

Научная статья/Research Article

УДК 579.842.23:616-097:577.112

DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-122-128

Вера Сергеевна Кузнецова¹, Сергей Владимирович Иващенко^{2✉}, Михаил Николаевич Киреев³, Заур Юрьевич Хапцев⁴, Татьяна Владиславовна Спирихина⁵

^{1,2,4,5}Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

³Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

¹murtaeva.vera@rambler.ru

²ivashenko-sv@mail.ru

³rusrapi@microbe.ru

⁴dfst@list.ru

⁵69tan69@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ ДЕЗИНТЕГРИРОВАННЫХ МЕМБРАН ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОГО МИКРОБА

Дезинтегрированные мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* (ДМ *Y. pseudotuberculosis*) являются перспективными в антигенном плане препаратами. Цель исследования – изучение белкового и антигенного составов препарата ДМ *Y. pseudotuberculosis*. С помощью электрофореза было установлено преобладание в ДМ *Y. pseudotuberculosis* белков с молекулярными массами 23, 38 и 45 кДа, из которых в наибольшем количестве присутствовал белок массой 38 кДа. У мышей, иммунизированных препаратом ДМ *Y. pseudotuberculosis*, отмечалось усиление дыхательной активности перитонеальных макрофагов и антителогенеза. Скорость прироста дыхательной активности перитонеальных макрофагов снижалась при иммунизирующих дозах выше 63 мкг/мышь, а также замедлялось антителообразование, что определило величину иммунизирующей дозы в 63 мкг/мышь. При пересчете на кролика массой 2,5 кг иммунизирующая доза составила 2 мг. Нами также была проведена пятикратная иммунизация кроликов для получения высокоспецифических антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Титры антител полученной сыворотки в ИФА с цельными клетками *Y. pseudotuberculosis* составили 1:25600, с клетками *Y. enterocolitica* – 1:200, с клетками других представителей кишечной группы бактерий – 1:100–1:400. Это свидетельствует о том, что основной антигенной активностью в ДМ *Y. pseudotuberculosis* обладают белки с видовой специфичностью. Полученные антитела взаимодействовали в иммуноблоттинге с белками ДМ, имеющими молекулярные массы 38, 45, 58, 66 кДа. Однако наиболее интенсивное взаимодействие отмечалось с белком молекулярной массы 45 кДа. При психрофильном культивировании иерсиний молекулярным массам обнаруженных нами белков соответствуют только термостабильный токсин и порины клеточной стенки. Данные антигены достаточно устойчивы к низким концентрациям додецилсульфата натрия и вместе с липополисахаридом могут составлять основную антигенную композицию ДМ *Y. pseudotuberculosis*, обладающую видовой специфичностью.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, дезинтегрированные мембраны, антигены, белки

Для цитирования: Изучение антигенных свойств белков дезинтегрированных мембран псевдотуберкулезного микроба / В.С. Кузнецова [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2023. № 2. С. 122–128. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-122-128.

Vera Sergeevna Kuznetsova¹, Sergey Vladimirovich Ivashchenko^{2✉}, Mikhail Nikolaevich Kireev³, Zaur Yurievich Khaptsev⁴, Tatyana Vladislavovna Spiriyakhina⁵

^{1,2,4,5}Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia

³Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov, Russia

¹murtaeva.vera@rambler.ru

²ivashenko-sv@mail.ru

³rusrapi@microbe.ru

⁴dfst@list.ru

⁵69tan69@mail.ru

STUDY OF THE DISINTEGRATED MEMBRANES PROTEINS OF THE PSEUDOTUBERCULOSIS MICROBE ANTIGENIC PROPERTIES

Disintegrated membranes of Yersinia pseudotuberculosis (DM Y. pseudotuberculosis) are antigenic promising drugs. The purpose of research is to study the protein and antigenic composition of the Y. pseudotuberculosis DM preparation. Using electrophoresis, the predominance of proteins with molecular weights of 23, 38, and 45 kDa was established in Y. pseudotuberculosis DM, among which the 38 kDa protein was present in the greatest amount. In mice immunized with Y. pseudotuberculosis DM, an increase in the respiratory activity of peritoneal macrophages and antibody genesis was noted. The rate of increase in the respiratory activity of peritoneal macrophages decreased at immunizing doses above 63 µg/mouse, and antibody formation also slowed down, which determined the value of the immunizing dose of 63 µg/mouse. When converted to a rabbit weighing 2.5 kg, the immunizing dose was 2 mg. We also carried out fivefold immunization of rabbits to obtain highly specific antibodies to Y. pseudotuberculosis DM. The antibody titers of the obtained serum in ELISA with whole Y. pseudotuberculosis cells were 1:25600, with Y. enterocolitica cells – 1:200, with cells of other representatives of the intestinal group of bacteria – 1:100–1:400. This indicates that species-specific proteins have the main antigenic activity in Y. pseudotuberculosis DM. The resulting antibodies interacted in immunoblotting with DM proteins having molecular weights of 38, 45, 58, 66 kDa. However, the most intense interaction was noted with a 45 kDa protein. During the psychrophilic cultivation of Yersinia, the molecular weights of the proteins found by us correspond only to the thermostable toxin and cell wall porins. These antigens are sufficiently resistant to low concentrations of sodium dodecyl sulfate and, together with lipopolysaccharide, can form the main antigenic composition of Y. pseudotuberculosis DM, which has species specificity.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis, disintegrated membranes, antigens, proteins*

For citation: Study of the disintegrated membranes proteins of the pseudotuberculosis microbe antigenic properties / V.S. Kuznetsova [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2023;(2): 122–128. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-122-128.

Введение. *Yersinia pseudotuberculosis (Y. pseudotuberculosis)* поражает людей и животных. У животных псевдотуберкулез протекает без характерных клинических признаков с поражением желудочно-кишечного тракта или латентно, что требует применения лабораторной диагностики, в том числе серологической, предполагающей использование антительных и антигенных диагностических препаратов. Поэтому антигенный состав иерсиний достаточно неплохо изучен. Многочисленными исследованиями

установлено, что возбудитель псевдотуберкулеза обладает соматическим S-антигеном, жгутиковым H-антигеном, V- и W-антигенами, суперантигенным токсином (YPM), а также термостабильным токсином (ST) и белками наружной стенки иерсиний (Yops), обладающими антигенными свойствами.

S-антиген *Y. pseudotuberculosis* сходен по химическому составу, физическим свойствам и строению с O-антигеном кишечной иерсиниозной микроба. Он является токсичным липополиса-

хариднопротеидным комплексом, используется в диагностике и образует 21 серовариант.

H-жгутиковый антиген белковой природы у *Y. pseudotuberculosis* диагностического значения не имеет и разрушается перед постановкой серологических тестов кипячением бактериальной культуры.

V- и W-антигены имеются только у штаммов иерсиний, свежeweделенных из теплокровного организма или выращенных на питательных средах при температуре 37 °С. Они расположены в клеточной стенке, имеют белковую природу и встречаются у нескольких представителей рода [1, 2].

У энтеропатогенных иерсиний в клеточной стенке имеется белок инвазин с молекулярной массой 103 кДа. Максимальная продукция белка наблюдается при температуре 28–30 °С [3].

YPM – белок псевдотуберкулезного микроба с молекулярной массой 14,5 кДа, вызывает синтез антител у 61 % заболевших данной инфекцией людей [4].

Антитела к видоспецифическому токсину ST, представленному белком с молекулярной массой 45 кДа, также можно часто обнаружить у псевдотуберкулезных больных [5].

Yops – синтезируются только при 37 °С в отсутствие ионов Ca^{2+} и встречаются у патогенных представителей рода иерсиний. К Yops относят: YopA (с молекулярной массой (м.м.) 200 кДа), YopB (м.м. 42 кДа), YopD (м.м. 33 кДа), YopE (м.м. 23 кДа), YopH (м.м. 51 кДа), YopK (м.м. 21 кДа), YopM (м.м. 42 кДа), YopN (м.м. 33 кДа) [3].

Антигенные видо- и родоспецифические свойства обнаружены у белков поринов иерсиний с молекулярной массой 38–40 кДа. Они осуществляют трансмембранный перенос питательных веществ и продуктов метаболизма микробных клеток [6].

Перспективными в антигенном плане, на наш взгляд, являются дезинтегрированные мембраны (ДМ) *Y. pseudotuberculosis*. Препарат ДМ был нами успешно использован для получения гипериммунных сывороток кролика [7].

Цель исследования – изучение белкового и антигенного составов препарата ДМ *Y. Pseudotuberculosis*.

Объекты и методы. Для выделения ДМ был использован музейный штамм *Y. Pseudotuberculosis* III O:3 сероварианта, взятый из

коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Микроб культивировали на мясопептонном агаре в течение 2 сут при температуре 24 °С.

Для получения ДМ *Y. pseudotuberculosis* отмытую бактериальную взвесь обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе. Затем отделяли частично разрушенные клеточные мембраны от цитоплазмы и периплазмы центрифугированием. Полученные клеточные мембраны разрушали до молекул 20 ч при комнатной температуре 2 % раствором додецилсульфата натрия (SDS), от которого впоследствии освобождались диализом в проточной воде.

Состав белковых фракций исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE) по Laemmli [8] в 12 % разделительном геле. Для обнаружения белков SDS-PAGE использовали окраску Кумаси синим R-250 (Merck, Германия).

Для определения иммунизирующей дозы вводили внутривенно белым мышам по 0,25 мл раствора ДМ *Y. pseudotuberculosis* в дозах: 500, 250, 125, 63, 31, 16 мкг/животное (по 3 мыши на дозу). К антигену добавляли 0,25 мл масляного адьюванта. Мышам 7-й группы инъекцировали 0,01М фосфатный буферный раствор (отрицательный контроль). Масса мышей составляла 20–22 г. Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 10 дней. Через 10 дней после второй иммунизации проводили декаптацию мышей с извлечением из брюшной полости перитонеальных макрофагов и взятием крови из перерезанных шейных сосудов.

Активность клеточного иммунитета у мышей определяли замером дыхательной активности перитонеальных макрофагов [9].

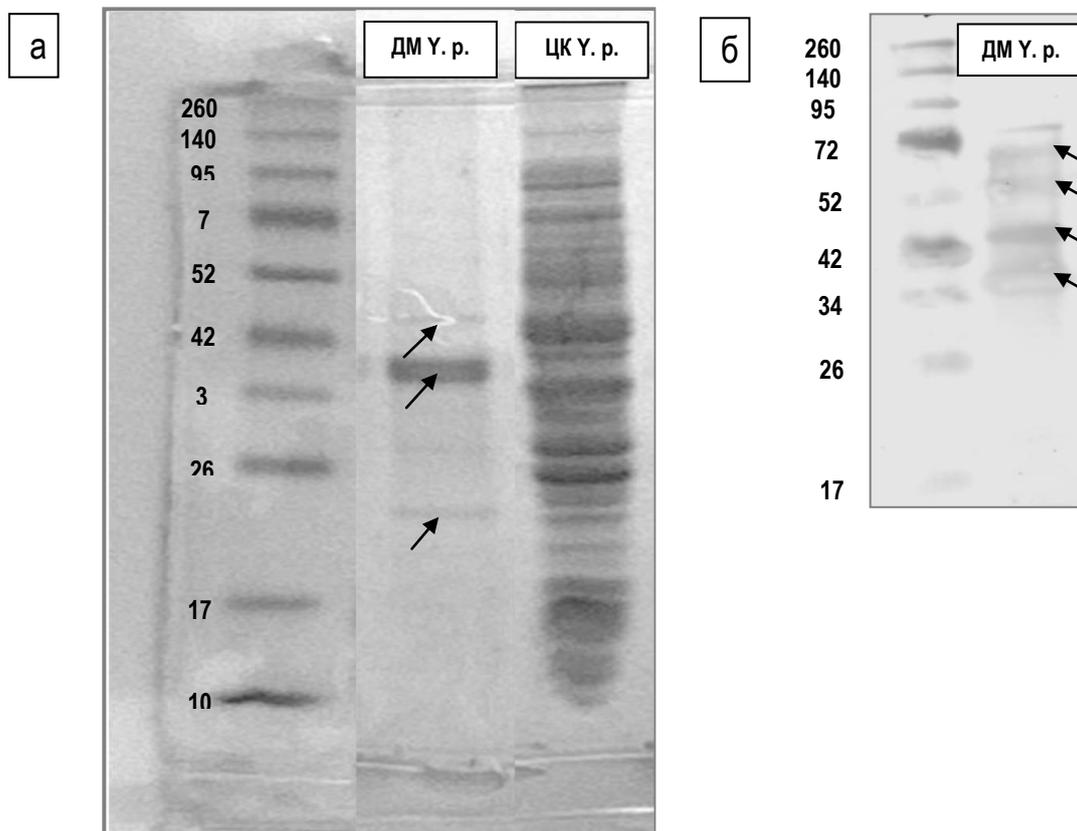
Активность гуморального иммунитета у мышей, а также специфичность полученной гипериммунной кроличьей сыворотки определяли по количеству антител методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на планшетах [10].

Иммунизацию кроликов проводили подкожно вдоль спины в 3–4 точки в объеме 1 мл смеси антигена и масляного адьюванта. При иммунизации соотношение адьюванта к раствору ДМ составляло 1:1. ДМ инъекцировали кролику в количестве 2 мг. Было проведено 5 иммунизаций с интервалом в 2 недели. Кровь для исследования

брали из ушной вены в объеме 5 мл через 14 суток после последней иммунизации [7].

Иммуноблоттинг проводили по методу Towbin [11] с использованием сыворотки, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis* в разведении 1:200, а также конъюгата – антикроличьих антител, меченных пероксидазой (ИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи РАМН).

Результаты и их обсуждение. Для определения спектра белков, входящих в состав ДМ *Y. pseudotuberculosis* (ДМ *Y. p.*), нами был проведен электрофорез препарата ДМ и лизата целых клеток псевдотуберкулезного микроба (ЦК *Y. p.*). Результаты представлены на рисунке.



Изучение белкового состава ДМ *Y. pseudotuberculosis*:

а – электрофорез белков; б – иммуноблоттинг с сывороткой, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis*

Как видно из рисунка (а), бактериальная клетка имеет широкий спектр белков, однако в препарат ДМ входят только некоторые из них. В составе ДМ *Y. pseudotuberculosis* преобладают белки с молекулярными массами: 23, 38 и 45 кДа, в большем количестве содержится белок массой 38 кДа. Однако наличие данных белков не исключает присутствия в препарате и других белков в более низких количествах.

Для определения антигенной активности белков необходима иммунизация животных с последующим изучением ответной реакции клеточной и гуморальной подсистем иммунитета. Поэтому нами была проведена иммунизация

белых мышей препаратом ДМ *Y. Pseudotuberculosis*. Изменения клеточного иммунитета у иммунизированных мышей определялись нами по дыхательной активности их перитонеальных макрофагов, выделяемых из брюшной полости. Гуморальный иммунитет изучался наблюдением изменений титров специфических антител в крови мышей. В связи с отсутствием информации о величине оптимальной иммунизирующей дозы ДМ *Y. pseudotuberculosis* для белых мышей нами было иммунизировано несколько групп животных разными дозами препарата (табл.).

Результаты иммунизации белых мышей ДМ *Y. pseudotuberculosis*

Иммунизирующая доза ДМ, мкг/мышь	Концентрация формазана на 1 перитонеальный макрофаг, г	Титры антител в ИФА с ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i>
500	$12,2 \cdot 10^{-10}$	1 : 12800
250	$11,6 \cdot 10^{-10}$	1 : 12800
125	$10,4 \cdot 10^{-10}$	1 : 6400
63	$8,7 \cdot 10^{-10}$	1 : 6400
31	$5,8 \cdot 10^{-10}$	1 : 3200
16	$3,0 \cdot 10^{-10}$	1 : 1600
0 (контрольная)	$1,6 \cdot 10^{-10}$	1 : 400

Как видно из данных, приведенных в таблице, ДМ *Y. pseudotuberculosis* способствуют значительной активизации клеточного и гуморального иммунитета. Однако скорость прироста дыхательной активности перитонеальных макрофагов снижается при иммунизирующих дозах выше 63 мкг/мышь, а также замедляется антителообразование, что определяет величину иммунизирующей дозы в 63 мкг/мышь. При пересчете на кролика массой 2,5 кг иммунизирующая доза составит 2 мг [12].

Дальнейший этап предполагает исследование специфичности антител, полученных в результате иммунизации.

Известно, что высокая специфичность иммунных сывороток связана с наличием иммуноглобулинов класса G, которые в процессе иммунизаций постепенно вытесняют слабоспецифичные иммуноглобулины классов M и A. Данный процесс завершается к 5-й иммунизации.

Нами была проведена пятикратная иммунизация кролика ДМ *Y. pseudotuberculosis* дозой 2 мг/животное для получения гипериммунной сыворотки. Титры антител полученной сыворотки в ИФА с цельными клетками *Y. Pseudotuberculosis* составили 1:25600, с клетками *Y. enterocolitica* – 1:200, с клетками других представителей кишечной группы бактерий – 1:100–1:400. Это свидетельствует о том, что основной антигенной активностью в ДМ *Y. Pseudotuberculosis* обладают белки с видовой специфичностью [7].

Для определения масс наиболее активных в антигенном плане белков нами был проведен иммуноблоттинг, результаты которого представлены на рисунке (б). Как видно из рисунка,

сыворотка, полученная к ДМ *Y. Pseudotuberculosis*, взаимодействовала в иммуноблоттинге с белками 38, 45, 58, 66 кДа, входящими в состав ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Однако наиболее интенсивное взаимодействие отмечается с белком молекулярной массой 45 кДа.

Большое значение при получении нами ДМ *Y. pseudotuberculosis* имеет низкая температура культивирования бактерий. В психрофильных условиях микроб не продуцирует Yops, V- и W-антигены, антиген pH 6, поэтому данные белки не могут присутствовать в препарате ДМ. Из белков, которые мы можем обнаружить в ДМ *Y. pseudotuberculosis*, следует отметить инвазин [3], порины [6], YPM [4], ST [5]. Однако молекулярным массам обнаруженных нами белков соответствуют только ST и порины. Данные антигены достаточно устойчивы к низким концентрациям SDS и вместе с липополисахаридом могут составлять основную антигенную композицию ДМ *Y. pseudotuberculosis*, обладающую видовой специфичностью.

Заключение. Из полученных результатов следует, что в составе ДМ *Y. pseudotuberculosis* преобладают белки с молекулярными массами 23, 38 и 45 кДа. Однако наибольшее значение для образования антител в составе ДМ *Y. pseudotuberculosis* имеют белки с молекулярными массами 38, 45, 58, 66 кДа. Антитела, полученные к белкам ДМ *Y. pseudotuberculosis*, обладают видовой специфичностью. Кроме активизации антителогенеза белки ДМ *Y. pseudotuberculosis* способствуют значительной стимуляции клеточного иммунитета.

Список источников

1. Зыкин Л.Ф., Щербаков А.А., Хапцев З.Ю. Иерсиниоз и псевдотуберкулез сельскохозяйственных животных. Саратов, 2002. 67 с.
2. Псевдотуберкулез / И.А. Шурьгина [и др.]. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.
3. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002. № 3 (4). С. 248–266.
4. The superantigenic toxin of *Y. pseudotuberculosis*, a novel virulence factor? / C. Carnoy [et al.] // Int. J. Med. Microbiol. 2000. № 4-5 (290). P. 477–482.
5. Андрюков Б.Г., Недашковская Е.П., Тимченко Н.Ф. Опыт клинического использования видоспецифической иммуноферментной тест-системы для диагностики псевдотуберкулеза // Лаб. нов. Дальн. Вост. 1999. № 1. С. 3–4.
6. Использование порина наружной мембраны *Yersinia enterocolitica* для диагностики иерсиниоза с помощью ИФА / О.П. Вострикова [и др.]; Тихоокеанский ин-т биоорганической химии ДВО РАН (Владивосток) // Биологические мембраны. 2009. № 5 (26). С. 419–428.
7. The effect of polyazolidinammonium on the dynamics of the synthesis of pseudotuberculosis antibodies / S.V. Ivashchenko [et al.] // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2020. 421. 022055. DOI: 10.1088/1755-1315/421/2/022055.
8. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. № 22. P. 680–685.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. 1983. № 1-2 (65). P. 55–63.
10. Hornbeck P., Winston S.E., Fuller S.A. Enzyme-linked immunosorbent assays // Current Protocols in Molecular Biology. 2001. № 15. P. 2.1.1–2.1.23.
11. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: journal. 1979. № 9 (76). P. 4350–4354.
12. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз / Е.В. Шекунова [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2020. № 1 (10). С. 19–28.

References

1. Zykin L.F., Scherbakov A.A., Hapcev Z.Yu. Iersinioz i psevdotuberkulez sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh. Saratov, 2002. 67 s.
2. Psevdotuberkulez / I.A. Shurygina [i dr.]. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 s.
3. Ceneva G.Ya., Solodovnikova N.Yu., Voskresenskaya E.A. Molekulyarnye aspekty virulentnosti iersinij // Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya. 2002. № 3 (4). S. 248–266.
4. The superantigenic toxin of *Y. pseudotuberculosis*, a novel virulence factor? / C. Carnoy [et al.] // Int. J. Med. Microbiol. 2000. № 4-5 (290). P. 477–482.
5. Andryukov B.G., Nedashkovskaya E.P., Timchenko N.F. Opyt klinicheskogo ispol'zovaniya vidospecificheskoj immunofermentnoj test-sistemy dlya diagnostiki psevdotuberkuleza // Lab. nov. Dal'n. Vost. 1999. № 1. S. 3–4.
6. Ispol'zovanie porina naruzhnej membrany *Yersinia enterocolitica* dlya diagnostiki iersinioza s pomosh'yu IFA / O.P. Vostrikova [i dr.]; Tihookeanskij in-t bioorganicheskoy himii DVO RAN (Vladivostok) // Biologicheskie membrany. 2009. № 5 (26). S. 419–428.
7. The effect of polyazolidinammonium on the dynamics of the synthesis of pseudotuberculosis antibodies / S.V. Ivashchenko [et al.] // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2020. 421. 022055. DOI: 10.1088/1755-1315/421/2/022055.
8. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. № 22. P. 680–685.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. 1983. № 1-2 (65). P. 55–63.

10. *Hornbeck P., Winston S.E., Fuller S.A.* Enzyme-linked immunosorbent assays // *Current Protocols in Molecular Biology*. 2001. № 15. P. 2.1.1–2.1.23.
11. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: journal*. 1979. № 9 (76). P. 4350–4354.
12. *Vybor dozy preparata dlya doklinicheskogo isledovaniya: mezhhvidovoj perenos doz / E.V. Shekunova [i dr.] // Vedomosti Nauchnogo centra `ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya*. 2020. № 1 (10). S. 19–28.

Статья принята к публикации 11.10.2022 / The article accepted for publication 11.10.2022.

Информация об авторах:

Вера Сергеевна Кузнецова¹, соискатель кафедры микробиологии и биотехнологии
Сергей Владимирович Иващенко², доцент кафедры микробиологии и биотехнологии, кандидат биологических наук, доцент
Михаил Николаевич Киреев³, ведущий научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, кандидат медицинских наук
Заур Юрьевич Хапцев⁴, доцент кафедры микробиологии и биотехнологии, кандидат биологических наук, доцент
Татьяна Владиславовна Спирыхина⁵, доцент кафедры микробиологии и биотехнологии, кандидат биологических наук, доцент

Information about the authors:

Vera Sergeevna Kuznetsova¹, Competitor at the Department of Microbiology and Biotechnology
Sergey Vladimirovich Ivashchenko², Associate Professor at the Department of Microbiology and Biotechnology, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor
Mikhail Nikolaevich Kireev³, Leading Researcher, Cholera Vaccine Laboratory, Candidate of Medical Sciences
Zaur Yurievich Khaptsev⁴, Associate Professor at the Department of Microbiology and Biotechnology, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor
Tatyana Vladislavovna Spiryakhina⁵, Associate Professor at the Department of Microbiology and Biotechnology, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor

