

Получение и оценка клинической эффективности рекомбинантного антигена *T. pallidum* Tr0453 для диагностики сифилиса

Р.Ф. Хайруллин, А.В. Рунина, К.В. Рог, Н.В. Фриго, С.В. Ротанов

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России
107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

Цель. Получение нового рекомбинантного антигена *T. pallidum* Tr0453 и изучение эффективности его клинического использования при диагностике сифилиса.

Материал и методы. Для получения целевого рекомбинантного антигена *T. pallidum* фрагмент ДНК возбудителя сифилиса, кодирующий белок Tr0453, был клонирован в вектор рЕТ28а. Для наработки полученной генетической конструкции вектор вводили в штамм *E. coli* Top10, отбирая канамицин-устойчивые колонии. Специфичность клонирования подтверждена методом секвенирования по Сенгеру. Гетерологическую экспрессию рекомбинантного антигена *T. pallidum* проводили в штамме *E. coli* BL21 (DE3). Очистка рекомбинантного варианта белка *T. pallidum* Tr0453, содержащего дополнительную последовательность из 6 остатков гистидина на N-концевом участке молекулы, осуществлялась методом металл-хелатной хроматографии. Полученный гомогенный рекомбинантный белок *T. pallidum* Tr0453 был использован в качестве антигена для выявления специфических IgG к исследуемому белку в сыворотке больных сифилисом с использованием иммунологического биочипа.

Результаты и заключение. Применение полученного рекомбинантного белка позволило выявить антитела к *T. pallidum* в сыворотке крови больных сифилисом (первичным, вторичным, скрытым ранним и поздним). При исследовании сыворотки крови, полученной от здоровых доноров, антитела не обнаруживались. На основании приведенных данных можно сделать вывод о возможности использования полученного рекомбинантного белка в качестве дополнительного антигена для диагностики сифилиса. Включение нового антигена в тест-системы для диагностики сифилиса (в формате иммуноферментного анализа, иммуноблоттинга или иммуночипа) расширяет возможности серологической диагностики данного заболевания за счет увеличения спектра определяемых антител к *T. pallidum*.

Ключевые слова: **антигены *T. pallidum*, сифилис, рекомбинантные белки, Tr0453, биочипы.**

Production and evaluation of the clinical efficacy of the recombinant *T. pallidum* antigen Tp0453 for syphilis diagnosis

R.F. Khairullin, A.V. Runina, K.V. Rog, N.V. Frigo, S.V. Rotanov

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Korolenko str., 3, bldg 6, Moscow, 107076, Russia

Goal. Production of a recombinant *T. pallidum* antigen Tp0453 and the evaluation of the efficacy of its clinical use for syphilis diagnosis.

Materials and methods. To produce the target recombinant *T. pallidum* antigen, a Tp0453 protein coding fragment of the DNA of the causative agent of syphilis, was cloned into the pET28a vector. Heterological expression of the recombinant *T. pallidum* antigen was performed in the *E. coli* BL21 (DE3) strain. The recombinant Tp0453 six-histidine-tagged protein was purified by the metal-chelate affinity chromatography. The resulting homogenous recombinant *T. pallidum* Tp0453 protein was used to reveal specific IgG antibodies in the serum of syphilis patients using a microarray technology.

Results and conclusion. The use of the resulting recombinant protein enabled authors to reveal anti- *T. pallidum* antibodies in the blood serum of patients suffering from syphilis (primary, secondary, early and late latent syphilis). None of the uninfected controls had a significant reactivity to the recombinant Tp0453. These data allow to propose, that the recombinant protein Tp0453 show promise for laboratory diagnosis of syphilis.

The introduction of Tp0453 antigen into the test systems for diagnosis of syphilis (ELISA, immunoblotting or microarray) increases the potential of serodiagnosis of this disease due to the broader range of the revealed antitreponemal antibodies.

Key words: *T. pallidum* antigens, syphilis, recombinant proteins, Tp0453, microarrays.

Corresponding author: khairullin@cnikvi.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2013; 6: 73—79.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» на период 2012—2014 гг. Раздел I. Выполнение фундаментальных научных исследований. Наименование темы: «Поиск новых диагностически значимых антигенов возбудителя сифилитической инфекции» (Государственный контракт 114/БУ-2012-051 от 16.01.2012 г.).

Основным методом лабораторного исследования для выявления сифилиса является определение в крови пациентов антител к специфическим антигенам возбудителя заболевания *Treponema pallidum* [1—5]. В качестве наиболее специфических антигенов в составе диагностических тест-систем используются рекомбинантные аналоги антигенов *Treponema pallidum*: Tr15 (Tr0171), Tr17 (Tr0435), Tr47 (Tr0574), Tr44,5 (TrpA, Tr0768) [6, 7]. Тест-системы для серологических методов исследования на сифилис характеризуются высокими показателями чувствительности (97—99,7%), но не обладают 100% специфичностью. Диагностические свойства наборов реагентов для выявления сифилиса в значительной степени зависят от используемой производителями композиции антигенов *T. pallidum*, входящих в состав тест-системы. При этом показатели информативности иммунологических исследований существенно различаются при разных клинических формах заболевания, что может быть обусловлено уровнем экспрессии соответствующих антигенов *T. pallidum* и их доступности для иммунной системы больного [8]. В связи с этим актуальным представляется выявление, получение и изучение иммуногенности новых целевых антигенов *T. pallidum*, применение которых в диагностических тест-системах позволило бы повысить качество диагностики сифилиса.

Антиген Tr0453 является гипотетическим белком наружной мембраны возбудителя сифилиса. На локализацию белка на внешней мембране *T. pallidum* указывают как результаты биоинформатических расчетов [7, 9], так и экспериментальные исследования по иммунизации лабораторных животных [9]. Результаты биоинформатического поиска, проведенного по базе данных белковых последовательностей NCBI методами blastp и PSI-BLAST, показали, что белок Tr0453 специфичен для рода *Treponema* [7]. Предполагается, что этот белок участвует в транспорте липидов и гликолипидов через внешнюю мембрану *T. pallidum* [10]. Таким образом, в связи с предполагаемой локализацией белка Tr0453 на наружной мембране микроорганизма, указаниями на его высокую иммуногенность и отсутствие гомологов среди бактерий других родов данный белок представляет значительный интерес как целевой антиген для серодиагностики сифилиса.

Целью работы явилось получение рекомбинантного антигена *T. pallidum* Tr0453 и изучение клиниче-

ской эффективности его использования при диагностике сифилиса.

Материал и методы

В работе использовали клетки *E. coli*, штаммы BL21 (DE3) и Top10 (Invitrogen, США), плазмидный вектор для экспрессии pET28a (Novagen, США). Конъюгат козьих античеловеческих антител («Имтек», Россия) с флуорофором Cy5 был получен в соответствии с методикой производителя NHS-активированного флуоресцентного красителя (Biodue, Россия). Чистоту получаемых белков определяли электрофоретически в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия в 12% полиакриламидном геле по *U. Laemmli* [11]. Концентрацию белка определяли по методу *M. Bradford* [12].

Для определения антигенных свойств рекомбинантного белка использовали образцы сыворотки крови больных с диагнозом «сифилис», поступившие в Лабораторный центр ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России. Биообразцы отбирали на основе результатов иммунохимических (серологических) исследований: реакции микропреципитации с кардиолипидным антигеном, реакции быстрого плазмареагинового теста, реакции пассивной гемагглютинации, реакции непрямой иммунофлуоресценции (модификации РИФ_{агс} и РИФ₂₀₀), иммуноферментного анализа, регламентированных действующими нормативными документами.

Конструирование продуцента *E. coli* BL-21 (DE3) [pET28a-Tr0453]. Фрагмент гена *tp0453*, кодирующего последовательность белка Tr0453 без сигнального пептида, соответствующего аминокислотным остаткам 30—287, амплифицировали с помощью праймеров, сконструированных на основе последовательности гена *tp0453* (GenBank NC_000919.1). Для амплификации были разработаны праймеры: 0453F_NdeI и 0453R_VamH1stop (см. таблицу), которые содержали на 5'-конце сайты распознавания эндонуклеаз рестрикции NdeI и VamH1 соответственно (выделены полужирным шрифтом). Амплификация проводилась с использованием высокоточной полимеразы *Pfu* (Fermentas, Латвия) по следующей программе: 95 °C — 5 мин.; (95 °C — 30 с., 59 °C — 30 с., 72 °C — 5 мин.) 45 циклов; 72 °C — 7 мин.

Продукты полимеразной цепной реакции очищали от компонентов реакционной среды с помощью агарозного гель-электрофореза с последующим выделением целевого продукта с применением набора Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США). Амплифицированные фрагменты гена *tp0453* гидролизовали эндонуклеазами NdeI и VamH1 в двукратном Tango буфере и лигировали с плазмидой pET28a (Novagen, США), предварительно обработанной теми же эндонуклеазами. После гидролиза фрагменты и вектор проходили очистку с применением того же набора реагентов и лигировались (лигаза Fermentas, Латвия).

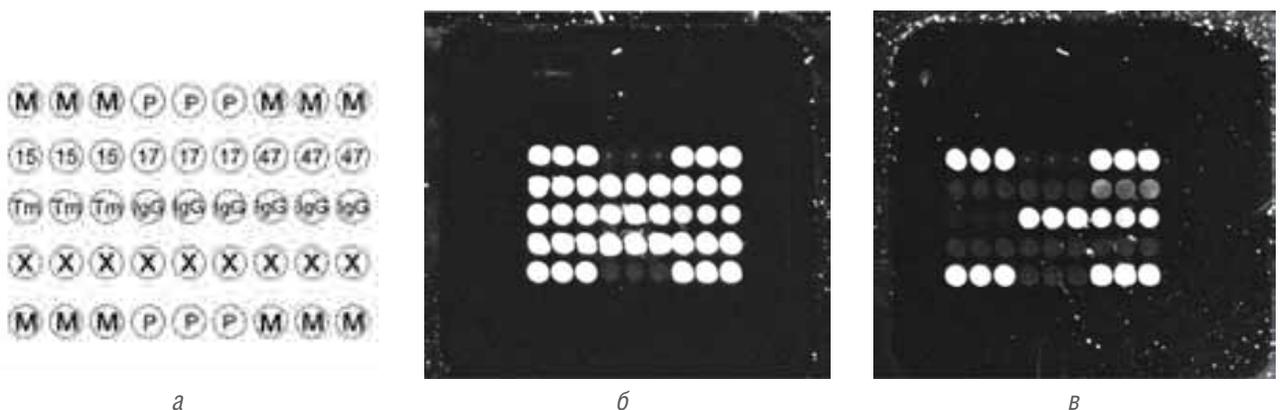
Очистку исследуемого рекомбинантного антигена возбудителя сифилиса проводили методом металл-хеллатной хроматографии. Для этого осветленную пробу наносили на хроматографическую колонку с 10 мл Ni-NTA-агарозы (GE Healthcare, США), уравновешенной с буфером А. Промывали колонку этим буфером до $A_{280} = 0$. Элюирование осуществляли линейным градиентом имидазола 0—400 мМ со скоростью 2 мл/ч в буфере А, объем фракций — 1 мл. Наличие целевого белка во фракциях элюата определяли с помощью денатурирующего электрофореза в 12% полиакриламидном геле. Фракции, которые содержали целевой белок, объединяли, диализовали против буфера А и концентрировали до объема 1 мл в ячейках для ультрафильтрации Amicon Ultra-4 Ultracel 10k с пределом исключения 10 кД. Полученный раствор повторно очищали на колонке с Ni-NTA-агарозой. Промывали колонку этим буфером до $A_{280} = 0$. Элюирование связанного белка Tr0453 осуществляли линейным градиентом имидазола 0—400 мМ со скоростью 2 мл/ч в буфере А, объем фракций — 1 мл. Наличие целевого белка во фракциях элюата определяли с помощью денатурирующего электрофореза в 12% полиакриламидном геле. Фракции, в которых было подтверждено содержание целевого белка, вновь объединяли, диализовали против буфера 50 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7,4 и концентрировали до объема 2 мл в ячейках для ультрафильтрации Amicon Ultra-4 Ultracel 10k с пределом исключения 10 кД.

Исследование антигенных свойств рекомбинантного белка Tr0453. Микропечать биочипа. Для исследования антигенных свойств рекомбинантного белка

Tr0453 была применена методика исследования на иммунологическом биочипе (рис. 2). В качестве подложки было использовано микроскопное предметное стекло с поверхностью, модифицированной аminosилановыми группами (Corning, США). Нанесение всех компонентов на стекло производилось методом контактной микропечати с применением комплекс-принтера для микропечати BioOdyssey Calligrapher MiniArray (Bio-Rad, США). Биочип содержал 16 тестовых участков — эрреев для проведения одновременного исследования 16 биообразцов. Каждый эррей содержал иммобилизованные в определенном порядке антигены (рис. 2).

Помимо рекомбинантного белка Tr0453 в качестве компонентов эррея были использованы трепонемные антигены Tr15, Tr17, Tr47, TmpA («Эколаб», Россия). Внутренним контролем служил человеческий IgG («Имтек», Россия). Кроме того, каждый эррей содержал отрицательный («холостой») контроль — участки с нанесенным фосфатно-солевым буфером и маркеры границы эррея — бычий сывороточный альбумин (БСА), конъюгированный с флуорофором Cy5. Маркеры границ эррея, отрицательные контроли и антигены Tr15, Tr17, Tr47, TmpA были нанесены на поверхности биочипа трехкратно, IgG — шестикратно, исследуемый рекомбинантный антиген Tr0453 — девятикратно.

Исследование биообразцов. На биочип сверху помещали ограничительную рамку (Whatman, США) так, чтобы каждый эррей полностью оказался в индивидуальной ячейке. Поверхность биочипа блокировали раствором Na-фосфатного буфера pH 7,4, содержащим 1% БСА, 0,1% Tween-20, в течение 15 мин. при 37 °С. Промы-



Биочип для исследования иммуногенности белка Tr0453:
 а — схема расположения антигенов в индивидуальном эррее: М — маркеры границ эррея; р — отрицательный контроль; 15, 17, 47, Тм — антигены *T. pallidum* Tr15, Tr17, Tr47, TmpA; IgG — иммуноглобулин человека класса G; X — исследуемый антиген Tr0453; б — результаты исследования на эррее, инкубированном сывороткой, полученной от больного сифилисом; в — результаты исследования на эррее, инкубированном с сывороткой здоровых доноров

вали биочип 3 раза рабочим раствором для отмывки (Na-фосфатный буфер pH 7,4, содержащий 100 ммоль NaCl, 0,1% Tween-20), внося в каждую ячейку по 70 мкл раствора. Далее в каждую ячейку биочипа вносили по 60 мкл исследуемой сыворотки крови, разведенной в 100 раз в Na-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,1% БСА, 0,1% Tween-20. Ограничительную рамку на биочипе заклеивали пленкой и инкубировали в течение 30 мин. на термошейкере с вращением платформы 250 об/мин при 37 °С. После этого удаляли содержимое из ячеек и проводили их промывку. В каждую рабочую ячейку биочипа вносили по 60 мкл рабочего раствора конъюгата, заклеивали пленкой и инкубировали 30 мин. на термошейкере при 37 °С. Затем содержимое ячеек удаляли и проводили их промывку, снимали ограничительную рамку, биочип ополаскивали дистиллированной водой и высушивали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 5 мин.

Учет и интерпретация результатов образования комплексов антиген — антитело на биочипе. Детекция комплексов антиген — антитело на поверхности биочипа по окончании исследования образцов сыворотки крови осуществлялась на флуоресцентном сканере ChipReader Vers Array (Bio-Rad, США) при разрешении 10 мкм и длине волны эмиссии флуоресцентного красителя 670 нм.

Обработку результатов серологического исследования на биочипе проводили с помощью программного обеспечения к сканеру, оценивая интенсивность флуоресценции участков нанесения соответствующих антигенов на поверхности биочипа и фонового сигнала поверхности эррея. В качестве сигнала фона принимали значение интенсивности флуоресценции в участках эррея, соответствующих участкам с нанесенным буфером для печати, — отрицательный контроль.

Величина возбужденного флуоресцентного сигнала, полученная с участков нанесения специфического антигена, считалась значимой, а результат исследования положительным, свидетельствующим о присутствии в изучаемой сыворотке крови соответствующего антитела, если интенсивность флуоресценции превышала среднее квадратичное значение флуктуации интенсивности фонового сигнала. Если же интенсивность флуоресценции, измененная на участке эррея с нанесенным антигеном, не превышала среднее квадратичное значение фонового сигнала, то результат исследования оценивался как отрицательный, свидетельствующий об отсутствии антител к изучаемому антигену в тестируемом образце.

Проведенное иммунологическое исследование с биочипом считалось валидным при наличии положительного сигнала с участков внутреннего контроля, соответствующих иммобилизованным IgG.

Результаты и обсуждение

Для получения препаративного количества и дальнейшего изучения иммуногенности целевого белка была разработана технология получения рекомбинантного варианта белка Tr0453.

В результате работы был получен гомогенный по данным денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле рекомбинантный вариант белка *T. pallidum* Tr0453 (рис. 3). Молекулярная масса выделенного рекомбинантного белка по данным электрофоретического анализа составляла около 30 кД, что хорошо согласуется с теоретической молекулярной массой, определенной для фрагмента белка без сигнального пептида (30,8 кД).

Очищенный рекомбинантный белок *T. pallidum* Tr0453 был использован в качестве антигена для выявления специфических IgG в сыворотке больных сифилисом на иммунологическом биочипе. Для исследования антигенных свойств белка Tr0453 путем определения соответствующих антител к нему в крови больных сифилисом были использованы образцы сыворотки крови, полученные от больных с разными клиническими формами сифилиса: первичным ($n = 16$ образцов), вторичным ($n = 16$), скрытым ранним ($n = 16$) и поздним ($n = 16$). В качестве группы контроля при-

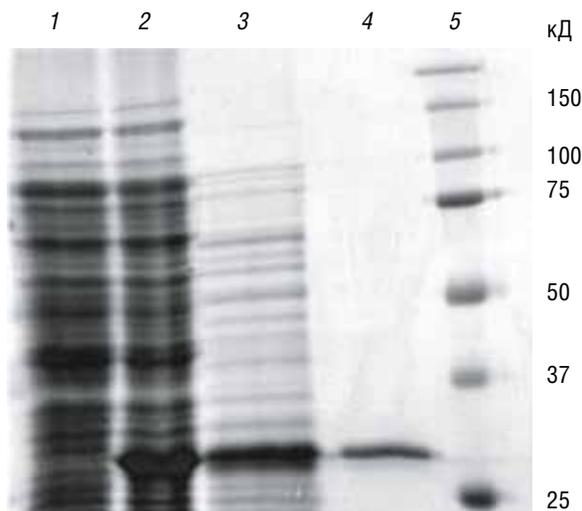


Рис. 3. Профиль белков на разных стадиях очистки рекомбинантного белка Tr0453: 1 — суммарный белковый препарат после разрушения неиндуцированных клеток штамма-продуцента; 2 — суммарный белковый препарат после разрушения индуцированных клеток; 3 — хроматография на Ni-NTA-сефарозе; 4 — повторная хроматография на Ni-NTA-сефарозе; 5 — стандарты молекулярной массы белков

меняли сыворотку крови ($n = 16$), полученную от здоровых доноров, без указаний в анамнезе на заболевание сифилисом и с отрицательными результатами исследования в регламентированных серологических тестах на сифилис.

Предварительное исследование наличия специфических антител к белку Tr0453 показало, что полученный рекомбинантный белок специфически реагирует со всеми образцами сыворотки крови, полученными от больных сифилисом первичным, вторичным, скрытым ранним и поздним, что свидетельствовало о высокой чувствительности исследования. При изучении образцов сыворотки крови, полученных от здоровых доноров, антитела не были обнаружены, что характеризует исследование как обладающее высокой специфичностью.

Заключение

На основании приведенных данных можно сделать вывод о перспективности использования полученного рекомбинантного белка в качестве до-

полнительного антигена для иммуносерологических исследований, предназначенных для диагностики сифилиса.

Включение нового антигена в состав иммуносорбентов в наборах реагентов для диагностики сифилиса (в формате иммуноферментного анализа, иммуноблоттинга или иммуночипа) расширяет возможности серологической диагностики данного заболевания за счет увеличения спектра определяемых антител к *T. pallidum*.

Особый интерес белок Tr0453 представляет для диагностики ранних форм сифилиса, что особенно актуально в свете развития реверсивных алгоритмов скрининга населения на сифилис.

Для уточнения антигенных свойств целевого белка Tr0453 необходимо провести исследования на большем количестве образцов сыворотки крови больных сифилисом с учетом возможной иммунологической кросс-реактивности в случаях инфекционных заболеваний, вызванных боррелиями, лептоспирами и другими представителями рода спирохет. ■

Литература

- Chereshnev V.A., Patrusheva N.B., Beykin Ya.B. i dr. Sifilis: Immunitet i laboratornaya diagnostika. Ekaterinburg: UrO RAN; 2006. [Черешнев В.А., Патрушева Н.Б., Бейкин Я.Б. и др. Сифилис: Иммуниет и лабораторная диагностика. Екатеринбург: УрО РАН; 2006.]
- Sokolovskiy E., Frigo N., Rotanov S. Rukovodstvo po laboratornoy diagnostike sifilisa v stranakh Vostochnoy Evropy. Vestn dermatol i venerol 2008; (1): 87—96. [Соколовский Е., Фриго Н., Ротанов С. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах Восточной Европы. Вестн дерматол и венерол 2008; (1): 87—96.]
- Ovchinnikov N.M., Bednova V.N., Delektorskiy V.V. Laboratornaya diagnostika zabolevaniy, peredayushchikhsya polovym putem. M: Meditsina; 1987. [Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. М: Медицина; 1987.]
- Kitaeva N.V., Frigo N.V., Melekina L.E. Aktual'nye problemy sifilidologii. Sovremennye tekhnologii diagnostiki sifiliticheskoj infektsii. Vestn dermatol i venerol 2008; (5): 51—59. [Китаева Н.В., Фриго Н.В., Мелехина Л.Е. Актуальные проблемы сифилидологии. Современные технологии диагностики сифилитической инфекции. Вестн дерматол и венерол 2008; (5): 51—59.]
- Kitaeva N.V., Frigo N.V., Rotanov S.V., Khayrullin R.F. Prospects of using proteome technologies in the diagnostics of sexually transmitted infections and skin diseases. Vestn dermatol i venerol 2010; (4): 17—27. [Китаева Н.В., Фриго Н.В., Ротанов С.В., Хайруллин Р.Ф. Перспективы диагностического использования протеомных технологий в диагностике ИППП и заболеваний кожи. Вестн дерматол и венерол 2010; (4): 17—27.]
- Sambri V., Marangoni A., Simone M. et al. Evaluation of recomWell Treponema, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 200—205.
- Khayrullin R.F., Rotanov S.V., Frigo N.V., Belousova A.V. Bioinformatic analysis of *T. pallidum* specific antigens. Vestn dermatol i venerol 2012; (5): 56—64. [Хайруллин Р.Ф., Ротанов С.В., Фриго Н.В., Белоусова А.В. Биоинформатический анализ специфических антигенов *T. pallidum*. Вестн дерматол и венерол 2012; (5): 56—64.]
- Carlson J.A., Dabiri G., Cribier B., Sell S. The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity. Am J Dermatopathol 2011; 33: 433—460.
- Cox D.L., Luthra A., Dunham-Ems S. et al. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum*. Infect Immun 2010; 78: 5178—5194.
- Luthra A., Zhu G., Desrosiers D.C. et al. The transition from closed to open conformation of *Treponema pallidum* outer membrane-associated lipoprotein Trp0453 involves membrane sensing and integration by two amphipathic helices. J Biol Chem 2011; 286: 41656—41668.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680—685.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248—254.

об авторах:

Р.Ф. Хайруллин — к.х.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

А.В. Рунина — лаборант-исследователь отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

К.В. Рог — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Н.В. Фриго — д.м.н., заместитель директора по научно-образовательной работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

С.В. Ротанов — д.м.н., доцент, врач Лабораторного центра ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва