

УДК: 579.841.93:616-07:61-097

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.3.37

ПОЛУЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО О-АНТИГЕНА БРУЦЕЛЛ, СИНТЕЗИРОВАННОГО В ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

Хаммадов Н.И.^{1,2*} – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5669-1486); Громова Е.А.¹ – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0416-6193); Горбунова М.Е.¹ – канд. биол. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0707-2117); Галеева А.Г.^{1,2} – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-2650-6459); Косарев М.А.¹ – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-5587-486X); Усольцев К.В. – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5279-9836); Ефимова М.А.^{1,2} – д-р биол., наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-8786-1310)

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

² ФГБОУ ВО Казанский ГАУ Институт "Казанская академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана"

* nikhammadov@mail.ru

Ключевые слова: крупный рогатый скот, бруцеллез, рекомбинантный О-антиген, антитела, иммуноферментный анализ (ИФА)

Keywords: cattle, brucellosis, recombinant O-antigen, antibodies, enzyme immunoassay (ELISA)

Поступила: 15.06.2025

Принята к публикации: 26.08.2025

Опубликована онлайн: 15.09.2025



РЕФЕРАТ

Бруцеллез представляет собой опасное зоонозное заболевание, вызываемое бактериями рода *Brucella*, которое оказывает существенное негативное влияние на продуктивность сельскохозяйственных животных. В Российской Федерации успехи в борьбе с данным заболеванием у крупного рогатого скота связаны с использованием вакцины, созданной на основе штамма *Brucella abortus* 82, а также своевременным выявлением инфицированных животных. Настоящая работа посвящена получению и изучению серологической активности рекомбинантного О-антигена для индикации антител против бруцеллеза. В результате проведения поисковых запросов в базе данных GenBank нами идентифицирована аминокислотная последовательность О-полисахаридного антигена бруцелл – WP_002967174.1. Данную последовательность оптимизировали для трансляции белка на культуре клеток млекопитающих, синтезировали и клонировали в плазмиду pVAX1. Нарботку pVAX1 проводили путем трансформации клеток *Escherichia coli* штамма DH5α методом теплового шока, с селекцией по гену устойчивости к канамицину с дальнейшим выделением и очисткой плазмидной ДНК. Трансфекция клеток HEK293 полу-

ченной генетической конструкцией приводила к экспрессии целевого антигена, факт наличия которого в жидкости, отобранной с клеточной культуры, установили с помощью вертикального электрофореза в 12 % ПААГ по результату визуализации мажорных паттернов на уровне 70 кДа. В результате ионообменной и гель-фильтрационной хроматографии удалось получить очищенный О-антиген в растворенном виде в концентрации 4,7 мг/мл. Полученный препарат был применен в разведении 10 мкг/мл, в качестве антигена, при проведении непрямого твердофазного ИФА для индикации антител в сыворотках крови крупного рогатого скота против S и R антигена бруцелл. Коэффициент специфичности рассчитывали относительно данных ИФА с сывороткой крови в разведении 1:256. Так при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против *Brucella abortus* коэффициент специфичности составил 6,29, против S и R антигенов бруцелл – 6,1 и 6,77 соответственно. Результаты исследования могут внести значительный вклад в развитие методов диагностики и лечения бруцеллеза, а также в создание новых вакцинных препаратов.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Бруцеллез – это опасное зоонозное заболевание, вызываемое бактериями рода *Brucella*, которое оказывает негативное воздействие на продуктивность сельскохозяйственных животных [1], а в случае инфицирования человека приводит к его пожизненной инвалидности [2]. На протяжении последних десяти лет в Российской Федерации (РФ) отмечается неустойчивая эпидемиологическая ситуация по данному заболеванию [3]. Наибольшее количество заражений регистрируется на территориях Северо-Кавказского, Южного и Приволжского федеральных округов [4]. Изучение опыта борьбы с бруцеллёзом крупного рогатого скота в разных странах показывает, что эффективность противозoonотических мер напрямую зависит от уровня научной проработки и практического применения специфических вакцин. В РФ успехи в борьбе с данным зоонозным заболеванием тесно связаны с широким применением и научно обоснованным использованием вакцины, созданной на основе штамма *Brucella abortus* 82. К тому же основой контроля и предупреждения распространения бруцеллеза является своевременное выявление инфицированных животных с использованием бактериологических, серологических и молекулярных методов диагностики [5]. Важно отметить, что окончательное подтверждение диагноза возможно исключительно при успешном выделении *Brucella* spp. от животных, демонстрирующих серопо-

зитивные результаты. В контексте серологической диагностики наиболее релевантными и широко применяемыми методиками являются реакция связывания компонента (РСК), реакция радиальной иммунодиффузии (РБП) и иммуноферментный анализ (ИФА) [6].

Антигены гладкого липополисахарида (S-ЛПС), локализованные на поверхности клеточной стенки, играют ключевую роль в разработке серологических тест-систем для диагностики бруцеллеза. Особое внимание следует уделить О-полисахаридной (О-PS) части S-ЛПС, которая является наиболее доступной для антигенного взаимодействия на поверхности клеток бруцелл [7]. Такой О-полисахаридный антиген обладает высокой иммуногенностью и играет важную роль в дифференциации различных серотипов бруцелл, что делает его значимым для эпидемиологических исследований и разработки серологических диагностикумов.

Наиболее оптимальным подходом к конструированию тест-систем является использование рекомбинантных антигенов, поскольку это позволяет значительно минимизировать биологические риски [8], связанные с использованием живых штаммов бруцелл, стандартизировать анализ [9], дифференцировать поствакцинальные антитела от антител естественно инфицированных животных [10].

Таким образом, можно предположить, что использование специализированных диагностических тестов, основанных на применении синтетических аналогов мик-

робных антигенов, представляет собой перспективное направление в повышении точности и эффективности выявления бруцеллеза.

Цель работы – получить в эукариотической системе рекомбинантный О-антиген бруцелл для специфичной индикации антител против возбудителей бруцеллеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

В качестве референтной последовательности использовали аминокислотную последовательность О-полисахаридного антигена бруцелл сохраненную из базы данных GenBank Интернет-ресурса NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) – WP_002967174.1 (MULTISPECIES: O-antigen ligase family protein [Brucella]). Физико-химические показатели аминокислотной последовательности анализируемого антигена рассчитывали в онлайн-сервисе «Protein calculator» (<https://perccalc.com/protein-calculator.php>). Модификацию аминокислотной последовательности О-полисахаридного антигена в нуклеотидную проводили в интернет-ресурсе IDT (<https://www.idtdna.com>). Полученная последовательность была синтезирована и клонирована в вектор pVAX1 в компании «Евроген» (г. Москва). Наличие генетической вставки в составе рекомбинантной плазмиды, а также её нуклеотидная последовательность были верифицированы посредством метода секвенирования по Сэнгеру, проведенного в ЗАО «Евроген» (г. Москва).

Рекомбинантной плазмидой были трансформированы химически компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH5 α , при помощи метода теплового шока согласно протоколу F.M. Ausubel [11]. Культуру трансформированных клеток, содержащих модифицированную плазмиду с интегрированным геном, культивировали в 50 мл жидкой питательной среды LB (Lysogeny broth) с добавлением канамицина (50 мкг/мл). Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* осуществляли набором Plasmid Miniprep (ЗАО «Евроген», Россия), в соответствии с инструкцией

производителя. Концентрацию выделенной плазмиды измеряли с помощью спектрофотометра UV5Nano (Mettler Toledo, США).

Клетки почек эмбриона человека HEK293 («БиолоТ», Россия) культивировали в среде DMEM с 10% фетальной бычьей сывороткой (Hyclone, Австралия), 20 мМ L-глутамина и 100 ЕД/мл пенициллина-стрептомицина («Панэко», Россия) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Трансфекцию клеток HEK293 выполняли кальций-фосфатным методом согласно следующему протоколу: за 48 ч до трансфекции клетки были посеяны на культуральные чашки диаметром 150 мм («Corning», США) в количестве $1,5 \times 10^6$ в объеме 10 мл полной ростовой среды и инкубированы при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Двухкратный HBS-буфер 2xHBS (NaCl – 280 мМ, KCl – 10 мМ, Na₂HPO₄ – 1,5 мМ, декстроза / глюкоза – 12 мМ, HEPES pH 7,05 – 50 мМ) объемом 600 мкл был смешан с равным объемом ДНК (20 мкг) и 2,5 М СаCl₂ и инкубирован в течение 20 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании, после чего трансфекционную смесь каплями добавляли к культуральной среде. Через 6 ч трансфекционную смесь аспирировали, клетки трижды промывали фосфатно-буферным раствором (PBS) и вносили свежую культуральную среду. Экспрессию целевого антигена клетками HEK293 устанавливали с помощью вертикального электрофореза в полиакриламидном геле. Для этого готовили 5 % концентрирующий гель (3,4 мл воды, 0,82 мл 30 % акриламида, 0,63 мл трис-HCl буфера, pH 6,8, 50 мкл додецилсульфата натрия, 50 мкл персульфата аммония, 5 мкл TEMED) и 12,5 % разделяющий гель (1,89 мл воды, 4,16 мл 30 % акриламида, 3,75 мл трис-HCl буфера, pH 8,8, 100 мкл додецилсульфата натрия, 100 мкл персульфата аммония). Электрофорез проводили после нанесения в лунки геля лизированных клеточных образцов (4x лизирующая смесь: 0,5 М трис-HCl буфер, pH 6,8, 14,5 М β -меркаптоэтанол, 10 % додецилсульфата натрия, 1 % бром-

фенолового синего, 40 % глицерола; режим лизиса – 5 мин при 95 °C) в объеме 20 мкл при напряжении 140 В в электродном трис-глициновом буфере (pH 8,3) с использованием камеры «Mini-PROTEAN® Tetra» («Bio-Rad», США). После проведения электрофореза гели выдерживали в фиксирующем растворе (10 % ледяной уксусной кислоты, 25 % изопропанола) в течение 15 мин, затем окрашивали раствором Кумасси R-250 в течение 1 ч и выдерживали в отмывающем буфере с нагревом до удаления фона (7 % ледяной уксусной кислоты, 25 % изопропанола).

После получения продуктов экспрессии и трансляции проводили первичную очистку белка по средствам катионной ионообменной хроматографии, после чего осуществляли хроматографию с применением гель-фильтрации на колонке ENrich Sec70 и хроматографе NGC (BioRad, США) согласно протоколу, сгенерированному программным обеспечением прибора (для хроматографии с использованием колонки ENrich Sec70) «ChromLab». Концентрацию белка в препарате рекомбинантного антигена определяли с использованием спектрофотометра UV5Nano (Mettler Toledo, США).

В исследовании применяли сыворотку крови крупного рогатого скота, содержащую антитела против *B. abortus*, а также S и R антигенов бруцелл, входящие в состав дифференциального набора для постановки реакции агглютинации «Набор для дифференциальной серологической диагностики бруцеллеза и контроля иммунного ответа крупного рогатого скота, иммунизированного вакциной из штамма *B. abortus* 82» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Россия). В качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) применяли сыворотку крови не инфицированного бруцеллами крупного рогатого скота (из того же диагностического набора).

Полученный антиген разводили на карбонат-бикарбонатном буфере (КББ) до концентрации 10 мкг/мл и синсбилизировали им планшет ВНИИ

(«Медполимер», Россия) в объеме 100 мкл на лунку и инкубировали 3 ч при 37 °C. Содержимое лунок удаляли и отмывали три раза фосфатно-буферным раствором (ФБР) с добавлением 0,5% Твин-20 (ФБР-Т). Для определения минимального титра антител сыворотки вносили в объеме 4 мкл в первые лунки планшета в разведении 1:25 на ФБР и титровали методом последовательных двукратных разведений (последнее разведение 1:256). В процессе тестирования сывороток в одном разведении в качестве рабочего использовали разведение 1:25. Планшет с образцами инкубировали 1 ч при 37°C. Содержимое лунок удаляли и отмывали три раза фосфатно-буферным раствором (ФБР) с добавлением 0,5% Твин-20 (ФБР-Т). Во все лунки планшета вносили по 100 мкл антивидового конъюгата IgG крупного рогатого скота («Sigma», США) в разведении 1:20000 на ФБР и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Содержимое лунок удаляли и отмывали пять раз ФБР-Т. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл ТМБ и инкубировали в темном месте при комнатной температуре (22±2°C) в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку планшета по 50 мкл 0,5М серной кислоты. Учет результатов ИФА осуществляли на спектрофотометре Multiskan GO («ThermoFisher», США) при длине волны 450 нм. Коэффициент специфичности определяли, как отношение значения оптической плотности, полученного в реакции с каждым наименованием сыворотки (отдельно, с S и R антителами) к значению оптической плотности полученного в реакции с отрицательным контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В результате проведения поисковых запросов в базе данных GenBank нами была идентифицирована аминокислотная последовательность О-полисахаридного антигена бруцелл: msniv-trtrtdarmpdatgpqarirrialviasvifgvllisfrpftpaggaetetggdiinqlgfscvgavalasmamfanlrklagiirp gwlvmlvflfasfssdpatavrqvlittvgivaiiavlvpqdgdgysallvsasvvisyagvvlpslghgdaiepqnsflwrgvfshkniagpvmavfafaglylwrrgwktsgllgl

salgfvstgskttmalvpfamllvlpglmglrkltaglifa
iqlafatfifgvvlfepirrlvenmdvdatfgrvsiwkfalea
lskrpwtgygyesfwssayarhaarpyyldwdvrgivhg
hnsyldvamtmgipallcaiaivivmplvhyarcpvren
mlladfflmivlfgtlnammesfyfrmdpvwltlilaifgl
gmtakvvipkrsv (GenBank:
WP_002967174.1) (рисунок 1). Трехмер-
ная модель антигена, построенная с помо-
щью программы SWISS-MODEL, которая
доступна в сети «интернет» по адресу
<https://swissmodel.expasy.org>.

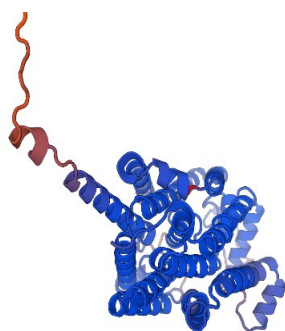


Рисунок 1 – Трехмерная модель
О-полисахаридного антигена.

В целях подбора оптимальной экс-
прессионной системы, пригодной для
наработки наибольшего количества бел-
кового продукта, используемая аминокис-
лотная последовательность была проана-
лизирована на пептидном калькуляторе. В
ходе анализа было определено, что моле-
кулярный вес аминокислотной последова-
тельности, состоящий из 441 аминокис-
лот, равен 47,88 кДа, коэффициент экс-
тинкции — 65290 M-1cm-1, изоэлектриче-
ская точка достигается при pH = 10,23,
суммарный заряд при нейтральном pH =
13,4, белок плохо растворим в воде.

Поскольку вероятность получения
искомого белка в растворимом виде в
прокариотической экспрессионной систе-
ме минимальна, наиболее верным реше-
нием является использование эукариоти-
ческих клеток. Действительно, повыше-
ние растворимости целевого белка может
быть достигнуто путём его гликозилиро-
вания. Гликозилирование — это процесс,

при котором углеводы присоединяются к
белкам, что значительно влияет на их
функциональные свойства, стабильность
и иммуногенность. Данный процесс ха-
рактерен для эукариотических клеток,
что делает их более предпочтительными
для экспрессии белков, требующих таких
модификаций [12].

Выбор системы экспрессии — один
из ключевых аспектов, влияющих на ре-
зультативность и экономическую целесо-
образность наработки рекомбинантных
белков. В данном исследовании для син-
теза рекомбинантного белка была приме-
нена система экспрессии, основанная на
клеточной линии HEK293.

Для построения экспрессионной си-
стемы нами была использована нуклео-
тидная последовательность, кодирующая
исследуемый О-полисахаридный антиген.
После проведенных модификаций конеч-
ная нуклеотидная последовательность
для клонирования в экспрессирующий
вектор была следующей:

```
«atgagcaaatatcgtaacccggacaagaactgacgcccgtatgcccggatgcgacagggccacaggcacggatagcaggatgctctgttatagcaagcgatattcggcggtgctgctgatctcttgcggcggttacacggcgggcgggcagagacggagactggcgggcgatcatcaaccagcttggttcagttgctgtggggcggtgcccttcctccatggcgatgttcgccaatttgcggaacttcagggcatcatagctccggcggtgctgctgatgctcgtctttttatcgatcgatattggcagttccgacccgggaacggcggtgcgcggtgttctcctcaccacggtcggaattgtggcgatcatagcggttctgttcttgcgcaggatggcgacgggttatctgcgctgctcgatcggtggcgctggctgttatcgctattctatggcggggtgtgttgcgcgagccttggcagcgatgggcggtgatctcgaaccgcagaactccttcttgcgcgggtgttttcagccataaaacattgctggcccggtgatggcggtttcgcgtttgccgggctttatctgtggcgcgcggttggaacacagcgactgctgattggccttccgcgctgggtttgttcgcaaacgggctccaagacgacgatggcgctcgtgccttttgcaatgctgctgttcttcccggccttatgggattgcgcaagctgacagcgggcgctgattttgcaatccagcttgcatgtgccacttttatttcggcggtgtgtgttcgagccgatccgggttggtgaataatggatgtggacgcgaccttaccggcgcggttgcgcttggaagttgcactggaagccctgtcgaagcgccatggaccggctatggctatgaaagcttctggagttcgcatatgccaggcatgcggcgccctattatctcgattgggatgtgcggcatcgtgcatggtcataattcctatctggatgtcgccatgacgattgggtatcccgacactttatgcgcgattgcggctatcgtcgtatgccggttcattatgcgcggtgcaggccggtgcgcga
```

gaacatgctgctggccgacttcttttgatgatcgtctgttcggaacgctcaatgccatgatggaagttttacttcggcgcatggacccggctggtcacacttatccttgccatttcggccttggcatgacggcaaaagtcgtcatcccgaagcgatctgtctaa».

Данная последовательность была синтезирована в компании «Евроген» (г. Москва) и клонирована в вектор pVAX1. В результате конструирования длина pVAX1 для экспрессии гена интереса в клеточной культуре HEK293 составила 4385 пар нуклеотидов. Структура разработанной рекомбинантной плазмиды, представлена на рисунке 2.

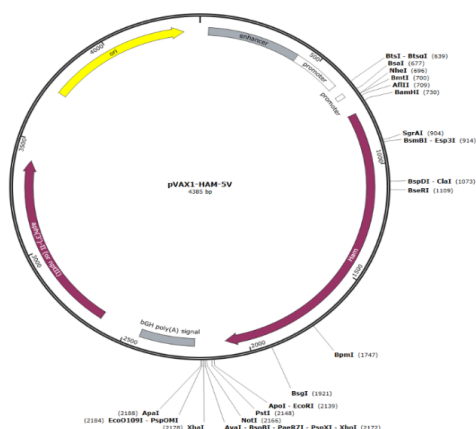


Рисунок 2 – Карта вектора pVAX1 для трансфекции культуры клеток HEK293.

Для наработки целевой ДНК, необходимой для трансфекции клеток HEK293, использовали химическую трансформацию компетентных клеток *E. coli*, после чего был осуществлен отбор трансформантов на селективной среде с канамицином с последующим выделением и очисткой плазмидной ДНК.

Далее проводили трансфекцию клеток HEK полученной генетической конструкцией. Экспрессия целевого антигена клетками HEK293 установлена с помощью вертикального электрофореза в 12 % полиакриламидном геле. Было обнаружено, что полученный рекомбинантный О-антиген претерпел значительные посттрансляционные изменения, в результате чего его молекулярная масса оказалась существенно больше расчётной. В соот-

ветствующих треках геля, в лунки которого был добавлен препарат рекомбинантной плазмиды, наблюдали мажорные паттерны на уровне 70 кДа (рисунок 3).

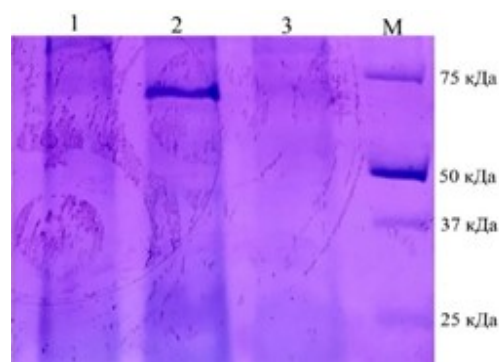


Рисунок 3 – О-антиген бруцелл в полиакриламидном геле:

М – маркеры белковые молекулярного веса, Bio-Rad; 1 – нетрансфицированная культура клеток;

2 – трансфицированная культура клеток (осадок – клетки HEK293);

3 – трансфицированная культура клеток (надосадок – среда культивирования не содержащая трансфицированные клетки).

В результате ионообменной и гель-фильтрационной хроматографии удалось получить очищенный антиген в растворенном виде в концентрации 4,7 мг/мл. Далее полученный препарат был применен в разведении 10 мкг/мл, в качестве антигена, при проведении непрямого твердофазного ИФА для индикации антител в сыворотках крови крупного рогатого скота против S и R антигена бруцелл. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки крови крупного рогатого скота не содержащие антитела. Результат анализа серологической активности полученного рекомбинантного антигена представлен в таблице 1.

Для О-антигена бруцелл рассчитали коэффициенты специфичности относительно данных ИФА с сывороткой крови в разведении 1:256. Так при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против *Brucella abortus* коэффициент

специфичности составил 6.29, при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против S антигена бруцелл коэффициент специфичности составил 6.1, при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против R антигена бруцелл коэффициент специфичности составил 6.77.

Важно отметить, что представленный антиген способен выявлять как S- так и R-противобруцеллезные антитела, что свидетельствует о высоком потенциале

цельного рекомбинантного О-антигена для специфичной индикации антител против возбудителей бруцеллёза, в том числе и на территориях не подвергающейся вакцинации против данного заболевания.

Результаты нашего исследования могут внести значительный вклад в развитие методов диагностики и лечения бруцеллеза, а также в создание новых вакцинных препаратов.

Таблица 1 – Показатели серологической активности рекомбинантного О-антигена бруцелл с сывороткой крови крупного рогатого скота

Разведения	Исследуемые образцы сывороток крови			
	1	2	3	ОКО
1:2	0,91	0,889	0,865	0,201
1:4	0,77	0,837	0,858	0,177
1:8	0,77	0,82	0,853	0,15
1:16	0,699	0,766	0,801	0,141
1:32	0,63	0,783	0,707	0,164
1:64	0,616	0,735	0,732	0,104
1:128	0,504	0,623	0,545	0,085
1:256	0,497	0,482	0,535	0,079

*Примечание: 1 – сыворотка крови крупного рогатого скота, содержащая антитела против *B. abortus*; 2 – сыворотка крови крупного рогатого скота против S антигена бруцелл; 3 – сыворотка крови крупного рогатого скота против R антигена бруцелл; ОКО – сыворотка крови крупного рогатого скота, не содержащая антитела против бруцелл.*

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В результате проведения поисковых запросов в базе данных GenBank нами идентифицирована аминокислотная последовательность О-полисахаридного антигена бруцелл – WP_002967174.1. С использованием пептидного калькулятора было определено, что молекулярный вес исследуемой аминокислотной последовательности, состоящий из 408 аминокислот, равен 44,26 кДа, коэффициент экстинкции — 65290 М-1см-1, изоэлектрическая точка достигается при pH = 9,86, суммарный заряд при нейтральном pH = 9,4, белок плохо растворим в воде.

Для успешной наработки гена интереса в эукариотической системе анализируемую последовательность оптимизировали

путём гликозилирования, синтезировали и клонировали в плазмиду pVAX1. В результате конструирования длина pVAX1 для экспрессии гена интереса в клеточной культуре НЕК293 составила 4385 пар нуклеотидов. Нарботку pVAX1 проводили путем трансформации клеток *E. coli* штамма DH5α методом теплового шока, с селекцией по гену устойчивости к канамицину с дальнейшим выделением и очисткой плазмидной ДНК. Трансфекция клеток НЕК293 полученной генетической конструкцией приводила к экспрессии целевого антигена, факт наличия которого в жидкости, отобранной с клеточной культуры, установили с помощью вертикального электрофореза в 12 % ПААГ по результату визуализации мажорных пат-

тернов на уровне 70 кДа. В результате ионообменной и гель-фильтрационной хроматографии удалось получить очищенный О-антиген в растворенном виде в концентрации 4,7 мг/мл. Полученный препарат был применен в разведении 10 мкг/мл, в качестве антигена, при проведении непрямого твердофазного ИФА для индикации антител в сыворотках крови крупного рогатого скота против S и R антигена бруцелл. Коэффициент специфичности рассчитывали относительно данных ИФА с сывороткой крови в разведении 1:256. Так при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против *B. abortus* коэффициент специфичности составил 6.29, при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против S антигена бруцелл коэффициент специфичности составил 6.1, при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против R антигена бруцелл коэффициент специфичности составил 6.77. Полученный антиген способен выявлять как S- так и R-противобруцеллезные антитела, что свидетельствуют о высоком потенциале цельного рекомбинантного О-антигена для специфичной индикации антител против возбудителей бруцеллеза, в том числе и на территориях не подвергающейся вакцинации против данного заболевания.

OBTAINING AND DETERMINING THE SEROLOGICAL ACTIVITY OF RECOMBINANT O-BRUCELLA ANTIGEN SYNTHESIZED IN THE EUKARYOTIC EXPRESSION SYSTEM

Khammadov N.I.^{1,2} – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5669-1486); **Gromova E.A.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Senior researcher (ORCID 0000-0002-0416-6193); **Gorbunova M.E.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Researcher, (ORCID 0000-0002-0707-2117); **Galeeva A.G.**^{1,2} – Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher, (ORCID 0000-0003-2650-6459); **Kosarev M.A.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0002-5587-486X); **Usoltsev**

K.V.¹ – Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5279-9836); **Efimova M.A.**^{1,2} – Doctor of Biological Sciences, leading researcher (ORCID: 0000-0001-8786-1310)

¹FSBSI «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety»

²FSBEI HE «Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman»

* nikhammadov@mail.ru

ABSTRACT

Brucellosis is a dangerous zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Brucella*, having a significant negative impact on the productivity of farm animals. In the Russian Federation, successes in the fight against this disease in cattle are associated with the use of a vaccine based on the *Brucella abortus* 82 strain, as well as the timely detection of infected animals. This work is devoted to the preparation and study of the serological activity of recombinant O-antigen for the indication of antibodies against brucellosis. As a result of conducting search queries in the GenBank database, we identified the amino acid sequence of the O-polysaccharide antigen brucella –WP 002967174.1. This sequence was optimized for protein translation in mammalian cell culture, synthesized, and cloned into the pVax1 plasmid. pVax1 was developed by transformation of *Escherichia coli* cells of the DH5a strain by heat shock, with selection for the kanamycin resistance gene with further isolation and purification of plasmid DNA. Transfection of HEK293 cells with the resulting genetic construct led to the expression of the target antigen, the presence of which in the liquid taken from the cell culture was established using vertical electrophoresis in 12% PAAG based on the visualization of major patterns at the level of 70 kDa. As a result of ion exchange and gel filtration chromatography, it was possible to obtain purified O-antigen in dissolved form at a concentration of 4.7 mg/ml. The resulting drug was used in a dilution of 10 micrograms/ml, as an antigen, during indirect solid-phase ELISA to indicate anti-

bodies in bovine blood sera against S and R brucella antigen. The coefficient of specificity was calculated with respect to ELISA data with blood serum at a dilution of 1:256. Thus, in the reaction with bovine blood serum against *Brucella abortus*, the specificity coefficient was 6.29, against S and R brucella antigens – 6.1 and 6.77, respectively. The results of the study can make a significant contribution to the development of methods for the diagnosis and treatment of brucellosis, as well as to the creation of new vaccine preparations.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Насибуллин Р.Ю. Применение пеногасителей при глубинном культивировании бруцелл. Ветеринарный врач. 2023; 4:33-37. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2023_4_33.
2. Булашев А.К., Акибеков О.С., Сыздыкова А.С., Сураншиев Ж.А., Ескендирова С.З. Серологический потенциал рекомбинантных белков *Brucella* spp. в диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота. Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). 2020; 1 (54):56-64. <https://doi.org/10.31677/2072-6724-2020-54-1-56-64>
3. Анисимова Е.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Панкова Е.В., Осянин К.А. Применение HRM-анализа кривых плавления, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 4:42-49. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-4-42-49>
4. Пономаренко Д.Г., Матвиенко А.Д., Хачатурова А.А., Жаринова И.В., Скударева О.Н., Транквилевский Д.В., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Кондратьева Ю.В., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Анализ ситуации по бруцеллезу в мире и Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 2:36–50. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-2-36-50>
5. Громова Е.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Горбунова М.Е., Осянин К.А. Разработка мультиплексной ПЦР-ПВ тест-системы для выявления возбудителя бруцеллеза. Ветеринарный врач. 2024; 3:34-40. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_3_34
6. Булашев А.К., Акибеков О.С., Сыздыкова А., Сураншиев Ж.А., Инербай Б. Сравнительная оценка белков внешней мембраны *Brucella* в серодиагностике бруцеллеза. Актуальная биотехнология. 2020; 3 (34):86-90
7. Zygmunt M.S., Bundle D.R., Ganesh N.V., Guiard J., Cloeckaert A. Monoclonal Antibody-Defined Specific C Epitope of *Brucella* O-Polysaccharide Revisited. Clin Vaccine Immunol. 2015; 22(8):979-82. <https://doi.org/10.1128/CVI.00225-15>
8. Усольцев К.В., Горбунова М.Е., Шангараев Р.И., Зайнуллин Л.И., Хаертынов К.С., Осянин К.А., Хаммадов Н.И. Применение синтетического пептида на основе иммуногенного эпитопа GP51 для серологической диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота. Международный вестник ветеринарии. 2024; 1:12-21. <https://doi.org/10.52419/issn2072-2419.2024.1.12>
9. Mirkalantari S., Zarnani A., Nazari M., Irajian G.R., Amirmozafari N. *Brucella melitensis* VirB12 recombinant protein is a potential marker for serodiagnosis of human brucellosis. Ann Clin. Microbiol. Antimicrob. 2017; 8 (16). <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0182-4>
10. Ahmed I., Khairani-Bejo S., Hassan L. Serological diagnostic potential of outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay. BMC Veterinary Research. 2015; 11(1): 275
11. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. Current Protocols in Molecular Biology Copyright. John Wiley&Sons, 2003. 4755 p
12. Tian M., Li X., Yu L., Qian J., Bai X., Yang J., Deng R., Lu C., Zhao H., Liu Y. Glycosylation as an intricate post-translational modification process takes part in glycoproteins related immunity. Cell Commun Signal. 2025; 5:23(1):214. <https://doi.org/10.1186/s12964-025-02216-w>

REFERENCES

1. Nasibullin R.Yu. The use of defoamers in submerged cultivation of *Brucella*. *The Veterinarian*. 2023; 4:33-37. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2023_4_33. (In Russ.).
2. Bulashev A.K., Akibekov O.S., Syzdykova A.S., Suranshiev Zh.A., Eskendirova S.Z. Serological potential of recombinant proteins *Brucella* spp. in the diagnosis of cattle brucellosis. *Bulletin of NGAU (Novosibirsk State Agrarian University)*. 2020; 1(54):56-64. <https://doi.org/10.31677/2072-6724-2020-54-1-56-64>
3. Anisimova E.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Pankova E.V., Osyanin K.A. Use of HRM-Analysis of the Melting Curves Obtained after Amplification of VNTR-Loci for Identification and Differentiation of *Brucella* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:42–49. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-4-42-49>. (In Russ.).
4. Ponomarenko D.G., Matvienko A.D., Khachaturova A.A., Zharinova I.V., Skudareva O.N., Trankvilevsky D.V., Logvinenko O.V., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Kondrat'eva Yu.V., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. Analysis of the Situation on Brucellosis around the World and in the Russian Federation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 2:36–50. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-2-36-50> (In Russ.).
5. Gromova E.A., Mirkhazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Gorbunova M.E., Osyanin K.A. Development of a multiplex RT-PCR test system for detecting the causative agent of Brucellosis. *The Veterinarian*. 2024; 3:34-40. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_3_34 (In Russ.).
6. Bulashev A.K., Akibekov O.S., Syzdykova A., Suranshiev Zh.A., Inerbai B. Comparative evaluation of *Brucella* outer membrane proteins in the serodiagnosis of brucellosis. *Current biotechnology*. 2020; 3 (34):86-90 (In Russ.).
7. Zygmunt M.S., Bundle D.R., Ganesh N.V., Guiard J., Cloeckaert A. Monoclonal Antibody-Defined Specific C Epitope of *Brucella* O-Polysaccharide Revisited. *Clin Vaccine Immunol*. 2015; 22(8):979-82. <https://doi.org/10.1128/CVI.00225-15>.
8. Usoltsev K.V., Gorbunova M.E., Shangaraev R.I., Zainullin L.I., Khaertynov K.S., Ostanin K.A., Khammatov N.I. The use of a synthetic peptide based on the immunogenic epitope gp51 for the serological diagnosis of bovine leukemia virus. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2024; 1:12-21. <https://doi.org/10.52419/issn2072-2419.2024.1.12>. (In Russ.).
9. Mirkalantari S., Zarnani A., Nazari M., Irajian G.R., Amirmozafari N. *Brucella melitensis* VirB12 recombinant protein is a potential marker for serodiagnosis of human brucellosis. *Ann Clin. Microbiol. Antimicrob*. 2017; 8 (16). <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0182-4>.
10. Ahmed I., Khairani-Bejo S., Hassan L. Serological diagnostic potential of outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *BMC Veterinary Research*. 2015; 11(1): 275.
11. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. *Current Protocols in Molecular Biology* Copyright. John Wiley&Sons, 2003. 4755 p
12. Tian M., Li X., Yu L., Qian J., Bai X., Yang J., Deng R., Lu C., Zhao H., Liu Y. Glycosylation as an intricate post-translational modification process takes part in glycoproteins related immunity. *Cell Commun Signal*. 2025; 5:23(1):214. <https://doi.org/10.1186/s12964-025-02216-w>.