

УДК 619:579.842.11:616

СПОСОБ ДВУХСТУПЕНЧАТОЙ ГЛУТАРАЛЬДЕГИДНОЙ КОНЪЮГАЦИИ ЭНТЕРОТОКСИНОВ *ESCHERICHIA COLI*

Сухарев Ю.С.

*Харьковская государственная зооветеринарная академия, Малая Даниловка,
Харьковская обл., Украина
E-mail: Yuriy_sukharev@mail.ru*

Разработан способ двухступенчатой глутаральдегидной конъюгации энтеротоксинов *Escherichia coli*. Полученный конъюгат обладал иммуногенными свойствами и индуцировал синтез биспецифических антиоксических антител к энтеротоксинам *E.coli*. Использование способа дает возможность существенно сократить рабочее время занятое соответствующими операциями; минимизировать число процедур, увеличить специфичность, уменьшить трудоемкость и использование дорогостоящего оборудования и реактивов, и может быть рекомендован для создания иммунизирующих и диагностических препаратов против токсигенных *E.coli*.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, энтеротоксины; гаптен; конъюгат; антиоксические антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из ведущих элементов оценки патогенности *Escherichia coli* и важным условием эффективности лабораторной диагностики колибактериоза, является наличие у них генов, детерминирующих образование энтеротоксинов – термостабильного и термолабильного. Но из двух видов энтеротоксинов только LT обладает иммуногенными свойствами [1, 2]. Иммунизирующие препараты на его основе индуцируют синтез специфических антител, которые используют для идентификации продуцирующих этот токсин штаммов *E.coli*, в серологических реакциях, тогда как ST–является гаптеном, что существенно затрудняет его обнаружение в классических иммуно-химических тестах.

В 1936 году Ландштейнер К. показал, что молекулы гаптенов, конъюгированные с более крупным носителем (белками, полисахаридами, липидами и другими макромолекулами), вызывают образование антител, обладающих двойной специфичностью, как к гаптену, так и к носителю.

Далеко не все комплексы гаптенов с белками являются одинаково хорошими иммуногенами. К числу факторов, усиливающих иммунный ответ на конъюгат, относятся высокая плотность молекул гаптена на молекуле носителя и использование лигандов, обладающих собственной иммуногенностью.

Существуют различные способы конъюгации гаптена с лигандом. Часто для этой цели применяют диазопроизводные ароматических соединений- толуол-2,4-диизоцианат, 1-этил-1,3(3-диметил аминопропил) карбодиимид или глутаровый альдегид. Пенициллин так же обладает способностью реагировать *in vivo* с белками

через пенициллоил-лизиновую группу [2]. Однако, эти методы имеют ряд недостатков, в частности длительность получения и низкий выход конъюгатов, в следствии образования ковалентных связей между самими молекулами гаптена, а так же большого количества побочных продуктов.

Весьма удобным химическим линкером является глутаровый альдегид, который взаимодействует с ϵ -аминогруппами лизиновых остатков белков. К тому же, по мнению ряда авторов, именно глутаральдегид, в сравнении с другими веществами используемыми для конъюгации белков, в большей степени “щадит” иммунологическую активность полимеризуемых молекул [3].

Механизм реакции глутаральдегида с белками до конца не изучен. Одновременно протекает несколько реакций, приводящих к появлению смеси продуктов, содержащих более прочные химические связи, чем в простых основаниях Шиффа. Однако в общем виде схему реакции можно представить в следующем виде:

1. $\epsilon\text{-NH}_2 + \text{O}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{O} \rightarrow \epsilon\text{-N}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{O}$;
2. $\epsilon\text{-N}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{O} + \text{NH}_2\text{-белок} \rightarrow \epsilon\text{-N}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{N-белок}$

В настоящее время известен одноступенчатый глутаральдегидный метод синтеза [4], к недостаткам которого следует отнести небольшой выход конъюгата (~ 40 %), вследствие полимеризации молекул гаптена, длительность его приготовления (~ 70 часов), и не высокую специфичность.

В связи с этим, целью исследований была разработка метода конструирования иммунизирующего препарата на основе конъюгированных нативных молекул энтеротоксинов *E.coli*, с учетом выше указанных недостатков, и изучение его антигенных и иммуногенных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Новизна предлагаемого решения заключалась в получении конъюгата из нативных энтеротоксинов *E.coli*, методом двухступенчатого глутаральдегидного сшивания, где на первой стадии глутаровым альдегидом обрабатывали белок-носитель (LT), удаляли избыток альдегида, а затем уже к модифицированному лиганду добавляли гаптен (ST), что исключало образование ковалентных связей между молекулами гаптена (ST-ST), препятствующих синтезу достаточного количества конъюгата, ускоряло получение и увеличивало специфичность конечного продукта. В этом случае гаптен выступал в роли доминантной иммунодетерминанты и антитела образовывались преимущественно к гаптenu.

Штаммы *E.coli* синтезирующие ST и LT-энтеротоксины висевали отдельно на Синтетическую питательную среду [5] и инкубировали при 37 °С в течение 4-х часов; центрифугировали при 6000-8000 g 30-40 минут при 4 °С, и получали бесклеточные супернатанты, которые лиофилизировали без предварительной очистки.

Приготовление конъюгата осуществляли следующим образом: 100 мг LT-энтеротоксина растворяли в 2,0 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,8, который

содержал 12,5 г/л глутаральдегида. Через 18 часов экспозиции при комнатной температуре смесь наносили на хроматографическую колонку с сефадексом G-25, уравновешенную 0,15 М раствором хлорида натрия. Фракции, которые содержали активированный LT (экстинкция при 403 нм) объединяли и концентрировали до 1/10 исходного раствора ПЭГ с молекулярной массой 3000 D. К этому раствору добавляли 50 мг ST, растворенного в смеси 10 мл 0,15 М хлорида натрия и 1,0 мл карбонат-бикарбонатного буфера. Через 24 часа инкубации при 4 °С добавляли 1,0 мл 0,2 М раствора лизина и на 2 часа ставили на диализ против 0,1 М фосфатно-солевого буфера. Конъюгат центрифугировали 20 мин при 2000 g и сохраняли при 4 °С. Количество связанного ST в конъюгате определяли по содержанию белка в диализате.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установили, что основным фактором влияющим на количественное содержание ST в конечном конъюгате являлось начальное соотношение LT:ST вступающих в реакцию (рис. 1).

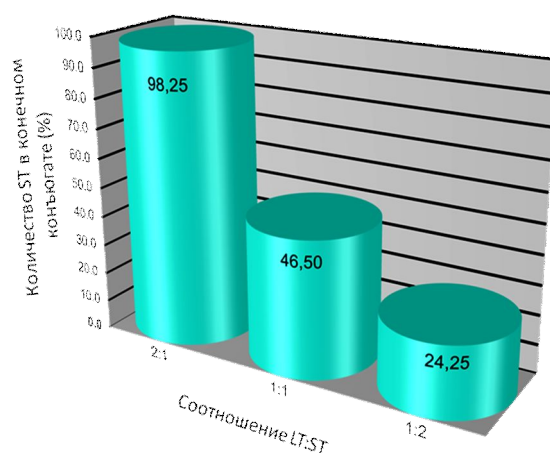


Рис.1. Влияние соотношения LT:ST на количество ST (%) в конечном конъюгате.

В настоящее время известно, что функция носителя гаптена заключается в стимуляции Т-хэлперов, помогающих В-клеткам реагировать на гаптен [6].

Конъюгированные гаптены в кишечнике млекопитающих распознаются специальными М-клетками, которые широко представлены в толще слизистого эпителия. М-клетки транспортируют захваченный антиген к перитонеальным макрофагам и В-лимфоцитам, находящимся в лимфоидных образованиях тонкого кишечника (пейеровых бляшках). В результате презентации антигена на поверхности антиген-презентирующих клеток происходит активация Т-лимфоцитов-хэлперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты.

Дифференцированные В-клетки выходят из лимфоидных фолликулов слизистой оболочки и поступают через общую циркуляцию в мезентеральные лимфатические узлы, где происходит их созревание и превращение в плазматические клетки, синтезирующие специфические к антигену антитела (рис. 2).

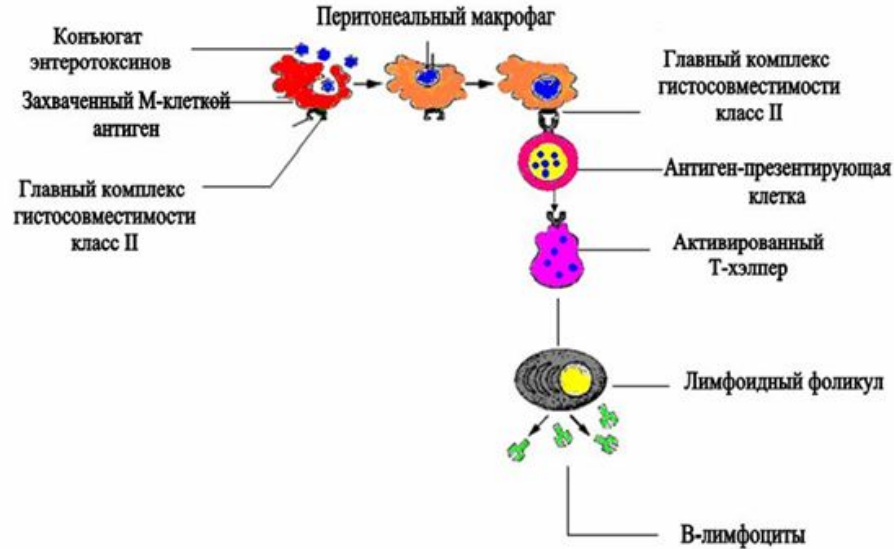


Рис.2. Схема иммунной реакции, индуцированной конъюгатом энтеротоксинов *E.coli*.

Иммуногенные свойства конъюгата энтеротоксинов *E.coli* изучали на белых беспородных мышах массой 14–16 г. Мышей прививали подкожно, дважды, в дозе 0,3 мкг/мл (первая инъекция) и 0,5 мкг/мл (вторая инъекция) с интервалом между введениями 7 дней. На 21 сутки после второго введения препарата определяли напряженность иммунитета путем интраперитонеальной инъекции летальных доз токсинов гомологичных и гетерологичных штаммов *E.coli*. Конъюгат считали иммуногенным когда в живых оставалось более 50 % животных (табл. 1).

Таблица 1
Количество иммунизированных конъюгатом мышей выживших от 2DIm ST- и LT-энтеротоксинов гомологичных и гетерологичных штаммов *E.coli*

Количество иммунизированных конъюгатом мышей выживших после инъекции 2DIm ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, %, n=5)			
ST-энтеротоксина		LT-энтеротоксина	
гомологичного штамма	гетерологичного штамма	гомологичного штамма	гетерологичного штамма
96,0 ± 0,08	93,6 ± 0,07	86,6 ± 0,06	80,0 ± 0,04

Сравнивая разработанный метод с известным установили, что содержание ST-энтеротоксина в конечном конъюгате и его иммуногенная активность была выше чем в конъюгате полученного одноступенчатым способом (табл. 2).

Таблица 2
Содержание ST-энтеротоксина в конечных конъюгатах и их иммуногенная активность

Способ конъюгации	ST в конечном конъюгате $X \pm s$ (%), n=5	Количество иммунизированных конъюгатом мышей, выживших после заражения 2DIm	
		ST	LT
Двухступенчатый глутаральдегидный	98,25 ± 2,36	96,0 ± 0,08	86,6 ± 0,06
Одноступенчатый глутаральдегидный	39,25 ± 0,95	80,0 ± 0,04	83,6 ± 0,07
$P \leq$	0,05	0,05	0,05

Перспективы дальнейших исследований

Конъюгат ST/LT-энтеротоксинов планируется использовать в качестве иммунизирующего препарата против токсигенных *E.coli*, а также для получения антитоксических антител и конструирования диагностических тест-систем на их основе.

ВЫВОДЫ

1. Конъюгат молекул ST и LT-энтеротоксинов *E.coli*, полученный методом двухступенчатого глутаральдегидного сшивания, индуцировал синтез биспецифических антитоксических антител у иммунизированных животных и обладал более высокими иммуногенными свойствами в сравнении с известным способом.
2. Разработанный метод дает возможность существенно сократить рабочее время (~26 часов), занятое соответствующими операциями; минимизировать число процедур, увеличить специфичность, уменьшить трудоёмкость и использование дорогостоящего оборудования и реактивов.

Список литературы

1. Prevalence of Toxin Types and Colonization Factors in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated during a 2-Year Period from Diarrheal Patients in Bangladesh / F. Qadri, S. Kumar Das, A.S.G. Faruque, G.J. Fuchs [et al.] // J. Clin Microbiol – 2000. – January; 38(1). – P. 27–31.
2. Олійник Л.В. Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу / Л.В. Олійник // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Харків. – 2004. – № 83. – С. 167–170.

- Osek J. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heatstable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhea / J.Osek // *Vet. Microbiol.* – 2003. – Vol. 91, №1. – P. 65–72.
- Сухарев Ю.С. Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе) / Сухарев Ю.С. – Харьков., Коллегиум. – 2009. – 92 с.
- А.С. СССР, МКИ 5 А 61 К 39/108. (СССР). Синтетическая питательная среда для получения термостабильного энтеротоксина *Escherichia coli* / Ю.С. Сухарев, Г.В. Гнатенко (СССР). – N4930440/13; заявл. 28.03.91; опубл. 30.07.92, бюл. 28.
- Койко Р. Иммунология / Койко Р., Саншайн Д., Бенджамин Э.; [Пер. с англ. под ред. Серебряной Н.Б.]. – М.: Академия, 2008. – 365 с.

Сухарев Ю.С. Спосіб двоступінчатої глутаральдегідної конюгації ентеротоксинів *Escherichia coli* / Ю.С. Сухарев // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2011. – Т. 24 (63), № 1. – С. 153-158.

Розроблено спосіб двоступінчатої глутаральдегідної кон'югації ентеротоксинів *Escherichia coli*. Одержаний кон'югат володів імуногенними властивостями і індукував синтез біспецифічних антитоксичних антитіл до ентеротоксинів *E.coli*. Використання способу дає змогу суттєво скоротити робочий час зайнятий відповідними операціями; мінімізувати число процедур, підвищити специфічність, зменшити трудомісткість і використання дорогокоштуючого обладнання і реактивів, і може бути рекомендований для створення імунізуючих і діагностичних препаратів проти токсигенних *E.coli*.

Ключові слова: *Escherichia coli*, ентеротоксини; гаптен; кон'югат; антитоксичні антитіла.

Sukharev Yu.S. Method of producing conjugate enterotoxins *Escherichia coli* / Yu.S. Sukharev // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No 1. – P. 153-158.

The method of two-stage glutaraldehyd conjugation of enterotoxins of *Escherichia coli* is worked out. Got conjugate possessed immunogenic properties and induced the synthesis of bispecificity of antitoxic antibodies to the enterotoxins of *E.coli*. The use of method gives an opportunity substantially to shorten business hours busy at corresponding operations; to minimize the number of procedures, increase specificity, decrease labour intensiveness and use of expensive equipment and reagents, and can be recommended for creation of immunizing and diagnostic preparations against toxigenic *E.coli*.

Keywords: *Escherichia coli*; enterotoxins, hapten, conjugate; antitoxic antibodies.

Поступила в редакцію 17.02.2011 г.