

ТрF1 — новый потенциальный антиген для серодиагностики скрытых форм сифилитической инфекции

А.В. Рунина, К.В. Рог, М.М. Васильев

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

В современной диагностике инфекций, передаваемых половым путем, большое внимание уделяется поиску новых диагностически значимых антигенов, в частности антигенов возбудителя сифилиса *T. pallidum*. Настоящая статья описывает получение рекомбинантного белка ТрF1, цитоплазматического бактериоферритина *T. pallidum*, и исследование его иммуногенности на образцах сыворотки крови, полученных от больных различными формами сифилитической инфекции и от здоровых добровольцев.

Проведена гетерологическая экспрессия белка ТрF1 в клетках *E. coli* и очистка полученного ТрF1 с помощью аффинной хроматографии на металл-хелатном сорбенте. Далее рекомбинантный ТрF1 использовали в качестве антигена для определения специфических IgG к исследуемому белку в сыворотках крови больных первичным, вторичным, и ранним/поздним скрытым сифилисом. Показано, что антитела к ТрF1 обнаруживаются на всех стадиях сифилиса, однако их уровень у больных вторичным, ранним и поздним скрытым сифилисом статистически достоверно отличался от такового в группе здоровых добровольцев. Наибольшее различие было отмечено в группах скрытого сифилиса. Полученные данные характеризуют белок ТрF1 как перспективный антиген для диагностики сифилитической инфекции. Кроме этого, ТрF1 можно расценивать как потенциальный антиген для проведения дифференцированной диагностики скрытых форм сифилиса.

Ключевые слова: антигены *T. pallidum*, рекомбинантные белки, ТрF1 (Тр1038), скрытые формы сифилиса, диагностика ИППП.

Контактная информация: bel4788@gmail.com. Вестник дерматологии и венерологии 2014; (6): 86—92.

TpF1 — a new potential antigen for serological diagnostics of latent forms of syphilis

A.V. Runina, K.V. Rog, M.M. Vasilev

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

The current diagnostics of sexually transmitted diseases is focused on the search for new diagnostically important antigens, especially antigens of *T. pallidum* that causes syphilis. This article describes the recovery of the recombinant protein TpF1, a cytoplasmic bacterioferritin of *T. pallidum*, and a study of its immunogenicity in blood serum samples taken from patients with different forms of syphilis and from healthy volunteers.

The authors performed a heterologous expression of the TpF1 protein in *E. coli* cells and purified the recovered TpF1 by means of metal-chelate affinity chromatography. The recombinant TpF1 was further used as an antigen for the determination of specific IgG for this protein in serum samples taken from patients suffering from primary, secondary and early/late latent forms of syphilis. According to the study results, anti-TpF1 antibodies are present at all stages of syphilis yet the level of such antibodies revealed in the groups of patients suffering from secondary, early and late latent forms of syphilis was statistically significantly different from the level of antibodies in the group of healthy volunteers. The greatest difference was observed in the groups of latent syphilis.

These data characterize the TpF1 protein as a promising antigen for the diagnostics of syphilis, and TpF1 can also be considered as a potential antigen for the differential diagnostics of latent forms of syphilis.

Key words: *T. pallidum* antigens, recombinant proteins, TpF1 (Tp1038), latent forms of syphilis, diagnostics of STDs.

■ 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.).

Разработка высокочувствительных и высокоспецифичных методов диагностики сифилитической инфекции на основе рекомбинантных антигенов имеет ключевое значение для лечения данного социально значимого заболевания.

Применяемые в настоящее время диагностические системы имеют наибольшую чувствительность и специфичность на стадии вторичного сифилиса, тогда как первичная и скрытые формы данного заболевания не всегда могут быть успешно и вовремя диагностированы.

Предыдущие исследования показали присутствие множества иммуногенных белков в протеоме бледной трепонемы [1, 2], и среди них были найдены антигены с высокой серореактивностью в случаях скрытых форм сифилитической инфекции. В работе M. Brinkman и соавт. из 908 клонированных трепонемных антигенов 90 были выбраны для оценки их серореактивности на разных стадиях заболевания [1]. Для 38 белков были получены высокие значения серореактивности хотя бы на одной из стадий сифилиса: для 14 белков были обнаружены антитела на каждой стадии заболевания, что делает их универсальными диагностическими антигенами; 6 белков не вызывают иммунный ответ на стадии раннего скрытого сифилиса и, по мнению авторов, могут считаться маркерами первичной сифилитической инфекции; 11 белков показали серореактивность только на группе сывороток крови больных скрытой формой сифилиса, и эти белки предположительно обуславливают гуморальный иммунный ответ и соответственно могут быть мишенями для формирования клеток памяти и протективного иммунитета к *T. pallidum* [1]. В их числе белок бактериоферритин TrF1 (Trp1038).

Антиген TrF1 описан [1] как цитоплазматический 12-мерный белок *T. pallidum*, участвующий в депонировании ионов железа. 12 мономеров TrF1 (с молекулярной массой ~20 кД каждый) образуют сферическую структуру, характерную для миниферритинов других бактерий, таких как, например, Dlp2 *Bacillus anthracis* и HP-NAP *Helicobacter pylori* [3]. Обращенные внутрь сферы заряженные аминокислотные остатки каждого из мономеров способны связывать один ион железа, однако его точное положение относительно структуры ферритина в настоящий момент не определено [3].

Иммуногенность белка TrF1 была показана как в работах с рекомбинантным вариантом этого антигена,

так и в скрининге нативных белков бледной трепонемы [1, 2]. Высказывается предположение, что иммунный ответ определяется N-концевой частью мономера, которая выдается на поверхности 12-мерного комплекса TrF1 [3]. Кроме того, есть также данные, свидетельствующие о высокой иммуногенности TrF1 в олигомерной форме [2]. Результаты этих исследований позволяют предположить, что TrF1 не только является диагностически значимым иммуногенным белком протеома *T. pallidum*, но и может служить мишенью для разработки диагностических методик различных форм сифилитической инфекции.

Целью настоящего исследования явилось получение и очистка рекомбинантного белка TrF1 и исследование его иммуногенности на выборке сывороток крови больных первичным, вторичным, ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом, а также на выборке сывороток крови здоровых добровольцев.

Материал и методы

Получение экспрессионного вектора pET28a-Trp1038. Исходным материалом для амплификации, кодирующей белок TrF1 последовательности гена *Trp1038*, была геномная ДНК *T. pallidum* штамма Nichols (GenBank NC_000919.1: 1134809..1135342). Амплификацию проводили с использованием высокоточной полимеразы *Pfu* (Евроген, Россия) в рекомендованных производителем условиях полимеразной цепной реакции (ПЦР). Прямой и обратный праймеры (прямой 5'-GAACATGTGTACAGATGGAAAAA-3' и обратный 5'-TCAGGCTTTCAGGGTAGCAC-3'), фланкирующие кодирующую последовательность гена *Trp1038*, содержали на 5'-концах сайты распознавания рестрикционных эндонуклеаз *NdeI* и *XhoI* соответственно для последующего встраивания продукта ПЦР (594 п. о.) в экспрессионный вектор pET28a (Novagen, США) таким образом, чтобы в итоге рекомбинантный белок содержал аминокислотную последовательность из шести гистидинов с N-конца. ПЦР проводили по следующей программе амплификации: 95 °C — 5 мин; 45 циклов (95 °C — 30 с, 59 °C — 30 с, 72 °C — 5 мин); 72 °C — 7 мин.

После амплификации наличие ПЦР-продукта соответствующей длины проверяли с помощью агарозного гель-электрофореза (2% агарозный гель, окрашивание бромидом этидием). Далее полученный ПЦР-продукт очищали с помощью набора для очистки фрагментов ДНК из агарозного геля и ПЦР-смеси Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США).

Подбор условий рестрикции с двумя рестрикционными эндонуклеазами проводили с учетом рекомендаций сервера Thermo Double Digest (Thermo Scientific, США). Реакция рестрикции проводилась в буфере O (Thermo Scientific, США) с эндонуклеазами *NdeI* и *XhoI* (Thermo Scientific, США) в течение 3 ч при 37 °C. Па-

раллельно проводились реакции рестрикции ПЦР-продукта, экспрессионного вектора pET28a и контрольная рестрикция ДНК фага лямбда (Fermentas, Литва). Результаты рестрикции экспрессионного вектора pET28a и ДНК фага лямбда проверялись гель-электрофорезом в 0,7% агарозном геле с окрашиванием бромидом этидием.

После проведения рестрикции ПЦР-продукт кодирующей последовательности гена *Trp1038* и экспрессионный вектор pET28a очищали с помощью набора для очистки фрагментов ДНК Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США). ПЦР-продукт лигировали в экспрессионный вектор pET28a с применением T4 ДНК-лигазы (Fermentas, Латвия) в условиях согласно рекомендациям производителя. Свежезамороженные компетентные клетки *E. coli* TOP10 смешивались с лигированным экспрессионным вектором и выдерживались при 4 °С в течение получаса. После этого клетки нагревали до 42 °С в течение 2 мин и охлаждали на льду, после чего выращивали с добавлением среды 2xTY при 37 °С в течение 30 мин и рассевали на агаризованную среду 2xTY с канамицином (50 мг/мл) в течение ~12 ч (ночи) при 37 °С.

Наличие кодирующей последовательности гена *Trp1038* в экспрессионном векторе *pET28a-Trp1038* в полученных единичных колониях *E. coli* проверялось с помощью ПЦР и секвенирования по Сенгеру. Для этого использовали праймеры, комплементарные последовательности вектора pET28a, фланкирующие сайты встраивания кодирующей последовательности гена *Trp1038*: прямой 5'-АТТААТАСГАСТСАСТАТАГГ GGAATTG-3' и обратный 5'-GTTATGCTAGTTATTGCTC AGCGGT-3'.

Экспрессия целевого белка TrpF1 в клетках E. coli. После проверки последовательности экспрессионного вектора *pET28a-Trp1038* клетки соответствующей колонии выращивали в 5 мл среды 2xTY с 50 мг/мл канамицина при 37 °С и постоянном перемешивании 100 об/мин, затем из полученной клеточной культуры выделяли плазмидную ДНК набором Plasmid Miniprep (Евроген, Россия). Плазмидную ДНК далее использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* BL-21(DE3) (Novagen, США) по описанной выше методике.

После трансформации одиночную колонию BL-21(DE3) с экспрессионным вектором *pET28a-Trp1038* выращивали в 5 мл среды 2xTY с 50 мг/мл канамицина в течение ночи при 37 °С, затем ночную культуру инокулировали в 500 мл свежей среды 2xTY с 50 мг/мл канамицина и выращивали при 37 °С и постоянном перемешивании 100 об/мин до достижения оптической плотности $A_{600} = 0,4-0,5$. Далее индуцировали экспрессию рекомбинантного белка TrpF1 добавлением к культуре ИПТГ (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 1 мМ и выращивали в течение 3 ч при 37 °С и постоянном перемешивании 100 об/мин.

Клетки с наработанным рекомбинантным белком TrpF1 осаждали центрифугированием при 4 °С, 3000 об/мин в течение 20 мин и затем клеточный осадок лизировали в 100 мМ фосфатном буфере с 10 мМ трис-НСI и 8 М мочевиной, рН 8,0. Полученный гомогенат центрифугировали при 4 °С, 15 000 об/мин в течение 60 мин, снимали надосадочную жидкость и фильтровали ее через фильтр с размером пор 0,45 м (Millipore, США). Наличие целевого рекомбинантного белка (20,8 кД) в полученном лизате подтверждали с помощью денатурирующего гель-электрофореза в 14% полиакриламидном геле (ПААГ) и окраской Кумасси G250.

Хроматографическая очистка рекомбинантного белка TrpF1. Очистку полученного рекомбинантного белка проводили методом аффинной хроматографии на сорбенте Sepharose Ni-NTA (GE Healthcare, Великобритания). Колонку уравнивали 100 мМ фосфатным буфером с 10 мМ трис-НСI и 8 М мочевиной, рН 8,0. После нанесения лизата хроматографическую колонку промывали тем же буфером с 50 мМ имидазолом, а затем элюировали целевой белок линейным градиентом концентрации имидазола от 50 до 500 мМ в ранее указанном буфере для нанесения и промывки хроматографической колонки. Наличие целевого белка определяли с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза в 14% ПААГ с последующей окраской Кумасси G250.

Фракции, содержащие белок TrpF1 в гомогенном состоянии, объединяли, диализировали против 100 мМ фосфатного буфера с 10 мМ трис-НСI, рН 8,0, концентрировали в фильтрационных колонках Amicon Ultra-4 Ultracel с пределом исключения 10 кД и определяли концентрацию целевого белка по методу Бредфорда (Bradford, 1976).

Иммуноферментный анализ (ИФА) белка TrpF1 на выборке сывороток крови больных сифилисом и здоровых добровольцев. Для исследования иммуногенности белка TrpF1 были применены образцы сыворотки крови следующих групп больных: 20 больных первичным сифилисом, 21 больного вторичным сифилисом, 20 больных скрытым ранним сифилисом и 16 больных скрытым поздним сифилисом. В качестве группы контроля применяли сыворотку крови (9 образцов) здоровых добровольцев, не имевших в анамнезе указаний на заболевание сифилисом и показавших отрицательные результаты исследования в регламентированных серологических тестах на сифилис.

Очищенный рекомбинантный белок TrpF1 наносили в концентрации 2 нг/мл в 100 мМ фосфатном буфере на 96-луночные плашки высокой сорбции (Greiner BioOne, Германия), после связывания белка плашки блокировали 1% БСА (бычий сывороточный альбумин) в 100 мМ фосфатном буфере и хранили до проведения анализа при 4 °С.

Сыворотки крови пациентов и здоровых добровольцев разводили 1/100 в буфере, содержащем в конечной концентрации 100 мМ дигидрофосфат натрия, 0,1% БСА и 0,05% tween-20. Для каждой сыворотки реакция ИФА проводилась в двукратной повторности. В качестве положительного контроля применяли сыворотку крови больного сифилисом, показавшего положительный результат исследования в регламентированных серологических тестах на сифилис. Для определения значения фонового поглощения реакции использовали фосфатный буфер без добавления сыворотки. Нанесенные на плашку растворы инкубировали 1 ч при 37 °С, затем конъюгировали с вторичными антителами к человеческому Fc-фрагменту (конъюгат с пероксидазой хрена). В каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора хромогена о-фенилендиамина (Thermo Scientific, США) в цитратном буфере с 0,03% перекисью водорода и инкубировали в темноте в течение 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 М HCl в каждую лунку и считывали оптическую плотность реакции ИФА при длине волны 492 нм (A_{492}).

Результаты и обсуждение

Получение и очистка рекомбинантного TrF1. Выделение TrF1 из клеток *E. coli* проводилось в условиях, позволяющих перевести нерастворимый рекомбинантный белок в тельцах включения в растворимую форму. Дальнейшая очистка TrF1 с помощью металл-аффинной хроматографии на сефарозном сорбенте с ионами никеля в качестве хелатирующего агента позволила получить высокоочищенные фракции данного рекомбинантного белка (рис. 1). В результате металло-хелатной хроматографии в денатурирующих условиях был получен гомогенный, по данным электрофореза, раствор искомого рекомбинантного белка TrF1.

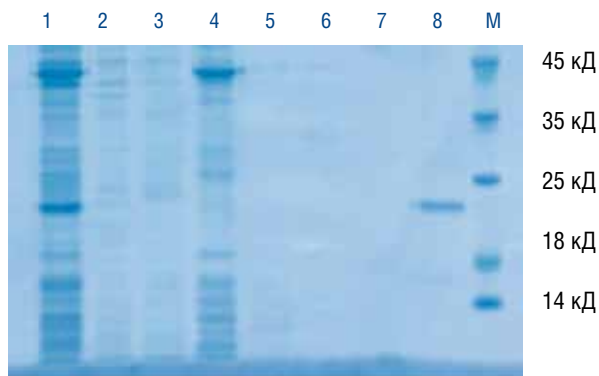


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ фракций очистки рекомбинантного TrF1 (20,8 кД) с помощью аффинной хроматографии: 1 — лизат, наносимый на колонку; 2—4 — отмывка колонки; 5—8 — элюирование белка градиентом концентрации имидазола 50—500 мМ

Имуноферментный анализ (ИФА). Полученный белок TrF1 после диализа использовали в качестве антигена для твердофазного ИФА с сыворотками больных различными формами сифилиса. ИФА оценивали по значению A_{492} продукта окисления хромогена о-фенилендиамина пероксидазой хрена, характеризующему количество связавшихся с рекомбинантным TrF1 антител IgG из исследуемых сывороток крови (таблица).

Полученные результаты сравнивались между группами больных различными формами сифилиса, а также с группой здоровых добровольцев (рис. 2).

Таблица

Результаты ИФА для групп пациентов с различными формами сифилиса и здоровых добровольцев

Группа	Число пациентов	Значения поглощения реакции ИФА A_{492}		Превышение фонового значения поглощения**	
		среднее значение	стандартное отклонение	среднее значение	стандартное отклонение
Первичный сифилис	20	0,072	0,014	1,296	0,256
Вторичный сифилис	21	0,088	0,013	1,591*	0,233
Ранний скрытый сифилис	20	0,101	0,021	1,829*	0,385
Поздний скрытый сифилис	16	0,102	0,034	1,832*	0,702
Здоровые добровольцы	8	0,062	0,007	1,108	0,126
Отрицательный контроль без сыворотки — фоновые значения ИФА	8	0,055**	0,005	1	0,088

Примечание. * — данные, превышающие пороговое значение 1,5; ** — фоновое значение поглощения ИФА.

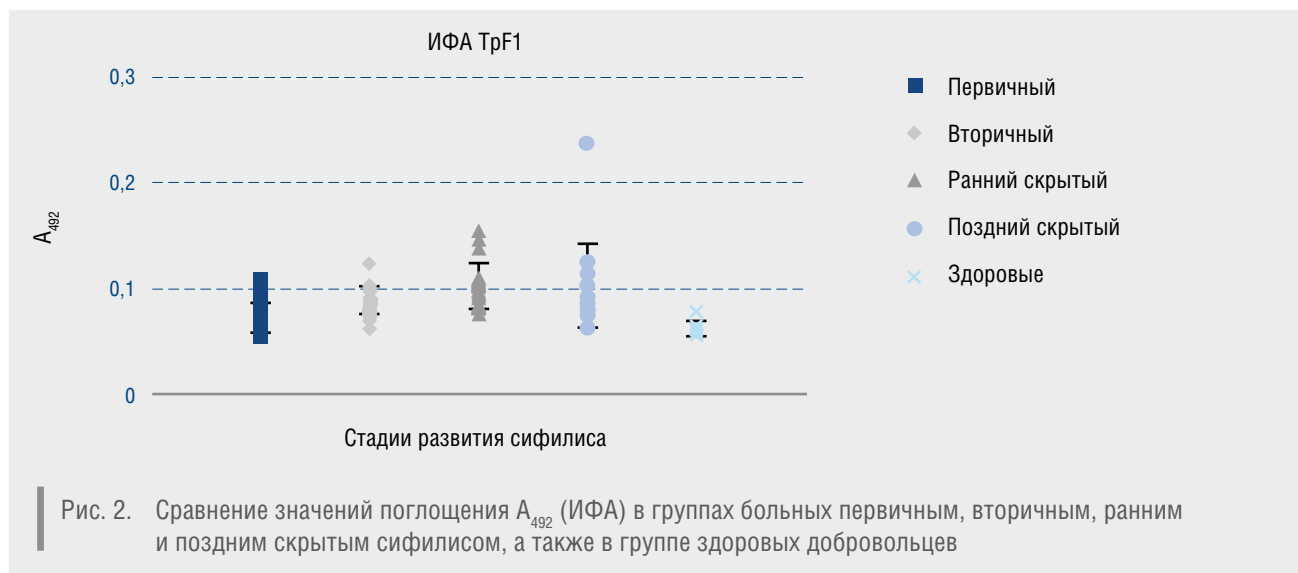


Рис. 2. Сравнение значений поглощения A_{492} (ИФА) в группах больных первичным, вторичным, ранним и поздним скрытым сифилисом, а также в группе здоровых добровольцев

Анализ данных ИФА. Статистический анализ полученных данных ИФА проводили с помощью программного обеспечения AtteStat по критерию Манна — Уитни для непарных выборок с поправкой на множественное сравнение (поправка Бонферрони). В качестве порогового значения статистически значимых различий выборок было принято $p < 0,05$.

Результаты ИФА показали, что значения поглощения в группе здоровых доноров не отличались от фоновых значений поглощения A_{492} ($p = 0,249$). Также показано, что антитела к TrF1 присутствуют на всех стадиях развития сифилиса, однако значительные концентрации указанных антител были обнаружены в группах больных вторичным, ранним и поздним скрытым сифилисом (превышение порогового значения в 1,5 раза). Наибольшее значение было получено в группах скрытого сифилиса (1,829 и 1,832), что согласуется с опубликованными данными предыдущих исследований [1]. В работе M. Brinkman и соавт. превышение порогового значения 1,5 для TrF1 было получено только в группе образцов больных ранним скрытым сифилисом, которое превышало фоновое значение более чем в 2 раза, а в группах первичного и вторичного сифилиса эти значения были 1,1 и 0,8 соответственно [1].

При сравнении групп больных сифилитической инфекцией с группой здоровых добровольцев было выявлено, что различие значений поглощения A_{492} для группы больных первичным сифилисом было

статистически недостоверно по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p = 0,568$). Однако результаты ИФА TrF1 всех остальных групп больных значительно отличались от результатов группы здоровых добровольцев: $p = 0,001$ для группы вторичного сифилиса, $p = 0,0005$ для группы раннего скрытого и $p = 0,002$ для группы позднего скрытого сифилиса.

Наибольшее количество антител к TrF1 было обнаружено в группе больных ранним скрытым сифилисом. Полученные значения поглощения A_{492} статистически значимо отличались от таковых у больных первичным сифилисом ($p = 0,0001$), но практически не отличались от значений поглощения A_{492} в группе больных вторичным сифилисом ($p = 0,227$) и были на одном уровне со значениями поглощения A_{492} в группе больных поздним скрытым сифилисом ($p = 3,558$). Описанные результаты согласуются с данными, приведенными в публикации С. Jiang и соавт., которые подтвердили высокий уровень антител к TrF1 в сыворотке крови больных разными формами сифилитической инфекции с чувствительностью 93,3% для раннего сифилиса и 100% для всех остальных форм сифилиса [4].

На основании полученных результатов можно заключить, что TrF1 является не только перспективным антигеном для диагностики сифилитической инфекции, но и дает возможность проведения дифференцированной диагностики скрытых форм сифилиса. ■

Литература

1. Brinkman M.B., McKeivitt M., McLoughlin M., Perez C., Howell J., Weinstock G.M., Norris S.J., Palzkill T. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome. *J Clin Microbiol* 2006 Mar; 44 (3): 888—91.
2. McGill M.A., Edmondson D.G., Carroll J.A., Cook R.G., Orkiszewski R.S., Norris S.J. Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum* proteome. *Infect Immun*. 2010 Jun; 78 (6): 2631—43.
3. Thumiger A., Polenghi A., Papinutto E., Battistutta R., Montecucco C., Zanotti G. Crystal structure of antigen TpF1 from *Treponema pallidum*. *Proteins* 2006 Mar 15; 62 (3): 827—30.
4. Jiang C., Zhao F., Xiao J., Zeng T., Yu J., Ma X., Wu H., Wu Y. Evaluation of the recombinant protein TpF1 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis. *Clin Vaccine Immunol* 2013 Oct; 20 (10): 1563—8.

об авторах: ▶

А.В. Рунина — научный сотрудник 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

М.М. Васильев — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отделения инфекционных урогенитальных заболеваний ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье