

УДК 57.083.3

Получение антигенных компонентов *Mycobacterium bovis* для потенциальной идентификации микробного сообщества в окружающей среде

Третьякова А. Б.¹, Валеева А. Р.^{1,2}, Мукминов М. Н.^{1,2}

¹ Институт экологии и природопользования Казанского (Приволжского) федерального университета
Казань, Россия
annatreyackowa@yandex.ru

² Казанская государственная медицинская академия
Казань, Россия

Стратегической целью государственной политики Российской Федерации в области экологии является сохранение природных систем, повышения качества жизни, а также улучшения здоровья населения. *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) является одним из основных возбудителей туберкулеза животных, который является причиной крупных экономических потерь и представляет серьезную угрозу для здоровья населения. Приоритетным направлением для разработки новых подходов идентификации микобактерий в окружающей среде является поиск новых биологических маркеров. В результате исследования были выделены с использованием гель-фильтрационной хроматографии структурные компоненты *M. bovis* липидного и белкового происхождения. Реакция иммуноблот показала, что часть выделенных структурных компонентов серологически активны и могут быть использованы в качестве потенциального биологического маркера для идентификации микробного сообщества в окружающей среде. С гипериммунной сывороткой кролика против *M. bovis* реагировали выделенные структурные компоненты в диапазоне молекулярных масс от 10 кДа до 64 кДа. Особый интерес представляют структурные компоненты белкового происхождения, соответствующие молекулярной массе 10 кДа, предположительно соответствующие CFP-10, выступающему в качестве индуктора Т-клеток. Среди компонентов липидного происхождения особый интерес представляют структурные компоненты с молекулярными массами 25 кДа, 44 кДа, 48 кДа, предположительно соответствующие IrgP, IrgK, IrgQ, которые участвуют в механизме адаптации *M. bovis* при изменениях в окружающей среде.

Ключевые слова: *Mycobacterium bovis*, гель-фильтрационная хроматография, биологический маркер.

ВВЕДЕНИЕ

Стратегической целью государственной политики Российской Федерации в области экологии является сохранение природных систем, повышения качества жизни, а также улучшения здоровья населения (Распоряжение Правительства Российской Федерации N 1225-р). Представители рода *Mycobacterium* распространены в окружающей среде и являются возбудителями широкого круга заболеваний у человека и млекопитающих. *M. bovis* является одним из основных возбудителей туберкулеза животных, приводящее к крупным экономическим потерям, и представляет серьезную угрозу для здоровья населения (Chen et al., 2021). На загрязненных территориях отмечается рост суммарной резистентности микобактерий, а также снижение доли чувствительных штаммов возбудителя к антибиотикам (Нуратинов и др., 2014). Быстрая идентификация патогенных микобактерий, в окружающей среде имеет решающее значение для поддержания благоприятной эколого-эпидемиологической обстановки территории. Недостатком классических методов является низкая чувствительность и специфичность (Van Ingen et al., 2009). Для идентификации бактерий до видового уровня используются высокочувствительные методы секвенирования ДНК, амплификации нуклеиновых кислот, полимеразной цепной реакция. Но высокая стоимость препятствует их широкому применению. Таким образом приоритетным направлением для разработки новых подходов идентификации микобактерий в окружающей среде является поиск новых биологических маркеров.

Целью работы стало получение антигенных компонентов *M. bovis*, которые возможно использовать в качестве потенциальных биологических маркеров для идентификации микробного сообщества в окружающей среде.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась 30 дневная культура *M. bovis* Bovinus-8 выращенная на синтетической питательной среде Soton. Клетки от питательной среды отделяли центрифугированием, в течение 45 мин при 15 °С, 4500 g. Осадок ресуспендировали в disH₂O в соотношении 1:8. Клетки разрушали с использованием гомогенизатора Fast Prep 24 (MP Biomedicals) с использованием пробирок Lysing Matrix B с шариками из карбида кремния d 0,1 mm (MP Biomedicals). После обработки отбирали разрушенные клетки из пробирок, вносили 0,1 М Tris-HCl буфер с pH 7, встряхивали на шейкере Microspin FV-2400 (Euro Plag, BioSan), выжидали 30–90 секунд и отбирали супернатант.

Фракционирование полученного материала проводили гель-фильтрационной хроматографией с использованием матрицы Sephadex® G-200 superfine на колонке Econo Alpha Column, 15 × 500 (Bio-Rad). Материал вносили в колонку в концентрации 1,076 мг/мл. В качестве элюента использовали 0,1 М Tris-HCl pH 7 (Северин и др., 1986). Условия разделения: чувствительность 50 мВ, скорость элюции 166 мкл/мин. Материал после хроматографии анализировали электрофорезом в 12,5 % полиакриламидном геле (ПААГ) по Laemmli U.K. (1970), и иммуноблотом по Towbin H. (1976) с гипериммунной кроличьей сывороткой против клеток *M. bovis* для определения и локализации зон серологической активности. Результаты документировали и обрабатывали с использованием Gel Doc XR (Bio-Rad) и программы Image Lab Software 5.1. Для характеристики химической природы структурных компонентов бактерий, было проведено окрашивание на белки и липополисахариды (Beer, 2018; Tsai, 1982).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведения гель-фильтрационной хроматографии супернатанта, полученного разрушением клеток *M. bovis* Bovinus-8 штамм 70020, было получено 38 фракций. Материал элюировался двумя пиками. Первому пику соответствуют фракции с 1 по 5, второму пику соответствуют фракции с 13 по 28 фракцию (рис. 1).

По результатам реакции иммуноблот фракций после гель-фильтрационной хроматографии материала, полученного разрушением клеток *M. bovis* Bovinus-8 штамм 700201, серологическая активность наблюдается с 3 по 5 и с 11 по 19 фракциях. С 20 по 39 фракцию серологическая активность отсутствует. С гипериммунной сывороткой кролика против *M. bovis* реагировали выделенные структурные компоненты в диапазоне молекулярных масс от 10 кДа до 64 кДа.

Фракции 3, 4 и 5 имеют общий характер расположения зон серологической активности, наблюдается три схожих зоны, соответствующие молекулярной массе от 17 до 23 кДа. Фракции 11, 12, 13 и 14 имеют общую зону серологической активности равную 12 кДа. Фракции 15 и 16 имеют зоны серологической активности со схожей локализацией, соответствующие 48 кДа, 40 кДа, 23 кДа, 12 кДа и 10 кДа. Фракции 17, 18, 19 представляют три дискретных банд молекулярной массы 44 кДа, 25 кДа и 10 кДа (рис. 2).

В соответствии с локализацией зон серологической активности по результатам анализа денситограмм данные фракции были объединены.

При окрашивании на белок объединенных фракций, полученных в результате гель-фильтрационной хроматографии разрушенных клеток *M. bovis* Bovinus-8 штамм 700201, после электрофореза с 15 по 16 фракцию при окрашивании шла слабая реакция, отмечается один банд 10 кДа (рис. 3).

При окрашивании на белок объединенных фракций, полученных в результате гель-фильтрационной хроматографии разрушенных клеток *M. bovis* Bovinus-8 штамм 700201,

после электрофореза с 15 по 16 фракцию при окрашивании шла слабая реакция, отмечается один банд 10 кДа. С 17 по 19 фракцию отмечается два дискретных банд 34 кДа и 10 кДа. При окрашивании на липополисахариды шла более сильная реакция. С 15 по 16 фракцию первого материала отмечается 3 дискретных банд 48 кДа, 35 кДа и 25 кДа и 4 шмеры. В объединенных фракциях с 17 по 19 при окрашивании проявилось 11 дискретных бандов 180 кДа, 100 кДа, 60 кДа, 56 кДа, 52 кДа, 44 кДа, 38 кДа, 37 кДа, 32 кДа, 25 кДа, 20 кДа.

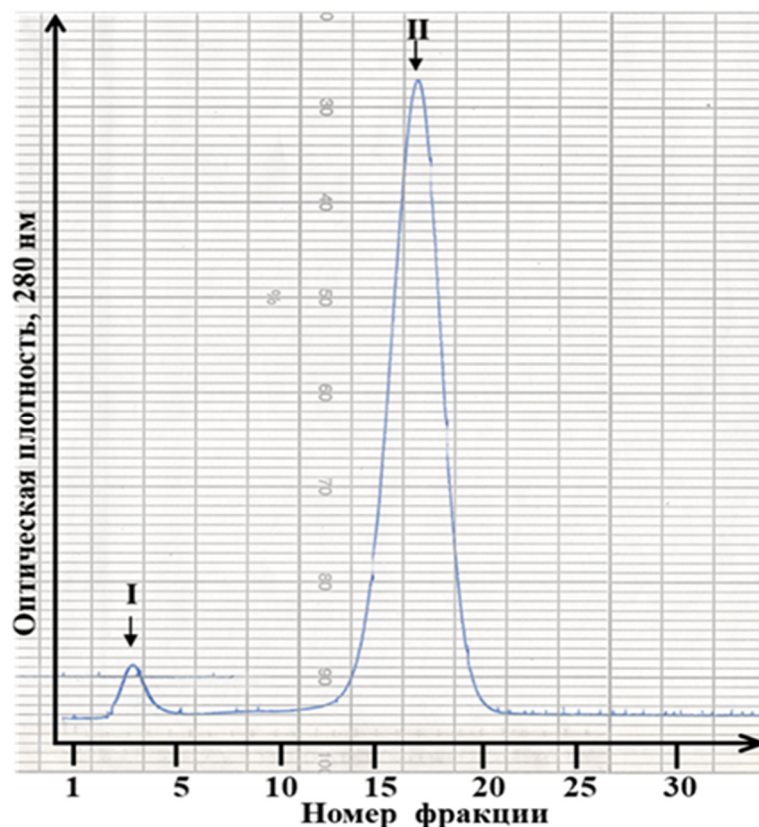
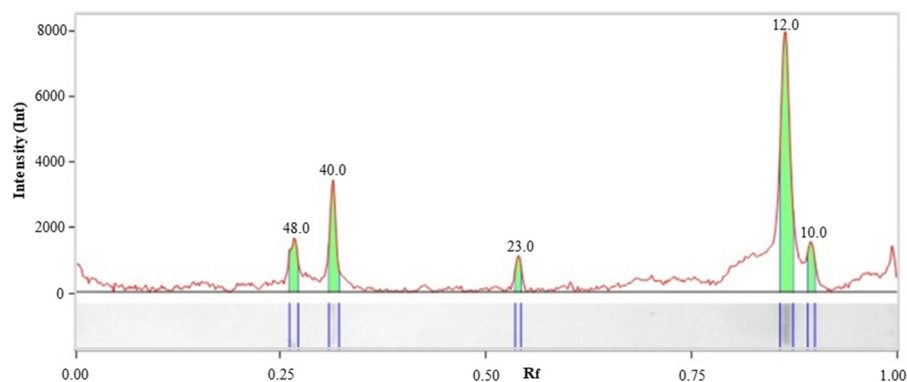


Рис. 1. Результаты фракционирования супернатанта, полученного разрушением клеток *Mycobacterium bovis* Bovinus-8 штамм 700201 методом геле-фильтрационной хроматографии на матрице Sephadex

Потенциально значимыми для применения в качестве биологических маркеров для идентификации *M. bovis* в окружающей среде являются фракции соответствующие молекулярной массе 10 кДа белковой природы и компоненты с молекулярными массами 25 кДа, 44 кДа и 48 кДа липидной природы. Зоны, соответствующие молекулярным массам, серологически активны, что доказывает возможность применения компонентов в качестве потенциального биологического маркера для идентификации.

Полученный компонент 10 кДа предположительно соответствует CFP-10. Данный белок был широко охарактеризован как рекомбинантный диагностический реагент из-за своей роли в качестве индуктора Т-клеток. Parsons, S. D., McGill, K. et al. (2016) в своих исследованиях подтверждают высокий уровень консервативности последовательности нуклеотидов и эпитопов в иммунодоминантном белке CFP-10. Кодированная последовательность белка CFP-10 расположена в *esxV*. Ген этого белка отсутствует у многих нетуберкулезных бактерий в окружающей среде, а также у противотуберкулезного вакцинного штамма *M. bovis* BCG (Waters et al., 2004).

А



Б

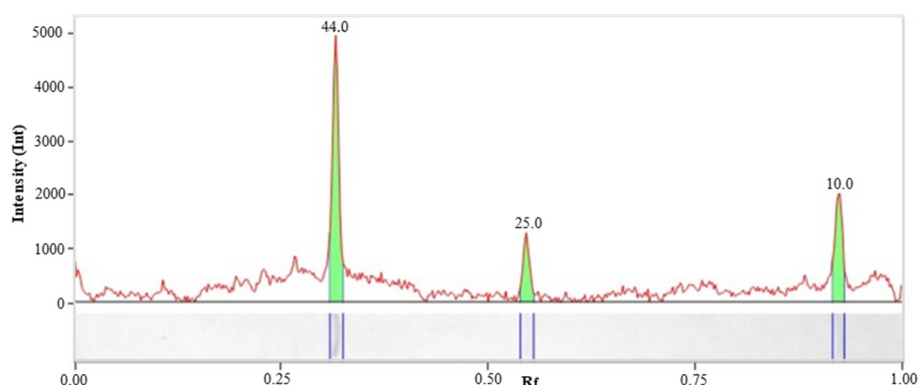
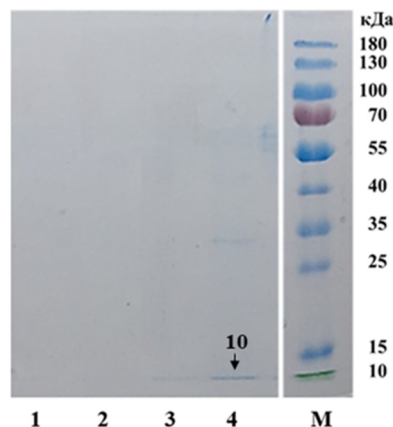


Рис. 2. Результаты обработки иммуноблота отдельных фракций, полученных в результате гель-фильтрационной хроматографии разрушенных клеток *M. bovis* Bovinus-8 штамм 700201 в программе Image Lab Software 5.1
Условные обозначения: А – 15 фракция, Б – 17 фракция.

А



Б

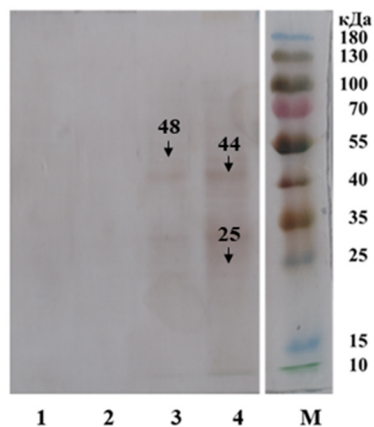


Рис. 3. Результаты окрашивания на (А) белки и (Б) липополисахариды после электрофореза объединенных фракций, полученных в результате гель-фильтрационной хроматографии разрушенных клеток *M. bovis* Bovinus-8 штамм 700201 в 12,5 % ПААГ
Условные обозначения: 1 – 3–5 фракции; 2 – 11–14 фракции; 3 – 15–16 фракции; 4 – 17–19 фракции; соответственно М – маркер молекулярной массы (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™).

Однако данный ген не является специфичным антигеном, ортологи CFP-10 присутствуют в геномах *M. leprae*, *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*, а также у других патогенных микобактерий. Сходство между ортологами варьируется от 63 до 80 % (Gey van Pittius et al., 2002). CFP-10 образует комплекс с ESAT-6. Данный комплекс способствует проникновению микобактерии в клетку. Существующие диагностические тесты, основанные на комбинации CFP-10 и ESAT-6, демонстрируют высокую чувствительность (Кудлай, Докторова, 2022).

Компоненты 25, 44, 48 кДа липидной природы предположительно соответствуют IprqP, IprqK, IprqQ, которые являются специфичными для *M. bovis* (Marri et al., 2006). Гены связаны с метаболизмом жирных кислот и липидным обменом, что имеет важное значение в жизненном цикле микобактерий. Состав и организация клеточной оболочки микобактерий очень сложны, что является отличительной особенностью рода *Mycobacterium*. Клеточная оболочка играет несколько ролей в микобактериальной инфекции, включая модуляцию созревания фагосом, биогенез гранулемы и участвует в способности бактерий адаптироваться ко изменениям окружающей среды (Chen et al., 2021). Одним из механизмов адаптации микобактерий в окружающей среде является изменением липидного состава клеточной стенки, что влияет на скорость роста, метаболическую активность, а также устойчивость к антибиотикам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Быстрая идентификация *M. bovis*, в окружающей среде имеет решающее значение для поддержания благоприятной эколого-эпидемиологической обстановки территории. *M. bovis* является одним из основных возбудителей туберкулеза животных, которые представляет серьезную угрозу для здоровья населения и приводят к крупным экономическим потерям. В результате выполнения исследования были выделены с использованием гель-фильтрационной хроматографии структурные компоненты *M. bovis* липидного и белкового происхождения. По результатам реакции иммуноблот установлено, что часть выделенных структурных компонентов серологически активны и могут быть использованы в качестве биологических маркеров для потенциальной идентификации микробного сообщества в окружающей среде. С гипериммунной сывороткой кролика против *M. bovis* реагировали структурные компоненты в диапазоне молекулярных масс от 10 кДа до 64 кДа. Особый интерес представляли компоненты белковой природы с молекулярной массой 10 кДа предположительно соответствующие CFP-10, выступающему в качестве индуктора T-клеток. Также интерес представляли структурные компоненты липидной природы с молекулярными массами 25 кДа, 44 кДа, 48 кДа потенциально соответствующие IprqP, IprqK, IprqQ, которые участвуют в механизме адаптации *M. bovis* при изменениях в окружающей среде.

Список литературы

- Кудлай Д. А., Докторова Н. П. Антигены ESAT-6 И CFP-10 как субстрат биотехнологической молекулы. Возможности применения в медицине // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12, № 3. – С. 439–449.
- Нуратинов Р. А., Месробян Н. Х. Экологические аспекты существования популяций микобактерий // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – Т. 2. – С. 3–9.
- Распоряжение Правительства Российской Федерации N 1225-р «Об одобрении Экологической доктрины Российской Федерации» [Электронный ресурс]. – Информационно-правовой портал КонсультантПлюс. – 2002. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_92097 (просмотрено 13.09.2022).
- Beer L. A., Speicher D. W. Protein Detection in Gels Using Fixation // Current protocols in protein science. – 2018. – Vol. 91, N 1. – P. 1–20.
- Северин С. Е., Соловьева Г. А. Практикум по биохимии: учебное пособие. – Москва: МГУ, 1989. – 509 с.
- Chen Y, Zhai W, Zhang K, Liu H, Zhu T, Su L, Bermudez L, Chen H, Guo A. Small RNA profiling in Mycobacterium insights into stress adapt ability // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12, N 4. – 752537–752252.
- Gey van Pittius N. C., Warren R. M., Van Helden P. D. ESAT-6 and CFP-10: what is the diagnosis // Infection and Immunity. – 2002. – Vol. 70, N 11. – P. 6509–6511.
- Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227, N 5259 – P. 680–685.
- Marri P. R., Bannantine J. P., Golding G. B. Comparative genomics of metabolic pathways in Mycobacterium species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer // FEMS Microbiology Reviews. – 2006. – Vol. 30, N 6. – P. 906–925.

Parsons S. D., McGill K., Doyle M. B., Goosen W. J., van Helden P. D., Gormley, E. Antigen-Specific IP-10 Release Is a Sensitive Biomarker of *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle // PLOS One. – 2016. – Vol. 11, N 5. – P. 155440–155450.

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. – 1979. – Vol. 76, N 9. – P. 4350–4354.

Tsai C. M., Frasch C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // Analytical Biochemistry. – 1982. – Vol. 119, N 1. – P. 115–119.

Van Ingen J., Boeree M. J., Dekhuijzen P. N., Van Soolingen D. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans // European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 15, N 10. – P. 888–893.

Waters W. R., Nonnecke B. J., Palmer M. V., Robbe-Austermann S., Bannantine J. P., Stabel J. R., Whipple D. L., Payeur J. B., Estes D. M., Pitzer J. E., Minion F. C. Use of recombinant ESAT-6: CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2004. – Vol. 11, N 4. – P. 729–735.

Tretiakova A. B., Valeeva A. R., Mukminov M. N. Obtaining antigenic components of *Mycobacterium bovis* for potential identification of microbial community in the environment // Ekosistemy. 2023. Iss. 34. P. 196–201.

The strategic goal of the state policy of the Russian Federation in the field of ecology is to preserve natural systems, improve the quality of life and health of the population. *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) is one of the main causative agents of tuberculosis in animals, leading to major economic losses and poses a serious threat to public health. A priority area for the development of new approaches to the identification of mycobacteria in the environment is the search for new biological markers. As a result of the study, structural components of *M. bovis* of lipid and protein nature were isolated with using gel filtration chromatography. The Western blot showed that some of the isolated structural components are serologically active and can potentially be used as a biological marker to identify a microbial community in the environment. Isolated structural components in the molecular mass range from 10 kDa to 64 kDa reacted with hyperimmune rabbit serum against *M. bovis*. Of particular interest to the marker are structural components of protein origin corresponding to a molecular mass of 10 kDa, presumably corresponding to CFP-10 acting as a T-cell inducer. Among the components of lipid nature, components with molecular mass of 25 kDa, 44 kDa, 48 kDa, presumably corresponding to *lppP*, *lppK*, *lppQ*, which are involved in the mechanism of adaptation of *M. bovis* under environmental changes, are of particular interest.

Key words: *Mycobacterium bovis*, gel-filtration chromatography, biological marker.

Поступила в редакцию 03.11.22

Принята к печати 30.12.22