

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВСЕРОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО ЭПИДЕМИОЛОГОВ, МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ
КОМПАНИЯ «С-ИНФО», Лтд

ЖУРНАЛ

МИКРОБИОЛОГИИ

ЭПИДЕМИОЛОГИИ

И

ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор Б. Ф. СЕМЕНОВ

А. К. АКАТОВ, В. Д. БЕЛЯКОВ (заместитель главного редактора),
И. Н. БЛОХИНА, В. М. БОНДАРЕНКО (ответственный секретарь),
А. А. ВОРОБЬЕВ, Ю. В. ВЕРТИЕВ, Л. В. КОВАЛЬЧУК, В. М. КОРШУ-
НОВ, В. Ю. ЛИТВИН, В. В. МАЛЕЕВ, А. А. МОНИСОВ, М. И. НАРКЕВИЧ,
Г. Г. ОНИЩЕНКО, В. И. ПОКРОВСКИЙ, В. П. СЕРГИЕВ, В. В. СЕРГЕЕВ
(ответственный секретарь), Ю. П. СОЛОДОВНИКОВ, А. А. ТОТОЛЯН,
Ф. А. ТУМАНОВ, А. Ф. ФРОЛОВ, Н. Д. ЮЩУК

Научные редакторы: С. Н. КУЗЬМИН, Р. М. ТЕМПЕР

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

3

МАЙ-ИЮНЬ

МОСКВА 1993

«С-ИНФО», Лтд

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 1993
УДК 579.842.23.083.3

*В. Н. Степаншина, Т. А. Гремякова,
А. П. Анисимов, В. Д. Потапов*

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА рН6-АНТИГЕНА *YERSINIA PESTIS*, ВЫДЕЛЕННОГО ИММУНОСОРБЦИОННЫМ МЕТОДОМ

ВНИИ прикладной микробиологии, Оболенск,
Московская область

Одним из важнейших аспектов изучения чумной инфекции является исследование антигенного состава *Yersinia pestis*. Основные антигены возбудителя чумы: капсульный антиген (F1), «мышинный» токсин (Тох), V-антиген, белки внешних мембран (YOPs), фибринолизин-коагулаза (Fib-Coa) и рН6-антиген являются детерминантами вирулентности; часть из них участвует в развитии иммунного процесса [1, 12, 13]. Проведение исследований с целью получения противочумных синтетических вакцин, создание широкого ассортимента диагностикумов, изучение роли отдельных компонентов в инфекционном процессе практически невозможны без наличия высокоочищенных антигенных препаратов. Однако большинство антигенов *Y. pestis* до настоящего времени в гомогенном состоянии не получено [2, 4].

В данной работе представлены результаты экспериментальных исследований по очистке и изучению свойств рН6-антигена.

Материалы и методы.

Характеристика штаммов бактерий, использованных в работе, представлена в таблице.

Культивирование штамма *Y. pestis* 358/12P⁻ проводили в колбах с бульоном Хоттингера рН 6,0 при 37 °С и аэрации в течение 2 сут.

Фенотипическая характеристика штаммов

Штамм	Характеристика	Источник получения
<i>Y. pestis</i> EV	F1 ⁺ , Tox ⁺ , V ⁺ , YOPs ⁺ , Fib-Coa ⁺ , рН6 ⁺ , Pgm ⁻	Музей живых культур ВНИИПМ
<i>Y. pestis</i> EV11M	F1 ⁻ , Tox ⁻ , V ⁻ , YOPs ⁻ , Fib-Coa ⁻ , рН6 ⁺ , Pgm ⁻	То же
<i>Y. pestis</i> 358/12P ⁻	F1 ⁻ , Tox ⁻ , V ⁺ , YOPs ⁺ , Fib-Coa ⁺ , рН6 ⁺ , Pgm ⁻	» »

Культуральную жидкость использовали в качестве источника рН6-антигена. Культуру, не содержащую рН6-антиген, получали выращиванием на плотных питательных средах при рН 7,2 и температуре 28 °С. Клетки смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР) рН 7,2, доводили (по стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича) до концентрации 10⁹ кл/мл и использовали как отрицательный контроль.

Электрофоретический контроль антигенного препарата осуществляли по U. Laemmli [16]. Изоэлектрическое фокусирование проводили согласно инструкции фирмы LKB (Швеция), прилагаемой к стандартным пластинам. Концентрацию белка определяли по Bradford [11]. Иммунохимическую активность тестировали в реакции иммунопреципитации по O. Ouchterlony [17]. Определение рН6-антигена проводили в реакции иммунопреципитации и иммуноэлектрофореза [15] с использованием соответствующей коммерческой сыворотки производства ВНИПЧИ «Микроб». Монорецепторную сыворотку получали подкожной иммунизацией кроликов массой 2,5 кг электрофоретически гомогенным препаратом рН6-антигена в количестве 250 мкг с неполным адъювантом Фрейнда в соотношении 1 : 1. Инъекции повторяли 4 раза с интервалом в 1 нед. Через 7 дней после заключительного введения препарата из ушной

вены отбирали кровь и получали сыворотку. Выделение глобулиновой фракции проводили по Н. Харбоу [9].

Нативные эритроциты получали разведением крови 4,3 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 с последующим 3-кратным отмыванием ЗФР. Формалинизацию эритроцитов проводили по П. И. Меньшову и М. Ф. Шмуттеру [6].

Часть эритроцитов обрабатывали 1-2 % глутаровым альдегидом в течение 30 и 120 мин. Эритроциты использовали для постановки реакции гемагглютинации (РГА). Специфичность РГА проверяли с помощью препаратов F1-антигенов коммерческого и выделенного из штамма *E. coli*, содержащего рекомбинантную плазмиду рFS1 [14].

Суспензию альвеолярных макрофагов (АМФ) получали 2-кратной перфузией легких морской свинки физиологическим раствором и помещали в пластиковые чашки Петри (диаметр 40 мм) для осаждения фагоцитов. После образования монослоя АМФ физиологический раствор заменяли средой 199, содержащей 10 % фетальной сыворотки, 200 ммоль глутамин, и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в среде с 5 % CO₂. Неприлипшие клетки АМФ отмывали физиологическим раствором. Количество жизнеспособных фагоцитов определяли методом прижизненной окраски 1 % трипановым синим. Затем монослой АМФ отмывали от красителя и помещали в среду Хенкса без фенолового красного с 10 % фетальной сыворотки. После добавления рН6-антигена к монослою АМФ чашки помещали на 2 ч в условия, указанные выше. Цитотоксичность определяли процентным отношением поврежденных макрофагов к общему количеству фагоцитов в монослое.

Для определения влияния рН6-антигена на фагоциты и инактивацию АМФ к монослою фагоцитов добавляли бактериальную взвесь клеток *Y. pestis* EV, приготовленную из расчета 10 клеток на 1 АМФ. Затем чашку помещали на 3 ч для инкубирования. После удаления нефагоцитированных клеток часть образцов фиксировали для подсчета фагоцитарного ин-

декса (ФИ) методом световой микроскопии [8]. Другую часть образцов после механического разрушения использовали для определения жизнеспособных микробных клеток высевом на плотную питательную среду. Количество активированных АМФ определяли микроскопически, подсчетом распластанных фагоцитов.

Результаты и обсуждение.

Антиген рН6 выделяли из культуральной жидкости. Первая стадия очистки заключалась в солевом осаждении и фракционировании препаратом сульфата аммония при 40 % насыщения. Осадок отделяли центрифугированием при 18 тыс. об/мин в течение 15 мин. Препарат, ресуспендированный в 0,02 М натрий-фосфатном буфере рН 7,0, диализовали против буфера того же состава и наносили на иммунный сорбент.

Сорбент готовили следующим образом: 30 г сефарозы 4В промывали на стеклянном фильтре 400 мл 0,001 М соляной кислоты рН 3,0. Затем ее ре-суспендировали в 30 мл 0,001 М соляной кислоты и добавляли BrCN до 1 % конечной концентрации. BrCN растворяли в суспензии сефарозы на магнитной мешалке в течение 20-30 мин и титровали концентрированной гидроокисью натрия до рН 11,8. После 5 мин экспозиции соляной кислотой доводили рН до 4,0 и отмывали активированную сефарозу 600 мл 0,001 М соляной кислоты на стеклянном фильтре под тягой.

IgG выделяли из монорецепторной сыворотки высаливанием сульфатом аммония при 25 % насыщения. Осадок отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 30 мин, промывали 1,75 М раствором сульфата аммония и повторно центрифугировали. Затем его перерастворяли в 0,1 М CH_3COONa рН 8,4 с 0,5 М NaCl, смешивали с активированной сефарозой и оставляли при комнатной температуре на 3 ч. Оставшиеся свободные группы блокировали раствором глицина, после чего иммунную матрицу промывали, чередуя 0,1 М ацетатный буфер рН 4,0 с 0,1 М NaCl и 0,1 М боратный буфер рН 8,0 с 0,1 М NaCl, и уравни-

вали 0,02 М натрий-фосфатным буфером рН 7,0. Емкость матрицы составляла 40-50 мг по гомогенному белку.

Для обеспечения более полной сорбции антигена иммунным сорбентом эту операцию проводили при комнатной температуре в течение часа. В связи с высоким сродством рН6-антигена к иммунному сорбенту были проведены дополнительные эксперименты по подбору соответствующих элюентов. В присутствии 0,2 М глицин-HCl-буфера рН 2,5; 0,05 М ацетатного буфера рН 4,0; 5 % NH_4OH рН6-антиген частично терял серологическую активность. Препарат более устойчив к воздействию 4 М хлористого магния и 3 М роданида калия. Указанные соли не вызывали снижения активности препарата при контакте в течение 18 ч. Для элюции рН6-антигена использовали 3 М роданид калия.

Удаление избытка солей и концентрирование препарата осуществляли ультрафильтрацией. Выделенный препарат в реакции иммунопреципитации с поливалентной гипериммунной сывороткой формировал одну линию преципитации (рис. 1). Полученный результат подтвержден данными иммуноэлектрофореза.

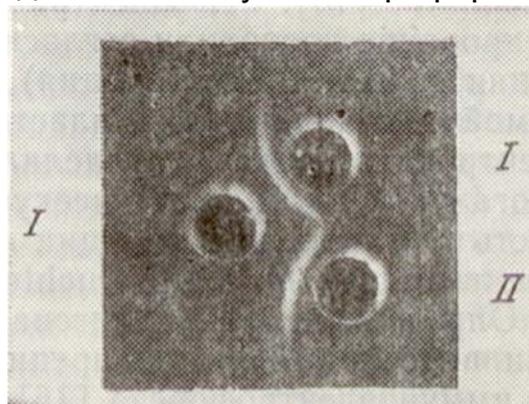


Рис. 1. Иммунопреципитация рН6-антигена. I - анти-рН6-сыворотка; I, II справа - образцы рН6-антигена.

В нативном состоянии по данным гель-фильтрации рН6-антиген имеет мол. массу более 1 млн. Д.

В SDS-диск-электрофорезе (в 10 % ПААГ) препарат образует фрагменты с идентичной мол. массой ~ 13000 Д (рис. 2). Изоэлектрическая точка P_i

препарата равна 4,2. Субъединичная структура и молекулярная масса рН6-антигена аналогична пиллям адгезии [4]. Значение изоэлектрической точки для рН6-антигена ниже, чем для пилей адгезии (Рi 4,65-4,70) [4]. Это может быть связано с тем, что для определения изоэлектрической точки пилей адгезии авторы

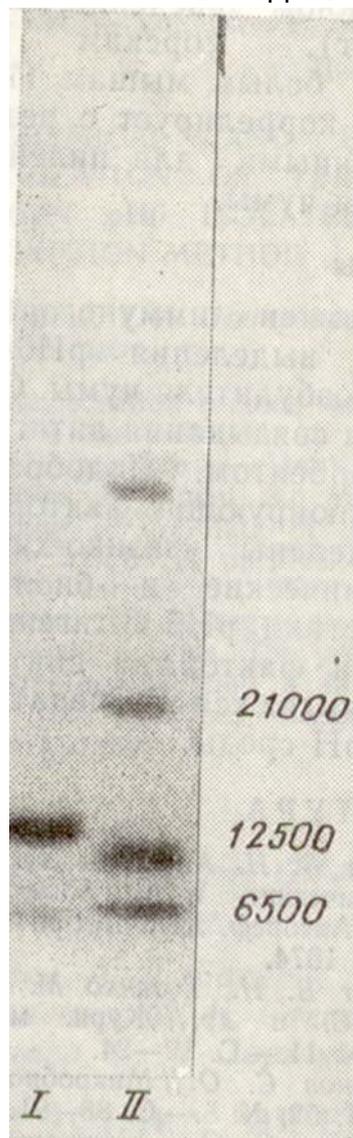


Рис. 2. Электрофореграмма рН6-антигена.
I - рН6-антнген; II - белковые маркеры.

использовали частично очищенный препарат, который давал несколько полос преципитации с коммерческой чумной агглютинирующей сывороткой.

Антигенные свойства выделенного белка определяли путем иммунизации кроликов. Полученные моновалентные сыворотки характеризовались высокой специфической активностью. Титры в реакции иммунопреципитации составляли 1 : 64.

Тождественность биологических свойств рН6-антигена и пилей адгезии исследовали в РГА. При изучении гемагглютинирующей активности препаратов нативного внутри- и внеклеточного рН6-антигена установлено, что нативный внеклеточный очищенный антиген агглютинирует эритроциты в концентрации 0,1-0,2 мкг/мл. По данным С. О. Водопьянова, в зависимости от штамма бактерий пили адгезии вызывают склеивание эритроцитов в концентрации 0,5-3 мкг/мл [4].

Внутриклеточный рН6-антиген обнаруживали в РГА при концентрации неочищенного белка 250 мкг/мл. Такая разница гемагглютинирующей активности может быть не только следствием преобладания других белков, но и свидетельством слабой активности антигена вследствие его мономерного строения внутри клетки. Можно полагать, что полимеризация антигена, а возможно, и некоторая модификация имеют место во время или после транспорта субъединиц через клеточную стенку бактерий.

Гемагглютинирующая активность микробных суспензий при культивировании при 28 °С отсутствует. Выращивание в течение 24 ч при 28 °С, а затем 24 ч при 37 °С приводит к появлению гемагглютинирующей активности в среде с рН 6,4. Культивирование бактерий при 37 °С и рН 6,4 также способствует появлению гемагглютинирующей активности. Контрольные культуры, выращенные при нейтральном рН 7,2 и температуре 28 °С, не обладали способностью агглютинировать эритроциты. Минимальная концентрация клеток, выявляемых в этой реакции, составила 10^7 кл/мл. Значимых различий в продукции рН6-антигена между штаммами *Y. pestis* EV11M и 358/12 не обнаружено.

Таким образом, синтез рН6-антигена детерминирован двумя факторами: температурой культивирования (37 °С) и низким значением рН среды. Это характерно и для пилей адгезии [3].

В работе Л. Н. Сердобинцева и соавт. [7] отмечена способность капсульного антигена возбудителя чумы штамма EV НИИЭГ к прямой агглютинации эритроцитов. При электронной мик-

роскопии клеток, выращенных при 37 °С, выявлено наличие в составе его капсулы фимбриеподобных образований длиной 15 нм. Мы проверили гемагглютинирующую активность коммерческого капсульного антигена и выделенного нами из этого же штамма, очищенного до гомогенного состояния. При концентрации капсульного антигена 2 мг/мл гемагглютинацию эритроцитов не наблюдали. Возможно, авторы работы [7] выращивали бактерии в закисленной среде, что и обусловило синтез пилей адгезии, являющихся причиной феномена гемагглютинации.

С целью изучения биологического действия рН6-антигена было проверено влияние его на альвеолярные макрофаги морских свинок. Количество жизнеспособных макрофагов при действии рН6-антигена в концентрации 10 мкг/мл уменьшалось на 28±9 % по сравнению с интактной популяцией АМФ. Цитотоксичность рН6-антигена менее выражена в отношении фагоцитов, полученных от иммунных морских свинок. В данном случае отмирало 15±6 % АМФ.

В опытах с зимозаном установлено, что рН6-антиген (100 мкг/мл) ингибирует 30 % фагоцитов этих частиц относительно контроля. Количество АМФ, активированных зимозаном совместно с рН6-антигеном, снижается на 23±5 % по сравнению с контролем. Это, видимо, обусловлено ингибирующим действием рН6-антигена на рецепторы АМФ для веществ полисахаридной природы.

Выявлено влияние рН6-антигена на интенсивность фагоцитоза штамма EV альвеолярными макрофагами. ФИ для клеток, инкубированных с рН6-антигеном (10 мкг/мл), увеличивался по сравнению с контролем на 30 %. Количество жизнеспособных микробных клеток внутри АМФ возрастало на 53 %. Вероятно, рН6-антиген наряду с цитотоксическим действием на макрофаги способен снижать их бактерицидность [5].

Согласно S. Ben-Efraim [10], рН6-антиген обладает способностью вызывать воспалительную реакцию при внутрикожном введении. Это выявлено и в нашем

эксперименте. Внутрикожное введение кроликам рН6-антигена в дозе 1 мг приводило к развитию воспалительного процесса в месте инъекции, купированного через 7-14 дней. Этот эффект исчезал при уменьшении дозы антигена до 0,1 мг, а также при обработке его формалином. Очищенный рН6-антиген не токсичен при подкожном введении кроликам (1000 мкг), морским свинкам (625 мкг), белым мышам (100 мкг). Это также коррелирует с результатами, полученными для пилей адгезии возбудителя чумы.

Выводы

Предложен иммуносорбционный метод для выделения рН6-антигена возбудителя чумы. Отработаны условия связывания антигена с иммунным сорбентом. Подобраны оптимальные элюирующие факторы.

Определены физико-химические, иммунохимические и биологические характеристики рН6-антигена. Определяющими факторами синтеза рН6-антигена являются температура 37 °С и низкий рН среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вейнблат В. И. Антигены *Yersinia pestis*: (Биохимические и иммунологические аспекты): Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. - Саратов, 1974.
2. Вейнблат В. И., Титенко М. М., Веренков М. С. и др. // Журн. микробиол. - 1985. - № 11. - С. 19-24.
3. Водопьянов С. О. // Микробиол. журн. - 1990. - Т. 52, № 5. - С. 88-91.
4. Водопьянов С. О., Мишанькин Б. Н. // Там же. - № 6. - С. 13-17.
5. Водопьянов С. О., Попова Т. О., Васильева Т. И., Мишанькин Б. Н. // Журн. микробиол. - 1990. - № 3. - С. 3-8.
6. Меньшов П. Я., Шмуттер М. Ф. // Пробл. особо опасных инфекций. - 1969. - Вып. 5. - С. 202-203.
7. Сердобинцев Л. И., Карпунина Л. В., Коннов И. П. и др. // Биотехнология, иммунология и биохимия особо опасных инфекций. - Саратов, 1989. - С. 25—31.
8. Учитель И. Я. Макрофаги в иммунитете. - М., 1978. - С. 32.
9. Харбоу И., Ингильд А. // Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. - М., 1981.
10. Bichowsky-Slomminski L., Ben-Efraim S. // J. Bacteriol. - 1963. - Vol. 86, N 1. - P. 101-111.
11. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. - 1976. - Vol. 72, N 1. - P. 248-254.

12. *Brubaker R. R.* // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 1972. – Vol. 57. – P. 112-158.
13. *Burrows T. W.* // *Brit. Med. Bull.* – 1962. – Vol. 18. – P. 69-73.
14. *Galyov E. E., Smirnov O. Yu., Karlishev A. V.* // *FEBS Lett.* – 1990. – Vol. 277, N 1, 2. – P. 230-232.
15. *Grabar P., Williams C. A.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1953. – Vol. 10. – P. 193-194.
16. *Laemmli U. K.* // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
17. *Ouchterlony O.* // *Acta. Path. Microbiol. Scand.* – 1949. – Vol. 26. – P. 507-515.

Поступила 14.08.91

PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF YERSINIA PESTIS ANTIGEN pH6 ISOLATED BY THE IMMUNOSORPTION METHOD

*V. N. Stepanshina, T. A. Gremyakova,
A. P. Anisimov, V. D. Potapov*

The immunosorption method was shown to be suitable for the isolation of antigen pH6, thus making it possible to obtain a highly active preparation. As eluent, 3.0 M KSCN was used. According to the data of gel filtration, the molecular weight of purified antigen pH6 exceeds 1×10^6 daltons. In SDS disk electrophoresis antigen pH6 is segregated into subunits of ~ 130,000 daltons. The preparation induces inflammatory reaction if introduced intradermally and possesses hemagglutinating and cytotoxic activity.