



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96488 (13) C2

(51) МПК

A61K 39/04 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/32 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСІБ ІЗ ВЛАСТИВІСТЮ ФОРМУВАННЯ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ ПРОТИ МЫСОВACTERIUM TUBERCULOSIS H37 Rv, СПОСІБ ЙОГО ОТРИМАННЯ (ВАРІАНТИ), РЕКОМБІНАНТНИЙ ШТАМ І ЗАСІБ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

1

2

(21) а200912563

(22) 29.04.2008

(24) 10.11.2011

(86) PCT/RU2008/000270, 29.04.2008

(31) 2007117342

(32) 10.05.2007

(33) RU

(46) 10.11.2011, Бюл.№ 21, 2011 р.

(72) КІСЛІЧКІН НІКОЛАЙ НІКОЛАЄВИЧ, RU

(73) ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "БИОТЕК", RU

(56) METZGAR DAVID ET AL: "Acinetobacter sp. ADP1: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB LNKD- DOI:10.1093/NAR/GKH881, vol. 32, no. 19, 28 October 2004 (2004-10-28), pages 5780-5790.

HARTH G ET AL: "High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major Mycobacterium tuberculosis extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 65, no. 6, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 2321-2328.

GB A 860305, 01.02.1961.

RU C1 2262351, 20.10.2005.

RU C1 2237090, 27.09.2004.

US B1 7112663, 26.09.2006.

CN A 1869239, 29.11.2006.

(57) 1. Рекombinantний штам 2-9XL Acinetobacter johnsonii VKPM-9312 - продуцент видоспецифічного глікопротеїнового туберкульозного комплексу M. tuberculosis H37 Rv (ТБ-антигену), депонований у ВКПМ ФГУП ДержНДІгенетика.

2. Спосіб отримання видоспецифічного глікопротеїнового туберкульозного комплексу Mycobacterium tuberculosis H37 Rv (ТБ-антигену), який відрізня-

ється тим, що культуру рекombінантного штаму 2-9XL Acinetobacter johnsonii вирощують на живильному середовищі при 32 °С протягом 2-3-х діб, змивають фізіологічним розчином, отриману суспензію бактерій центрифугують, осад суспендують у воді при +4 °С, обробляють розчином NaOH до рН 6,0-9,0, через 15-16 годин отриману суспензію центрифугують, осад піддають повторній процедурі обробки розчином NaOH, а надосадову рідину, що містить розчинену капсулу бактерій штаму 2-9XL, нейтралізують 0,5 N розчином ТХО до рН 6,0, центрифугують, до надосадової рідини додають 0,5 N розчин ТХО до рН 3,0-3,5, розчин витримують 15-16 годин до отримання комплексу ТБ-антигену, при цьому з порцією осаду, повторно обробленого розчином NaOH, проводять нейтралізацію розчином ТХО з вищевказаною послідовністю, 1-й і 2-й розчини з комплексом ТБ-антигену, що випали після обробки ТХО, центрифугують, отримані осад, що містять ТБ-антиген, розчиняють у PBS-буфері, розчини поєднують і піддають очищенню шляхом фракціонування гел'фільтрацією на Сефадексі G-200 або за допомогою іонообмінної хроматографії, елюати містять очищений ТБ-антиген з молекулярною масою від 55,0 до 75,0 кДа й наявністю вуглеводів від 20 % до 50 %.

3. Спосіб одержання видоспецифічного глікопротеїнового туберкульозного комплексу Mycobacterium tuberculosis H37 Rv (ТБ-антигену), який відрізняється тим, що культуру рекombінантного штаму 2-9XL Acinetobacter johnsonii вирощують на живильному середовищі при 32 °С протягом 3-х діб, змивають фізіологічним розчином, отриману суспензію бактерій центрифугують, осад суспендують у воді при +4 °С, обробляють розчином NaOH до рН 6,0-9,0, через 15-16 годин отриману суспензію центрифугують, осад піддають повторній процедурі обробки розчином NaOH, а надосадову рідину, що містить розчинену капсулу бактерій штаму 2-

(13) C2

(11) 96488

(19) UA

9XL, нейтралізують 0,5 N розчином ТХО до pH 6,0, додають сульфат амонію до 30 % насичення, витримують при +4 °C, центрифугують, до надосадової рідини додають сульфат амонію до 100 % насичення, витримують при +4 °C, при цьому з порцією осаду, повторно обробленого розчином NaOH, проводять нейтралізацію за допомогою ТХО й осадження сульфатом амонію у вищевказаній послідовності, два осади, отримані після 100 насичення сульфатом амонію, розчиняють в PBS-буфері pH 7,0, діалізують проти великого обсягу PBS-буфера, сконцентровані розчини, що містять ТБ-антиген, поєднують і піддають очищенню шляхом фракціонування гель-фільтрацією на Сефадексі G-200 або за допомогою іонообмінної хромато-

графії, елюати містять очищений ТБ-антиген з молекулярною масою від 55,0 до 75,0 кДа й наявністю вуглеводів від 20 % до 50 %.

4. Засіб для формування В- і Т-клітинного імунітету проти *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv, що містить видоспецифічний глікопротеїновий туберкульозний комплекс (ТБ-антиген) *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv, що продукується штамом 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*, охарактеризованим в п. 1.

5. Засіб для діагностики туберкульозу, що містить видоспецифічний глікопротеїновий туберкульозний комплекс (ТБ-антигену) *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv, отриманий способом за п. 2.

Винахід стосується галузі біофармакології, препаративної біохімії, медицини й створення засобу на основі туберкульозного комплексу, що продукується мікроорганізмом, і може знайти застосування в лікуванні й діагностиці туберкульозу.

Важливою ланкою в рішенні проблеми туберкульозу є створення біологічних вакцин і розробка методів швидкої й некоштовної діагностики. Очевидно, що необхідно ідентифікувати в збуднику туберкульозу такі білки й формовані ними комплекси, які відповідали б найсучаснішим вимогам для досягнення цих цілей. У біологічних вакцин основним критерієм є безпека для людини, поряд з високою ефективністю, у діагностичних препаратів - чутливість і специфічність. Головними напрямками рішення поставленої задачі є: а) клонування генів мікобактерій у безпечному реципієнті й вивчення властивостей синтезованих туберкульозних білків, б) виділення з мікобактерій білків й їхніх комплексів з наступною характеристикою властивостей. У літературі описана можливість створення геномної бібліотеки *M. tuberculosis* H37 Ra і передачі фрагментів хромосомної ДНК збудника туберкульозу в реципієнтні бактерії *E. coli* XLI-Blue. Показано, що з певного фрагмента хромосомної ДНК *M. tuberculosis* H37 Ra, що складається з 1535 пар основ і перебуває в складі плазмідного вектора pZx7, є можливим синтез туберкульозного білка із приблизною масою 52,0 кДа. Цей білок локалізується на зовнішній мембрані *E. coli* XL 1-Blue, наділяє рекомбінантний штам можливістю проникати усередину еукаріотних клітин HeLa і розмножуватися в них, що характерно для патогенних мікобактерій. Однак, авторами не вказується, що даний білок є індивідуальним (видоспецифічним) і може бути використаний для діагностики збудника туберкульозу. Навпаки, амінокислотна послідовність вивченого білка має гомологію як з патогенними мікроорганізмами (*Listeria monocytosis*, *Shigella*, *Jersinia pseudotuberculosis*), так і з рядом білків людини, наприклад,  $\gamma$ -адаптином (1).

З фільтратів культури *M. Tuberculosis* був виділений й охарактеризований білок MPT63, що секритується й має молекулярну масу 18,0 кДа. Аналіз нуклеотидної послідовності trp63 гена показав, що він має відкриту рамку читування, що кодує білок з 159 амінокислот і складає 29 амінокислот сигнального пептиду й 130 амінокислот

зрілого MPT63 білка. Рекомбінантний MPT63 білок із клітин *E. coli* й очищений з культуральних фільтратів *M. tuberculosis* були нерозрізнені в серологічних реакціях і впливали на гуморальний імунітет морських свинок, інфікованих вірулентним штамом *M. tuberculosis*. Передбачалося використати цей білок як специфічний реагент для діагностики шкірного тестування при захворюванні туберкульозом, однак дотепер цей білок і комплекс білка із сигнальним пептидом не знайшли широкого застосування (2). Відомо також опис і характеристику 4 головних позаклітинних білків *M. tuberculosis*, що секретуються, виділених з непатогенних швидко зростаючих мікобактерій, які мають ферментативну активність і присутні також у патогенних штаммах. Ці білки передбачається використати для конструювання біологічних вакцин, тому що вони індукують захисний імунітет, однак дотепер вони не одержали визнання (3).

Таким чином, до теперішнього часу не створено генно-інженерний мікроорганізм, що міг би синтезувати туберкульозні видоспецифічні білки або їхні комплекси, придатні для використання в діагностичних цілях або бути основою для створення біологічної вакцини. Білки, виділювані з патогенного штаму *M. tuberculosis* або не патогенних мікобактерій, також дотепер не дозволяють створити на їхній основі високоспецифічні й чутливі діагностичні препарати або сконструювати біологічні вакцини.

Задача винаходу полягає в одержанні генно-інженерним і мікробіологічним способом рекомбінантного штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* - продуцента специфічного туберкульозного комплексу *M. tuberculosis* H37 Rv, що може бути основою біологічної вакцини проти збудника туберкульозу з можливістю діагностування для виявлення хворих туберкульозом людей із самими різними формами захворювання й у різних стадіях хвороби.

Для рішення поставленої задачі запропоновано рекомбінантний штам 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*, отриманий генно-інженерним способом з наступною селекцією мікробіологічним способом, що є продуцентом видоспецифічного глікопротеїнового туберкульозного комплексу (ТБ-антигену), який локалізовано на зовнішній мембрані й у капсульній речовині бактерії й при виділенні може

бути використаний як основа для одержання біологічної вакцини, діагностичних і лікарських засобів. Технічний результат - одержання високоспецифічних і чутливих препаратів. Для рішення поставленої задачі запропонована група винаходів, об'єднаних загальним винахідницьким задумом.

Заявлено винахід, що представляє собою засіб із властивістю формувати клітинний імунітет проти *M. tuberculosis* H37 Rv. Засіб містить видоспецифічний глікопротеїновий туберкульозний комплекс *M.tuberculosis* H37 Rv (Тб-антиген).

Крім того, заявлені варіанти способів отримання видоспецифічного глікопротеїнового туберкульозного комплексу *M.tuberculosis* H37 Rv (Тб-антиген), а також рекомбінантний штам 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* VKPM-9312 - продуцент видоспецифічного глікопротеїнового туберкульозного комплексу *M.tuberculosis* H 37 Rv (Тб-антигену) і засіб для діагностики туберкульозу, що містить вищевказаний видоспецифічний глікопротеїновий туберкульозний комплекс.

2-9XL *Acinetobacter johnsonii* є генно-інженерним штамом, отриманим шляхом передачі в бактерії R-форми *F. tularensis* у складі векторної плазмиди pRT двох фрагментів хромосомної ДНК *M. tuberculosis* H37 Rv і наступної селекції мікробіологічним способом. Дотепер при клонуванні генів збудника туберкульозу (ТБ) у складі векторних плазмід використали бактерії-хазяїв, які могли синтезувати тільки одиничні білки ТБ. Виділення й вивчення генно-інженерних білків ТБ (як і природних білків збудника туберкульозу) не привели до бажаного результату - створення біологічних вакцин, лікарських препаратів, високо специфічних і чутливих діагностиків. Тому у світі тривають пошуки нових білків мікобактерій, за допомогою яких можливе рішення поставлених задач. Імовірно, даний напрямок може бути помилковим, тому що видоспецифічність збудника туберкульозу формується на рівні комплексу з декількох білків (не менш трьох), частина з яких повинна бути глікозилітована, тобто містити полісахаридну частину. Показано, що при передачі фрагментів ДНК *M. tuberculosis* H37 Rv у складі векторної плазмиди pRT у реципієнт R-форму *F. tularensis* і наступної селекції трансформанта певним мікробіологічним способом перенесені фрагменти (фрагмент) вбудовуються в хромосому ДНК бактерію-реципієнта й викликають синтез туберкульозного поліпептиду. Спочатку цей поліпептид формує в бактерії-хазяїні специфічний рекомбінантний туляремійно-туберкулезний комплекс, зв'язуючись із туляремійними білками, що мають більш високу молекулярну масу. Однак, дана конструкція, імовірно, для бактерії-хазяїна незручна й при подальшій селекції рекомбінантного штаму починається синтез Тб-білків більш високої молекулярної маси, які заміщують туляремійні.

За такої серйозної «реконструкції» у бактерії відбуваються не тільки зміни біохімічних і фенотипових властивостей рекомбінантного мікроорганізму (по ряду властивостей він стає схожим на туберкульозні мікобактерії), але міняється також і структура ДНК бактерії. Висновок про видову приналежність штаму «9ха» (2-9XL) за допомогою

аналізу 16S РНК отримане у ВКПМ ФГУП ГосНДІ-Генетика.

Аналіз послідовностей 16S рРНК показав, що досліджуваний штам, заявлений як «9ха» (2-9XL), належить до виду бактерій *Acinetobacter johnsonii*, причому зі штамом *Acinetobacter johnsonii* strain 42 гомологія становить 99%.

Основні властивості штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* - суперпродуцента рекомбінантного туберкульозного антигену.

Культурально-морфологічні властивості: При світловій мікроскопії (Фігури 1, 2 креслень. Світлова мікроскопія, бактерій 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*. Фарбування по Граму (Набір барвників фірми "Serva"). Культура 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* вирощена на туляремійному середовищі (FT-agar з 1% глюкозою й добавками, pH 6,6) протягом трьох діб при +32°C. А-Ув. 100X3...; В-100X9.3X... (Мікроскоп «Биомед-2», Росія). На представлених малюнках добре видно, що рекомбінантні бактерії 2-9XL стійкі до знебарвлення й схильні до агрегації (склеювання).

Капсула бактерій фарбується сафраніном у червоні кольори) бактерії являють собою нерухомі поліморфні дрібні коковидні й паличковидні клітини розмірами 0,4-1,0 мкм. При фарбуванні по Граму бактерії стійкі до знебарвлення, що робить враження грампозитивного фарбування. Утворюють різноманітні по розмірах і формі скупчення клітин, що вказує на їхній високий ступінь агрегації (склеювання). Агрегація бактерій пов'язана з утворенням специфічної капсули, що добре профарбовується сафраніном. При втраті рекомбінантного туберкульозного антигену бактерії стають істинно грамнегативні. Штам 2-9XL аероб росте на простому й багатому середовищах (ауксотроф) при +32°C, однак може рости в інтервалі від +28°C до +37°C. При рості бактерій на простих середовищах культура припиняє синтез рекомбінантного туберкульозного антигену. Необхідним фактором росту 2-9XL є цистеїн. Для максимального синтезу специфічної капсули, що містить рекомбінантний туберкульозний антиген, переважними є збагачені середовища з вітамінними й іншими добавками.

Як стимулятор росту бактерій і формування специфічної капсули можливе додавання в живильне середовище 1% суспензії автоклавированих бактерій 2-9XL й (або) 10% автоклавированої капсульної речовини. Найбільш зручними для вирощування рекомбінантного штаму 2-9XL є живильні середовища, використовувані для вирощування туляремії, чуми, бруцельозу й так далі. Посів культури на живильні середовища витримують в термостаті від двох до семи діб. При рості бактерій 2-9XL з'являється характерний специфічний не дратівний запах. Штам 2-9XL погано росте на рідких живильних середовищах і швидко втрачає здатність продукувати рекомбінантний туберкульозний антиген.

На щільних живильних середовищах бактерії 2-9XL утворюють колонії сіро-білого кольору з жовтуватим відливом. При титруванні культури до окремих ізолюваних колоній можлива затримка росту до двох доби. У міру росту розміри колоній можуть досягати діаметра 5-7 мм. Якщо чашки з посівом витримати 2-3 доби в холодильнику

(+4°C), колонії матимуть переважно жовто-сіре фарбування. Колонії опуклі з нерівними краями, неблiskучі, непрозорі, при узятті петлею консистенція колоній щільна, легко знімається з поверхні живильного агару. При титруванні культури 2-9XL на щільних живильних середовищах неможливо приготувати стандартну суспензію через високу здатність клітин до склеювання (спонтанна аглютинація), тому титр бактерій не відповідає стандартному розведенню (Фігури 3, 4, 5 креслень). Культурально-морфологічні властивості 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*. Ізольовані колонії рекомбінантного штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*, що вирости на FT-агарі із цистеїном й 1% глюкозою, рН 6,6 протягом трьох діб при +32°C. Зберігання в холодильнику (4°C) протягом п'яти діб. Фігура 3 – звичайний фон; фігури 4, 5 – білий фон. Фігура 5 – Збільшений фрагмент чашки Петрі).

Стабільність популяції штаму 2-9XL.

При послідовних пересіваннях на щільних живильних середовищах, вирощуванні при різних температурних режимах, після зберігання в ліофільно висушеному стані, погіршенні живильних властивостей середовища для вирощування й інших несприятливих умов, штаму 2-9XL стає нестійким і дисоціює в інші форми. Дисоціація найбільш помітна після тривалого вирощування ізольованих колоній (Фігури 6-11 креслень). Дисоціація культури 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* по культурально-морфологічних ознаках.

Чашка Петрі з дисоційованою культурою 2-9XL. Ріст колоній різної морфології при титруванні культури з ліофільно висушеного стану. FT-агар з 1% глюкозою, цистеїном, рН 6,6. Час інкубації при +32°C 10 доби, зберігання в холодильнику (+4°C).

Фігура 6 - Чашка Петрі сфотографована на білому фоні; фігура 7 - Чашка Петрі сфотографована на сірому фоні.

Фігури 8-11 - Збільшені фрагменти чашки Петрі з колоніями 2-9XL різної морфології.

Фігура 8 (1) - Велика кругла біла непрозора плоска з опуклим центром і рівним краєм блискуча колонія, легко знімається з агару петлею;

Фігура 8 (2) - Маленька кругла сіро-жовта непрозора опукла з рівним краєм не блискуча колонія, легко знімається петлею з агару;

Фігура 9 - Середня кругла сіро-жовто-біла непрозора з опуклим добре позначеним центром і вираженим валиком по рівному краю не блискуча колонія, легко знімається петлею з агару;

Фігура 10 - Середня не кругла жовта непрозора з вираженим опуклим центром нерівною поверхнею й краєм не блискуча колонія, легко знімається петлею з агару; Фігура 11 - Велика не кругла жовто-сіра непрозора з вираженим опуклим центром нерівною поверхнею й краєм не блискуча колонія, легко знімається петлею з агару). Біохімічні властивості штаму 2-9XL. Бактерії при рості на щільних живильних середовищах розщеплюють білки з виділенням специфічного не дратівного запаху. При рості на багатих живильних середовищах здатних синтезувати рекомбінантний туберкульозний антиген. Оксидазопозитивні й каталазо-негативні. Біохімічні властивості рекомбінантного штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* до кінця не вивчені. Імунохімічні властивості. Бактерії 2-9XL

володіють дуже високою адгезивністю (здатністю склеюватися) (Див. фігури 1, 2 креслень), що не дозволяє перевірити їх агглютинабельність у реакції аглютинації.

У реакціях імунодифузії (ІДФ) і імуоелектрофорезу з експериментальними сироватками, отриманими на ультразвукові дезинтеграції мікобактерій вірулентного штаму туберкульозу *M. tuberculosis* H37 Rv, антигени рекомбінантних бактерій 2-9XL не формують ліній преципітації. Імовірно, це пов'язане з тим, що антитіла на рекомбінантний Тб-антиген виникають тільки в процесі розвитку інфекції в організмі людини або тварин й їхній титр не буває більшим. У випадку вирощування мікобактерій на живильних середовищах і наступної інактивації їхнім ацетоном (або іншими твердими бактерицидними препаратами) цей антиген руйнується, і тому на нього не можна одержати специфічні антитіла.

В імуоферментному аналізі (ІФА) Тб-антиген в ультразвукових дезинтегратах бактерій й в очищеному виді взаємодіє з антитілами сироваток крові хворих туберкульозом людей і не взаємодіє з антитілами в сироватках крові здорових людей. В імуоблотинзі Тб-антиген не взаємодіє з антитілами хворих туберкульозом, тому що не переноситься на нітроцелюлозну мембрану.

Відношення до фагів даного виду. Для рекомбінантного штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* дотепер власні фаги не виявлені.

Генетичні особливості. Штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* у складі хромосомної ДНК містить як мінімум одну вставку фрагмента хромосомної ДНК *M. tuberculosis* H37 Rv, але можливі й дві вставки.

Продуктивність. Рекомбінантний штаму 2-9XL є продуцентом туберкульозного антигену Тб-антигену) глікопротеїнової природи. Білки, що синтезуються із фрагмента хромосомної ДНК *M. tuberculosis* H37 Rv, формують на зовнішній мембрані бактерії 2-9XL й у її капсульній речовині видоспецифічний глікопротеїновий комплекс (Фігури 12-14 креслень).

При одержанні ультразвукових дезинтегратів бактерій (УЗД) цей комплекс розбивається і є присутнім у вигляді декількох білків. При концентруванні УЗД трихлороцтовою кислотою білки Тб-антигену збираються в специфічний рекомбінантний туберкульозний комплекс. При неекспресивному виділенні рекомбінантного Тб-антигену з бактерій 2-9XL його молекулярна маса в SDS-PAAG, що денатурує, перебуває в інтервалі від 55,0 до 75,0 кДа (Фігури 12-14 креслень).

На представлений глікопротеїновий комплекс у лабораторних тварин формується тривалий напружений В- і Т-клітинний імунітет проти *M. tuberculosis* H37 Rv. При вивченні антитілопродукції (формування В-клітинного імунітету) на рекомбінантний Тв-антиген проводили імунізацію морських свинок і кроликів з метою одержання гіперімунних сироваток. Для імунізації використовували кроликів вагою 2,5-3 кг. 1 мл Тб-антигену в концентрації 1 мг, змішаний з рівним обсягом неповного адьюванта Фрейнда, вводили підшкірно у відділ спини в ділянці лопаток. Імунізацію повторювали три рази з тижневим інтервалом і дворазовим збі-

льшенням дози. По закінченні первинного циклу імунізації через 4 тижні проводили внутрішньом'язове повторне введення препаратів, починаючи з 2 мг й, кратно збільшуючи дозу, до 8 мг. Імунізацію морських свинок проводили підшкірно у відділ спини в ділянку лопаток Тв-антигеном у дозі 300 мкг/мл з неповним ад'ювантом Фрейнда. Через три тижні введення препарату повторювали. Анти-тілну відповідь у лабораторних тварин оцінювали через 21 день після останнього введення Тв-антигена. Для цього проводили забір крові, одержували сироватку й перевіряли наявність специфічних Тв-антитіл у реакції дифузійної преципітації й імуноферментним методом.

Показано, що виробіток специфічних антитіл відбувається вже після первинного введення препарату. При подальших ін'єкціях титри антитіл у сироватках зростали. По завершенню циклів імунізації були отримані гіперімунні сироватки з високим змістом Тв-антитіл. В імуноферментному аналізі з використанням Тв-антигена, узятого для імунізації, титри антитіл у морських свинок склали 1 : 6400, а в кроликів - 1 : 409600 і вище, у реакції дифузійної преципітації титри були 1:8 й 1:16-1 :32 відповідно.

Таким чином, присутність рекомбінантного Тв-антигена в організмі тварин викликає перебудову їхньої імунної системи по В-типу. Тривала присутність ТБ-антигену або повторне його введення робить перебудову імунної системи стійкою, на що вказує зростання титрів специфічних антитіл у сироватках крові тварин.

У хворих туберкульозом людей і бактеріоносіїв специфічний В-клітинний імунітет визначається за допомогою ТБ-антигену в імуноферментних тест-системах (ІФА), нанітроцелюлозних фільтрах (Імуноблотинг, Дот-блот) і в інших реакціях з використанням клінічних рідин (сироватка крові, мокротиння, плевральна рідина, спинномозкова рідина й інші), що містять специфічні антитіла.

Вивчення зразків сироваток крові хворих туберкульозом і здоровими людьми на наявність специфічних антитіл представлено в Таблиці 1.

Таблиця 1. Визначення наявності антитіл до збудника туберкульозу людини в зразках сироваток крові різних груп людей імуноферментним методом (Метод визначення представлений у Прикладі 4).

Зразки Сироваток крові від досліджуваних груп	Кількість зразків сироваток	Показники оптичної щільності (ОЩ)		
		ОЩ>0,6	0,3>ОЩ<0,6	ОЩ< 0,3
Хворі із фтизіопульмонології з діагнозом туберкульоз легенів ( МБТ+ та МБТ-)				
ТБ хворі ДІСК (МБТ+ та МБТ { в %})	227 (100%)	162 (71,4%)	39 (17,2%)	26 (11,4%)
Донори (Здорові люди)				
Донори ДІСК ВІЛ, ВГВ, ВГС - { в %}	45 (100%)	- -	6 13,3%	39 86,7%
Групи ризику				
Анонімні донори (сифіліс?) { в %}	60 100%	4 6,7%	9 15,0%	47 78,3
Солдати термінової служби	33	2	2	29
Персонал БІОНОМ { в %}	100%	6,1%	6,1%	87,8%
Спортсмени ДІСК { в %}	22 100%	4 18,2%	5 22,7%	13 59,1%
Студенти ДІСК { в %}	20 100%	3 15%	3 15%	14 70%
Групи із можливими перехресними реакціями				
Хворі ДІСК (ВГВ+ та ВГС+) { в %}	44 100%	1 2,3%	4 9,1%	39 88,6%
Вакциновані ДІСК ВГВ+ { в %}	10 100%	1 10%	3 30%	6 60%

Примітка: Зразки сироваток представлені Держ. НДІ стандартизації й контролю медичних і біологічних препаратів ім. Л.А. Тарасевича (ГІСК) і ООО «БИОНОМ». Обстежено 460 чоловік. ОЩ>0,6 - указує на наявність антитіл у сироватках крові до збудника туберкульозу; 0,3>ОЩ<0,6 - сумнівний результат («сіра зона»); ОП<0,3 - указує на відсутність антитіл до збудника туберкульозу; МБТ + - діагноз «туберкульоз» підтверджений виділенням мікобактерій із хворого; МБТ- - діагноз «туберкульоз» підтверджений клініко- рентгенологічними методами. ВІЛ - вірус імунодефіциту людини; ВГВ - вірус гепатиту В; ВГС - вірус гепатиту С

Виводи: 1. З 227 зразків сироваток крові хворих туберкульозом в 71,4% виявлені антитіла до збудника туберкульозу *M. tuberculosis H37 Rv*.

2. В 45 зразках сироваток крові донорів (здорових людей) не виявлено антитіл до збудника туберкульозу *M. Tuberculosis H37 Rv*.

3. У групах ризику в зразках сироваток крові наявність антитіл до збудника туберкульозу *M. tuberculosis H37 Rv* варіює від 2,3% до 18,2%.

Вивчення специфічної активності ТВ-антигена у формуванні Т-клітинного імунітету проводили шляхом постановки шкірних туберкулінових проб на морських свинках. Для цього групам морських свинок вводили туберкульозну вакцину BCG (внутрішньошкірно по 0,5 мг в 0,2 мл розводящої рідини) і суспензії мікробних клітин вірулентних штамів *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, *R1Rv*, а також атипічних штамів *M. kansasii*, *M. marinum* (внутрішньобрюшинно в дозі  $10^6$  мікробних клітин на тварину). Через 4 тижні після інфікування, дослідчених і контрольних морських свинок використали для постановки внутрішньошкірної проби Манту за загальноприйнятою методикою /ІНСТРУКЦІЯ із застосування алергену туберкульозного очищеного сухого для нашкірного, підшкірного й внутрішньокірного застосування (сухого очищеного туберкуліну). Головне Управління лікувально-профілактичної допомоги Мінздраву СРСР. Москва. 11 серпня 1986 р./ Концентрація препаратів, що вводять внутрішньошкірно, становила 10 мкг по загальному білку в 100 мкл розводящої рідини. Специфічну алергічну реакцію вповільненого типу у вигляді місцевої реакції виникаючого клітинного інфільтрату (папули) урахували в міліметрах через 24 години. Препаратом порівняння служив сухий очищений туберкулін (*Tuberculinum depuratum siccum*) виробництва РАО "БИОПРЕПАРАТ", Санкт-Петербурзького НДІ Вакцин і Сироваток- PPD-L-2 (доза для внутрішньошкірного введення-25 ТЕ).

Результати експериментів показали, що ТВ-антиген, отриманий з рекомбінантного штамів 2-9XL, викликає місцеву шкірну реакцію у сенсibiliзованих свинок (реакція гіперчутливості вповільненого типу), причому деякі з них по розмірах папули (12- 15мм) були порівнянні з референс-препаратом. Відзначено достовірну різницю в розмірах шкірної реакції у тварин, інфікованих вірулентним туберкульозним штамом, атипічними штамми й BCG, що вказує на видову специфічність ТВ-антигена. Але, на відміну від туберкуліну, місцева алергічна реакція у відповідь на внутріш-

ньошкірне введення ТВ-антигену виникала й у частини контрольних тварин, що, імовірно, пов'язане з недостатнім очищенням ТВ-антигена, як складного глікопротеїнового комплексу. Однак, очевидно, що на досліджуваний ТВ-антиген формується стійкий видоспецифічний Т-клітинний імунітет.

Отже, ТВ-антиген досить перспективний як діагностичний препарат для визначення наявності специфічного Т-клітинного імунітету у хворих й інфікованих туберкульозом людей й як біологічна вакцина.

Патогенність для лабораторних тварин. Рекомбінантний штам 2-9XL не має залишкову вірулентність для всіх видів лабораторних тварин.

Згідно із «Заключенням по перевірці на залишкову вірулентність ліофільно висушеної культури штамів 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*», проведеному в НДЦ Токсикології й гігієнічної регламентації біопрепаратів, значення  $LD_{50}$  для лінійних мишей Balb/c і золотавих хом'яків перевищує  $1 \times 10^7$  мікробних клітин й  $5 \times 10^7$  мікробних клітин відповідно. Штам 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* авірулентний для морських свинок і кроликів (значення  $LD_{50} > 1 \times 10^9$  мікробних клітин на тварину).

Таким чином, на підставі показника залишкової вірулентності (патогенності) штам 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* може бути віднесений до 4-ї групи мікроорганізмів по Міжнародній класифікації. Копії «Заключення з перевірки на залишкову вірулентність ліофільно висушеної культури 2-9XL *Acinetobacter*» НДЦ ТБП додаються.

Умови й склад середовищ для зберігання й підтримки штамів. Музейна культура штамів 2-9XL *Acinetobacter* зберігається при температурі +4°C на косячках FT-середовища з добавками глюкози й цистеїна до 2 місяців, а в ліофільно висушеному стані в сахарозо-желатиновому середовищі до 5 років.

Середовище для культивування. Рекомбінантний штам 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* культивується на щільному FT-середовищі з добавками глюкози й цистеїна при +32 С.

Технологічні особливості при культивуванні.

Рекомбінантний штам 2-9XL погано росте в рідких живильних і швидко губить здатність продукувати ТВ-антиген. Тому нарощування біомаси для наступного виділення ТВ-антигену проводять тільки на щільних живильних середовищах. Матричну культуру вирощують на косячках при +32°C протягом 2-3 -х доби, потім змивають бактерії фізіологічним розчином і з одного косячка засівають один – два матраци. Матраци інкубують у термостаті в при +32°C протягом 3-4-дб, потім вирощу біологічну масу змивають дистильованою водою й центрифугуванням звільняються від розчинних компонентів живильного середовища. З очищеного від компонентів живильного біологічного середовища маси починають виділення рекомбінантного ТВ-антигену.

Винахід ілюструється наступними прикладами:

Приклад 1. Одержання видоспецифічного глікопротеїнового туберкульозного комплексу (ТВ-антигену) з рекомбінантного штамів 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*. На щільне живильне середовище (косячки) pH 6,6, що складається із серце-

во-мозкового агару, гідролізованого гемоглобіну, цистеїна й глюкози у відповідних пропорціях або FT-агара pH 6,6 (Виробництво ФГУП ГНЦ ПМ, Оболенск, Росія) з додаванням цистеїна й глюкози петлею роблять посів культури 2-9XL. Посів інкубують у термостаті при +32 С протягом двох діб. Дводобову культуру змивають фізіологічним розчином і готують суспензію бактерій у концентрації  $5 \times 10^9$  мікробних клітин (м. к.) в одному мілілітрі.

[Одержання суспензії бактерій 2- 9XL досить складно, тому що культура змивається пластівцями, які при перемішуванні дуже погано розбиваються]. Для одержання великої кількості біологічної маси отриману суспензію висівають на матраці з розрахунку один косячок на 1-2 матраца (В один матрац наливають 400,0 мл живильного середовища).

Посів інкубують у термостаті при +32 С протягом трьох діб. З одного матраца тридобову культуру 2-9XL змивають 30 мл фізіологічного розчину. Із суспензії змитої культури готують мазок для світлової мікроскопії й офарблюють його по Граму. [Популяція бактерій рекомбінантного штаму 2-9XL при невеликих змінах складу живильного середовища, температурного режиму або інших умов може швидко дисоціювати у форми, які не продукують ТБ-антигену. При фарбуванні по Граму ці бактерії грамнегативні, бактерії-продуценти ТБ-антигену - стійкі до знебарвлення й виглядають як грам позитивні (фігури 1, 2 креслень). У вирості біомасі 2-9XL кількість грамнегативних бактерій не повинна перевищувати 5-10%].

Суспензію змитих з матраца бактерій центрифугують ("Beckman" G2-21, USA) при 9000 об./хв протягом 30 хвилин. Надосадову рідину, що містить розчинні компоненти живильного середовища, відкидають, а осад суспендують в 40 мл охолодженої деіонізованої води, і всі наступні процедури роблять при +4 С. Далі проводять обробку культури 2-9XL 0,5N розчином NaOH, доводячи pH від 6,0 до 9,0. розчинення, що відбувається при цьому, капсули бактерій, що містять видоспецифічний рекомбінантний ТБ-антиген, ведуть дрібно, додаючи NaOH невеликими порціями й ретельно перемішуючи суспензію протягом декількох годин. Оброблену в такий спосіб суспензію бактерій залишають у холодильнику (+4°C) на ніч (15-16 годин). Наступного дня суспензію бактерій 2-9XL центрифугують при 12000 об./хв.. протягом 40 хвилин. Водну фракцію, що містить розчинену капсулу рекомбінантного штаму 2-9XL, відокремлюють від осаду. У зв'язку з неповним розчиненням капсули повторюють процедуру обробки осаду лугом у тій же послідовності.

Отриману першу порцію препарату капсули 2-9XL на холоду нейтралізують 0,5N розчином трихлороцтової кислоти (ТХО) до pH 6,0 й, тому що він містить досить велику кількість бактерій, центрифугують при 15000 об./хв.. протягом 40 хвилин. Осад відкидають, а надосадову рідину зачисляють 0,5N ТХО до pH 3,0-3,5. При цьому ТБ-антиген збирається в комплекс і починає випадати в осад. Препарат залишають у холодильнику (+4°C) на ніч (15-16 годин). Випавший за ніч ТХО- осад у цьому розчині може зберігатися при +4 С до двох тижнів без втрати специфічної активності ТБ-антиген, що

перебуває в ньому. На ніч у холодильнику залишають другу порцію препарату для формування осаду ТБ-антигену.

На третій день першу порцію препарату з осадом, що випав, центрифугують при 9000 об./хв протягом 30 хвилин. Надосад відкидають. З розрахунку на один матрац осад розчиняють в 1-2 мол PBS-буфері (0,0067M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,0067M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,138M NaCl, 0,0027M KCl pH 7,0). У розчині PBS-буфера втримується переважно видоспецифічний ТБ-антиген (фігура 12 креслень. Електрофорез ТБ-антигену рекомбінантного штаму 2- 9XL *Acinetobacter johnsonii*. 16% SDS-PAAG електрофорез білків рекомбінантного штаму 2-9XL. 60-170v. 60 хвилин. Тріс- гліциновий буфер pH 8,3. M - маркери: 67,0 кДа; 45,0 кДа; 25,0 кДа; 17,0 кДа; 12,3 кДа.

1 - Білки ультразвукового дезинтеграта 2-9XL. Стрілкою зазначено подвійний білок ТБ-антигену, що не проявляє специфічної активності; 2 - Білки ультразвукового дезинтеграта, переосажденного трихлороцтовою кислотою (ТХО). Стрілкою зазначений ТБ-антиген у зборці. Цей білковий комплекс проявляє специфічну активність, що вже проявляє специфічну активність, але вимагає додаткового очищення.

Із залишеної на ніч другої порції препарату повторюють всі необхідні процедури (нейтралізують 0,5N ТХО до pH 6,0, звільняються від кліток, що залишилися, зачисляють 0,5N ТХО до pH 3,0-3,5 і розчин з осадом, що випадає, залишають на ніч). ТХО-осадок, що випав за ніч, може зберігатися при +4°C до двох тижнів без втрати специфічної активності ТБ-антигену, що перебуває в ньому.

Наступного дня другу порцію препарату розчиняють в 1-2 мол PBS-буфера. Він містить переважно видоспецифічний ТБ-антиген.

Наличие ТБ-антигену, отриманого вищеописаним способом, реєструють в SDS-PAAG електрофорезному гелі (Фігура 12 креслень).

ТБ-антигени першої й другої порцій поєднують і піддають подальшому очищенню. У результаті проведених експериментів встановлено, що: а) Рекомбінантний видоспецифічний ТБ-антиген локалізується в зовнішніх структурах бактерій 2-9XL (зовнішня мембрана й капсульна речовина) і може бути виділений і сконцентрований шляхом вищеописаних процедур, б) при проведенні вищеописаних процедур бактерії рекомбінантного штаму 2-9XL практично не руйнуються й частка одержуваного ТБ-антигену досить висока в порівнянні з іншими, присутніми в розчині білками, ліпідами й полісахаридами бактерій. Таким чином, можна вважати, що наведений Приклад є найбільш економічним одержанням ТБ-антигену з рекомбінантного штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*, але він не виключає можливості одержання його будь-яким іншим способом (Руйнування бактерій за допомогою ультразвуку або шляхом заморожування-відтавання, або іншим способом, з наступною концентрацією ТБ-антигену). Приклад 2. Одержання видоспецифічного глікопротеїнового туберкульозного комплексу (ТБ-антигену) з рекомбінантного штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*. На щільне живильне середовище (косячки) із pH 6,6, що складається із серцево-мозкового агару, гид-

ролізованного гемоглобіну, цистеїна й глюкози у відповідних пропорціях або FT-агара pH 6,6 (Виробництво ФГУП ГНЦ ПМ, Оболенск, Росія) петлею роблять посів культури 2-9XL. Посів інкубують у термостаті при +32°C протягом трьох діб. Тридобову культуру змивають фізіологічним розчином і готують суспензію бактерій у концентрації  $5 \times 10^9$  мікробних клітин (м. к.) в одному мілілітрі.

Отриману суспензію висівають на матраці з розрахунку один косячок на 1-2 матраца (В один матрац наливають 400,0 мол живильного середовища). Посів інкубують у термостаті при +32°C протягом трьох доби. З одного матраца тридобову культуру 2-9XL змивають 30 мл фізіологічного розчину. Із суспензії змитої культури готують мазок для світлової мікроскопії й офарблюють його по Граму (Контроль наявності Тб-антигену в Рекombінантних бактеріях 2-9XL).

Суспензію змитих з матраца бактерій центрифугують ("Beckman" G2-21, USA) при 9000 об./хв. протягом 30 хвилин. Надосадову рідину, що містить розчинні компоненти живильного середовища, відкидають, а осад суспендують в 40 мл охолодженої деіонізованої води й всі наступні процедури роблять при +4°C. Далі проводять обробку культури 2-9XL 0,5N розчином NaOH, доводячи pH від 6,0 до 9,0. Процедуру, що відбувається при цьому, розчинення капсули бактерій, що містять видоспецифічний рекombінантний Тб-антиген, ведуть дрібно, додаючи NaOH невеликими порціями й ретельно перемішуючи суспензію протягом декількох годин. Оброблену в такий спосіб суспензію бактерій залишають у холодильнику (+4°C) на ніч (15-16 годин).

На другий день суспензію бактерій 2-9XL центрифугують при 12000 об./хв. протягом 40 хвилин. Надосадову рідину (частково розчинену капсулу рекombінантного штаму 2-9XL утримуючи Тб-антиген), відокремлюють від осаду (бактерії 2-9XL, що зберегли й не зберегли капсулу). До осаду додають 40 мол деіонізованої води й повторюють процедуру розчинення капсули, одержуючи другу порцію препарату.

Отриманий препарат капсули 2-9XL нейтралізують 0,5N розчином трихлороцтової кислоти (ТХО) до pH 6,0, а потім додають сульфат амонію  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  до 30% насичення.

Розчин залишають на ніч при +4°C для випадання осаду. Наступного дня препарат центрифугують при 12000 об./хв. протягом 40 хвилин. Осад відкидають (він, переважно, містить цілі бактерії і їхні великі фрагменти). До надосадової рідини, що містить переважно Тб-антиген, додають сульфат амонію до 100% насичення. Препарат залишають на ніч при +4°C для випадання осаду.

Другу порцію препарату капсули 2-9XL нейтралізують 0,5N розчином трихлороцтової кислоти (ТХО) до pH 6,0, а потім додають сульфат амонію  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  до 30% насичення, залишають на ніч при +4°C для випадання осаду.

Наступного дня препарат Тб-антигену, що випав в осад при 100% осадженні сульфатом амонію, центрифугують при 12000 об./хв. протягом 40 хвилин. Надосад відкидають, осад розчиняють в 2,0 мол PBS-буфера pH 7,0 (з розрахунку на один

матрац) і діалізують проти великого обсягу PBS-буфера.

Протягом доби обсяги PBS-буфера міняють не менш трьох разів для повного видалення з діалізного мішка сульфату амонію. Другу порцію препарату, що містить 30% сульфату амонію, центрифугують при 12000 об./хв. протягом 40 хвилин й осад відкидають, надосад насичують до 100% сульфатом амонію й залишають на ніч при +4°C.

На наступний день препарат другої порції Тб-антигену, що випав в осад при 100% осадженні сульфатом амонію, центрифугують при 12000 об./хв. протягом 40 хвилин.

Надосад відкидають, осад розчиняють в 2,0 мол PBS-буфера pH 7,0 (з розрахунку на один матрац) і діалізують проти великого обсягу PBS-буфера.

Протягом доби обсяги PBS-буфера міняють не менш трьох разів для повного видалення з діалізного мішка сульфату амонію. Присутність сконцентрованого Тб-антигену у PBS-буфері після діалізу першої й другої порцій препарату контролюють в SDS-PAAG електрофорезі (Фігура 13 креслень. Електрофорез Тб-антигену рекombінантного штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*. 16% SDS-PAAG електрофорез білкового комплексу 2-9XL, виділеного сульфатним переосадженням. 60-170v. 60 хвилин. Тріс-гліциновий буфер pH 8,3. М - маркери: 67,0 кДа; 45,0 кДа; 25,0 кДа; 17,0 кДа; 12,3 кДа. 1-2 - Білки очищеного Тб-антигену на Sephadex G200. Стрілками зазначений білковий Тб-антигену в зборці. Цей білковий комплекс проявляє специфічну активність).

Тб-антигени першої й другої порцій поєднують і піддають подальшому очищенню. Таким чином, одержання й концентрування видоспецифічного глікопротеїнового туберкульозного комплексу (Тб-антигену) з рекombінантного штаму 2-9XL можливо не тільки за допомогою осадження його з лужних лізатів трихлороцтовою кислотою до pH 3,5-4,0, як показано в Прикладі 1. Можливе використання методів осадження Тб-антигену за допомогою різних солей, наприклад, сульфату амонію або інших методів, елюати містять очищений Тб-антиген з молекулярною масою від 55,0 до 75,0 кДа й наявність вуглеводів від 20% до 50%.

Приклад 3. Очищення видоспецифічного глікопротеїнового туберкульозного комплексу (Тб-антигену), отриманого з рекombінантного штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*. Подальше очищення специфічного туберкульозного антигену 2-9X проводять шляхом фракціонування макромолекул гель-фільтрацією при низькому тиску з використанням як матрицю Сефадекса G-200.

Об'єднані сконцентровані Тб-антигени в PBS-буфері, отримані шляхом осадження лізатів 0,5 N ТХО або 100% осадженням сульфатом амонію (Приклад 2.), наносять на колонку розміром 25x600. У якості елюента використовують 50 mM розчин Тріс-HCL, pH 7,5, з додаванням 100 mM NaCl, швидкість елюції- 25 мл/год. Піки збирають, вимірюють білок за методом, описаним Бредфордом /4/. Загальний вміст вуглеводів визначають фенольним методом 151. Залежно від способу осадження Тб-антигену з розчиненої капсули мікробної клітки (Приклад 1 й 2), обсягу зразка, що



наноситься, й концентрації білка елюати містять очищений ТБ-антиген з молекулярною масою від 55,0 до 75,0 кДа й наявністю вуглеводів від 20% до 50%.

Специфічні туберкульозні рекомбінантні антигени зберігають при +4°C у ліофільно висушеному стані.

Наявність очищеного ТБ-антигену і його структуру, отриманого вищеописаним способом, реєструють в SDS- PAAG електрофорезному гелі (Фігура 14 креслень. Електрофорез ТБ-антигену рекомбінантного штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii*. 17% SDS-PAAG Електрофорез рекомбінантного білкового ТБ-комплексу 2-9XL по Лемлі. 60-170v. 60 хвилин. Тріс- гліциновий буфер pH 8,3. М - маркери: 67,0 кДа; 45,0 кДа; 25,0 кДа; 17,0 кДа; 12,3 кДа. 1-2 - Білки очищеного ТБ-антигену на Sephadex G200. Вертикальними стрілками зазначений ТБ-антиген у збірці. Цей білковий комплекс проявляє специфічну активність. Бічними стрілками зазначені компоненти білкового комплексу).

Одержання очищеного ТБ-антигену можливо не тільки шляхом фракціонування макромолекул гель-фільтрацією з використанням як матрицю різних носіїв, але й за допомогою іонообмінної хроматографії.

Приклад 4. Використання очищеного видоспецифічного ТБ- антигену в діагностиці туберкульозу людини. При латентних, хронічних і гострих формах захворювання людини туберкульозом у його крові формуються антитіла, що є специфічними для даного збудника - *M. tuberculosis* H37 Rv, що дозволяє проводити діагностику захворювання по зазначеній ознаці. Для пошуку специфічних антитіл використовують тест-систему, що являє собою непрямий імуоферментний аналіз із поділом фаз, де як твердий носій використовують 96- лункові планшети. Підкладкою для ELISA служить туберкульозний антиген, отриманий з рекомбінантного штаму 2-9X шляхом хроматографічного фракціонування. У лунки планшет вносять по 100 мкл антигену в концентрації 10 мкг/мол у фосфатному буфері й інкубують 18 годин при кімнатній температурі. Комірки триразово відмивають забуференим фізіологічним розчином, pH 7,2, (ЗФР) з 0,05% Tween 20 й «забивають» протягом години 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну в ЗФР. Після троекратного відмивання в лунки 1-го вертикального ряду планшета вносять по 100 мкл нативної сироватки крові, що не містить специфічних антитіл у розведенні 1 :200 (негативний контроль), а з 3-го по 12-й вертикальні ряди - ЗФР у тім же обсязі. Потім у кожну лунку 2-го вертикального ряду додають по 200 мкл досліджуваних сироваток у розведенні 1 :100 і восьмиканальною автоматичною піпеткою титрують дворазовим кроком, з останнього ряду видаляють 100 мкл. Для розведення сироваток використали ЗФР pH 7,2. Планшети інкубують 1 годину при 37° С. Як позитивний контроль використовують сироватку крові зі свідомо відомим високим титром специфічних антитіл (калібрування). Одну з лунок планшета (останню) відводять для контролю субстрату, додаючи до 10 мкл кон'югату 100 мкл субстрату. Після видалення антитіл, що не зв'язалися, п'ятикратним відмиван-

ням планшета 30-0,05%Tween 20 в обсязі 170 мкл до імуноглобулінів додають для вторинного зв'язування по 100 мкл антивидових Ig антитіл до імуноглобулінів А, М, G, кон'югованих пероксидазою хрому (Sigma), у робочому розведенні 1 :5000.

Реакційну суміш інкубують 1 годину при 37°C, після чого коміри п'ятикратно відмивають ЗФР-Tween 20. Розчин субстрату готують додаванням 3 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до 10 мл свіжоприготовленого 0,04% хромогену AzBTS (ApliHem) в 0,1М цитратно-фосфатному буфері, pH 5,0 і по 100 мкл розчину додають у кожну лунку.

Для прояву кольорової реакції планшету інкубують при +37°C протягом години, вносять по 100 мкл 1% SDS для зупинки ферментативної реакції й вимірюють величину світлоадсорбції при 405 нм на вертикальному фотометрі фірми Bio-Rad, модель 680. Результати порівнюють із бланком лунок вертикального ряду, у яких перебувала сироватка, що не містить специфічних антитіл. Очищений рекомбінантний ТБ-антиген взаємодіє тільки з антитілами сироваток крові хворих туберкульозом людей і не взаємодіє з антитілами сироваток крові здорових людей.

Таким чином, рекомбінантний ТБ-антиген 2-9XL можна використати в діагностичних цілях на твердофазному носії, нітроцелюлозній мембрані й в інших тест-системах, за допомогою яких ідентифікуються специфічні антитіла, які виробляються організмом людини на присутність або розмноження в ньому збудника туберкульозу - *M. tuberculosis* 1137 Rv. Специфічні антитіла, вироблені людиною у відповідь на проникнення й розвиток у ньому збудника туберкульозу, можуть бути не тільки в сироватці крові, але й в інших клінічних рідинах (мокротинню, екссудаті, сечі й так далі).

Отримані на очищений рекомбінантний ТБ-антиген моноклональні антитіла або гіперімунні сироватки різних тварин (кроликів, мишей, морських свинок й інші) можна використати в діагностичних методах при пошуку в клінічних рідинах людини (мокротиння, екссудат, матеріал при мікробіопсії й так далі) як мікобактерій туберкульозу, так й їхніх специфічних компонентів.

Наведені вище приклади виділення й використання рекомбінантного видоспецифічного туберкульозного антигену, отриманого з безпечного для людини й тварин генно-інженерного штаму 2-9XL *Acinetobacter johnsonii* указують на те, що даний мікроорганізм знайде широке застосування в охороні здоров'я й медицині як джерело корисного продукту, використовуваного в діагностиці, профілактиці й лікуванні туберкульозу людини.

З огляду на властивості рекомбінантного штаму *Acinetobacter johnsonii* 9XL, даний мікроорганізм депонований 29.11.05 року у Всеросійській Колекції Промислових Мікроорганізмів (ВКПМ) ФГУП ДержНДІгенетика за індексом VKPM B-9312.

Список літератури:

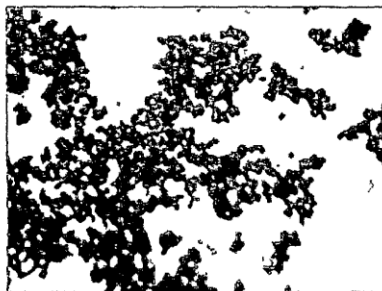
1. S. Arruda, G. Bomfim, R. Knights, T. Huima-Byron, L. W. Riley "Cloning of *M. tuberculosis* DNA Fragment Associated with Entry and Survival Inside Cells". "Science", 1993, N261 (5127), p. 1454-1457.
2. C. Manca, K. Lyaschenko, H.G. Wiker, D. Usai, R. Colangeli, M.L. Gemiario. "Molecular Cloning,

Purification and Serological Characterization of MPT63, a Novel Antigen Secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. 3. G. Hart, Bai-yu Lee, M. A. Horwitz. "High-Level Heterologous Expression and Secretion in Rapidly Growing Nonpathogenic *Mycobacteria* of Four Major *Mycobacterium tuberculosis* Extracellular Proteins Considered To Be Leading Vaccine

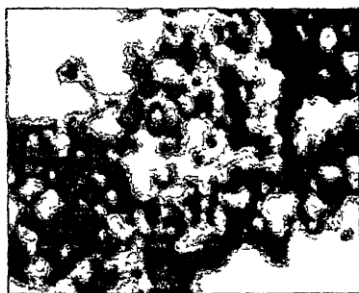
Candidates and Drug Targets. "Infection and Immunity", June 1997, p. 2321-2328.

4. Bredford. Anal. Biochem. 72, 248 (1976), а також Anal. Biochem. 86,142 (1978 )

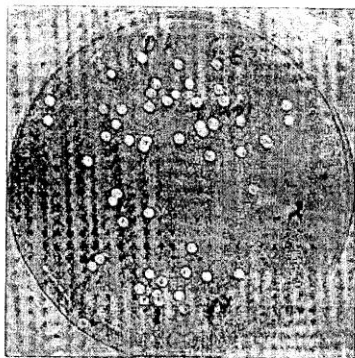
5. Ф. Герхардт "Методи загальної бактеріології" 1984, т.2.



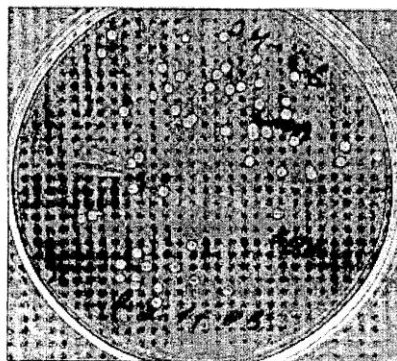
ФІГ. 1



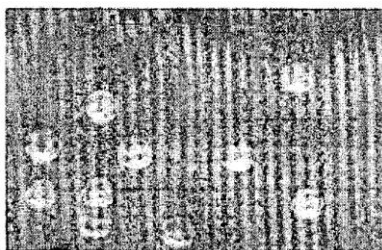
ФІГ. 2



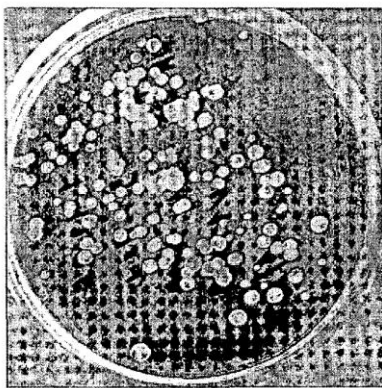
Фиг. 3



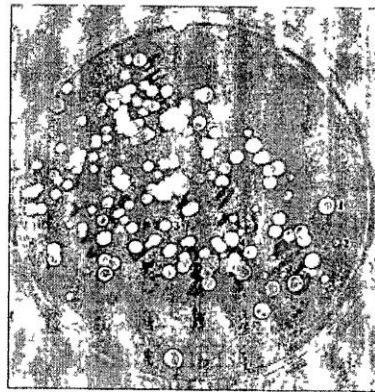
Фиг. 4



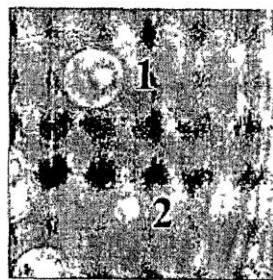
Фиг. 5



Фиг. 6



ФІГ 7



ФІГ. 8



ФІГ. 9