

Федорова Е. А., Богомолова Е. Г., Добровольская О. А., Черняева Е. Н.
РАЗРАБОТКА ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ ПЛАЗМИДНОЙ
ДНК КАК ОСНОВЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА
Научный руководитель канд. биол. наук Духовлинов И.В.
ООО «АТГ Сервис Ген», г. Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Туберкулез (ТБ) является заболеванием, поражающим человека с очень давних времен. ТБ ранее называли «чахоткой», или «сухоткой», так как больные под влиянием хронического течения болезни «чахли», «увядали», «истощались». В 1919 году Кальметт и Герен показали, что возможно создать специфичный искусственный иммунитет с помощью ослабленного, но частично потерявшего вирулентность штамма микобактерий, - на основе полученного ими штамма была создана первая, впервые введенная новорожденному ребенку в 1921 г., и до сих пор используемая в мире вакцина, названная в их честь, - BCG, русское обозначение - БЦЖ. Следует отметить, что вакцинация БЦЖ защищает только младенцев и детей младшего возраста только от развития самых тяжелых форм ТБ, и данная защита не является длительной, и не защищает от инфицирования микобактериями. Согласно докладу ВОЗ по ТБ 2014 г., новая вакцина, которая поможет предотвратить передачу ТБ среди подростков и взрослых в развивающихся странах, будет самым экономически эффективным инструментом в смягчении эпидемии. Вакцины на основе специфичных рекомбинантных молекул являются наиболее безопасными.

Цель: разработка генетической молекулы для создания вакцины против ТБ.

Материалы и методы. Для расчета нуклеотидной последовательности целевого гена использовали инструменты на сайте molbiol. Синтезированный ген амплифицировали с использованием ПЦР. Полученный ген и плазмидную ДНК pcDNA3.1(+) обрабатывали рестриктазами, с дальнейшим лигированием полученных фрагментов и трансформацией клеток *E.coli* DH10B/R. Полученный штамм использовали для наработки генетической молекулы. Выделение и очистка осуществлялись с использованием набора EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen). Полученную молекулу вводили белым беспородным мышам в количестве 50 мкг в PBS. Животных умерщвляли на 2, 5 и 7 день, приготавливали сыворотки. Полученные сыворотки анализировали электрофорезом в ПААГ с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану и визуализацией целевого белка с использованием хемилюминесценции. Концентрацию белка Ag85b в сыворотке определяли с помощью количественного ИФА. Для построения калибровочной кривой, а также получения специфичных антител для вестерн-блота использован гибридный белок, включающий Ag85b.

Результаты и их обсуждение. Химически синтезированная последовательность гена, кодирующая белок Ag85b *M.tuberculosis*, оптимизирована по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих, добавлены элементы для обеспечения синтеза данного белка в клетках млекопитающих и секреции. Создана, наработана и очищена плазмидная ДНК pcDNA3.1(+)-Ag85b. Проанализированы длительность и уровень экспрессии гена *ag85b* на лабораторных животных. С использованием вестерн-блота и ИФА показано, что закодированный целевой белок синтезируется в организме в течение недели, причем максимальный уровень наблюдается на пятый день после введения такой плазмидной ДНК. Показано наличие данного антигена в сыворотке мышей на 2 день после иммунизации в концентрации (2±1) нг/мл, на 5 день - (30±4) нг/мл, на 7 день - (6±2) нг/мл.

Выводы. Разработана плазмидная ДНК pcDNA3.1(+)-Ag85b, обеспечивающая синтез антигена *M. tuberculosis* в клетках млекопитающих и его секрецию на высоком уровне, в течение недели. Учитывая, что белок Ag85b обладает протективным потенциалом против микобактерий, полученная генетическая молекула может быть использована для создания кандидатной вакцины против ТБ.