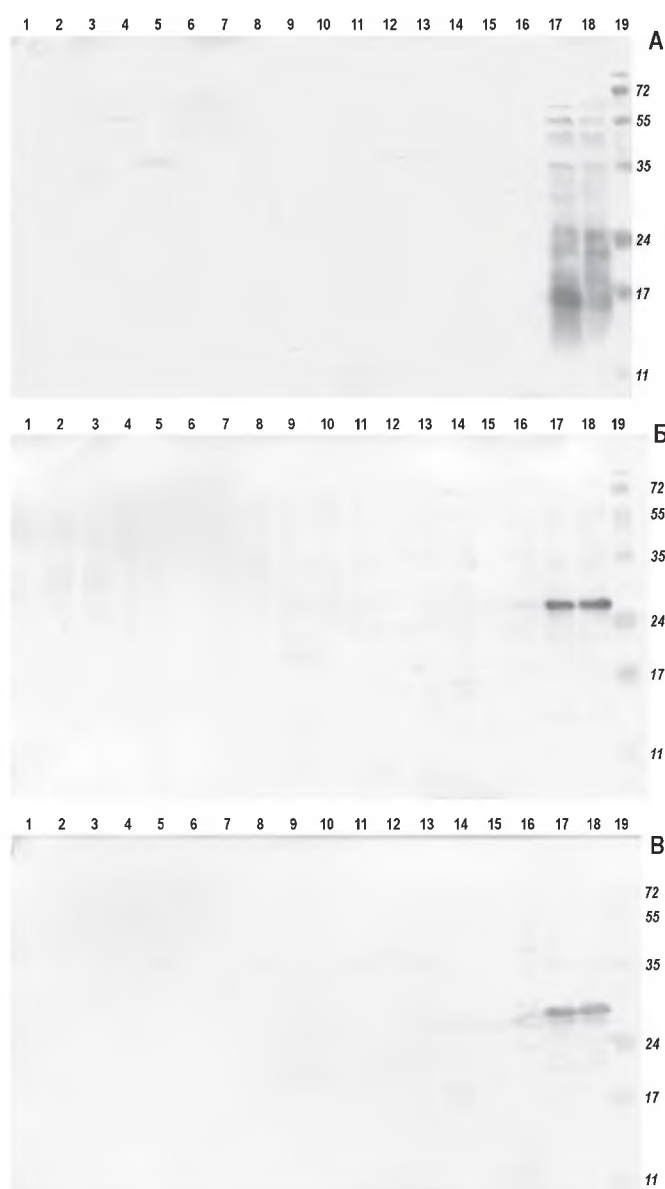


Рис. 2. Иммуноблот лизатов бактериальных культур с МКАТ против белков р45, р29 *B. pseudomallei*:

Числами обозначены номера линий в верхней части каждой мембраны. Иммуноблоты обрабатывали МКАТ: А – 3G4; Б – 1G11; В – 4F2. Линии: 1 – *P. vulgaris* 104g; 2 – *M. tuberculosis* H37Rv; 3 – *M. tuberculosis* H37Ra; 4 – *P. aeruginosa* ATCC 27853; 5 – *Y. pseudotuberculosis* Pfeifer; 6 – *Y. enterocolitica* H2604; 7 – *B. cepacia* ATCC 17769; 8 – *B. cepacia* ВТХ; 9 – *B. cepacia* ATCC 17759; 10 – *B. anthracis* СТИ-1; 11 – *E. coli* ATCC 10536; 12 – *L. pneumophila* ATCC 33153; 13 – *S. typhimurium* 79; 14 – *Y. pestis* EV НИИЭГ; 15 – *L. monocytogenes* NCTC 11994; 16 – *F. tularensis* 15/10; 17 – *B. pseudomallei* С-141; 18 – *B. mallei* С-5; 19 – маркеры молекулярных масс, кДа, курсивом слева

и 2В, линии 17, 18). Перекрестное взаимодействие моноклональных антител, полученных к белкам *B. pseudomallei*, с белками *B. mallei* показывает гомологию соответствующих белков этих микроорганизмов в структуре наружной мембраны. Слабо выраженные полосы на иммуноблоте с лизатами *P. aeruginosa*, *Y. pseudotuberculosis*, *L. pneumophila*, *S. typhimurium* (рис. 2А, линии 4, 5, 12, 13 на мембране А) могут свидетельствовать о наличии сходных структур в составе лизатов исследуемых граммотри-

цательных микроорганизмов.

Таким образом, на основании анализа перекрестных реакций полученных МКАТ 1G11, 4F2 и 3G4 было установлено, что антитела обладают выраженной специфичностью к белкам p29 и p45 возбудителей сапа и мелиоидоза.

Работа поддержана грантом № 1176 Международного научно-технического центра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авророва И.В., Пивень Н.Н., Жукова С.И. и др. Журн. микробиол. 2004; 5:29–33.
2. Викторов Д.В., Меринова Л.К., Алексеев В.В. и др. Мол. генет. 2005; 4:17–21.
3. Захарова И.Б., Викторов Д.В., Меринова О.А. и др. Пробл. особо опасных инф. 2006; 1(91):35–8.
4. Иванова О.А., Ганина Е.А., Борзилов А.И. и др. В кн.: Матер. VII межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. Оболensk; 2006. С. 145–6.
5. Калачев И.Я., Борзилов А.И., Иванова О.А. и др. В кн. Матер. научн. конф. Предотвращение распростр. биол. оружия. The Cooper. Biol. Res. Ann. Rev. СПб; 2004. С. 42–4.
6. Пивень Н.Н., Рыбкин В.С., Плеханова Г.Н. и др. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 1:29–33.
7. Anuntagool N., Rugdech P., Sirisinha S.J. Clin. Microbiol. 1993; 31:1232–6.
8. Fomsgaard A., Freudenberg M.A., Galanos C. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:2627–31.
9. Gotoh N., White N.J., Chaowagul W. et al. Microbiology. 1994; 140:797–805.
10. Laemmli U.K. Nature. 1970; 227:680–5.
11. Nowinski R.C., Lostrom M.E., Tam M.R. Virology. 1979; 93:111–26.
12. Owen P., Freer J.H. Biochem. J. 1970; 120:237–43.
13. Pongsunk S., Thirawattanasuk N., Piyasangthong N. et al. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:3662–7.
14. Westphal A., Lamm H. Meth. Carbohydr. Chem. 1965; 5:83–91.

15. Wuthiekanun V.D., Dance A.B., Chaowagul W. et al. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. 1990; 9:654–8.

S.S.Vetchinin, P.C.Kopylov, N.V.Kiseleva, A.M.Baranov, E.V.Baranova, E.V.Galkina, A.I.Borzilov, I.Y.Kalachev

Production of Monoclonal Antibodies against Outer Membrane Proteins of *Burkholderia pseudomallei*, Strain C-141

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk; Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino, Moscow Region

Monoclonal antibodies (MAb) were produced against two *B. pseudomallei* high-purified membrane proteins with Mr 29 kDa (p29) and 45 kDa (p45). Monoclonal antibodies from culture supernatant fluids of 4F2 and 1G11 clones showed specific interaction with protein moiety of p29 both *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* in ELISA and Western blotting. However, MAb of 3G4 clone were bound to the LPS-protein structures of these microbial cells. Analysis of interaction of Mabs from 4F2 and 1G11 clones with antigens of different lysates of pathogenic cells confirmed high specificity of these antibodies to p29 membrane protein of *B. pseudomallei* and *B. mallei*.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, outer membrane proteins, monoclonal antibodies.

Об авторах:

Ветчинин С.С. (зав. сект.), Копылов П.Х. (зав. сект.), Киселева Н.В. (с.н.с.), Баранов А.М. (зав. отд.), Баранова Е.В. (вед.н.с.), Галкина Е.В. (н.с.), Борзилов А.И. (зав. лаб.). ГНИЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk. E-mail: vetchinin@obolensk.org

Калачев И.Я. (с.н.с.). Филиал института биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН. Пушино, Московская обл. E-mail: trust-org@ipac.ac.ru

Поступила 14.03.08.