

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2023-7-12
 Публикуется на принципах открытого доступа
 Published under an open access license
 Creative Commons Attribution 4.0 International License.
 УДК: 619:616.98:636.2

Сравнительный анализ белковых профилей *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis*: ключевые аспекты



Москвичева А.В.

¹Москвичева А.В., соискатель,
 agerasimova2286@mail.ru

^{2,4}Валеева А.Р., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ЦНИЛ, anna-valeeva@mail.ru

²Казарян Г.Г., инженер, gevorg.kazarian@mail.ru

^{2,3}Хаертынов К.С., кандидат биологических наук, заведующий ЦНИЛ khaerkamil@mail.ru

^{4,1,2}Шуралев Э.А., кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры прикладной экологии, eduard.shuralev@mail.ru

^{1,3}Ефимова М.А., доктор биологических наук, профессор кафедры эпизоотологии и паразитологии, marina-2004r@mail.ru

¹Равилов Р.Х., доктор ветеринарных наук, профессор, член-корр. АН РТ, ректор rustam.ravilov@mail.ru

¹ФГБОУ ВО "Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана", г. Казань

²Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Казань

³ФГБНУ "Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности" (ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ"), г. Казань

⁴ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань

Ключевые слова: *M. bovis*, *M. tuberculosis*, белковый профиль, электрофорез, иммуноблоттинг

Для цитирования / For citation

Сравнительный анализ белковых профилей *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis*: ключевые аспекты / Москвичева А.В. [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2023. – №7. – С.51–53.
 Comparative analysis of protein profiles of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*: key aspects / Moskvicheva A.V., [et. al.] // Veterinaria i kormlenie. – 2023. – #7. – P.51–53.

Comparative Analysis of Protein Profiles of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*: Key Aspects

¹Moskvicheva A.V., ^{2,4}Valeeva A.R., ²Kazaryan G.G., ^{2,3}Khayertinov K.S., ^{4,1,2}Shuralev E.A., ^{1,3}Efimova M.A., ¹Ravilov R.Kh.

¹Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kazan

³Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological safety", Kazan

⁴Kazan Federal University, Kazan

Key words: *M. bovis*, *M. tuberculosis*, protein profile, electrophoresis, immunoblotting

Abstract. Tuberculosis in cattle continues to be a pressing issue in veterinary medicine and human health, causing significant economic damage to the livestock industry and posing a serious threat to the population. This article focuses on the investigation of protein spectra and antigen profiles of two types of mycobacteria - *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*, which cause tuberculosis in cattle and humans. The study used cultures of *M. bovis* and *M. tuberculosis* that were grown for 5 months in liquid Sauton medium. The isolation of expression products from *M. tuberculosis* and *M. bovis* cultures involved sequential steps, including centrifugation, filtration through acetatcellulose membranes, and concentration using ammonium sulfate. The research revealed significant differences in the protein spectra and antigenic composition between *M. bovis* and *M. tuberculosis*. Unique antigens with molecular masses ranging from 14 kDa to 56 kDa were identified in *M. bovis*, while *M. tuberculosis* antigens had molecular masses ranging from 12 kDa to 51 kDa. These differences suggest the potential use of the identified unique antigens for differential diagnosis.

Резюме. Туберкулез крупного рогатого скота продолжает оставаться острой проблемой в ветеринарии и медицине, причиняя огромный ущерб народному хозяйству и представляя серьезную опасность населению. Статья посвящена исследованию белковых спектров и антигенного профиля двух видов микобактерий – *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis*, вызывающих туберкулез у крупного рогатого скота и человека. Объектами исследования были культуры *M. bovis* и *M. tuberculosis*, которые были выращены в течение 5 месяцев в жидкой питательной среде Сотона. Выделение продуктов экспрессии *M. tuberculosis* и *M. bovis* из культуральной среды производилось последовательно, включая этапы центрифугирования, фильтрования через ацетатцеллюлозные мембраны и концентрирования с использованием сульфата аммония. В ходе исследования были обнаружены существенные различия в белковых спектрах и антигенном составе *M. bovis* и *M. tuberculosis*. У *M. bovis* были выделены уникальные антигены с молекулярной массой от 14 кДа до 56 кДа, в то время как у *M. tuberculosis*

антигены имели молекулярную массу от 12 кДа до 51 кДа. Выявленные различия свидетельствуют о потенциале использования выделенных уникальных антигенов для дифференциальной диагностики.

Введение

Туберкулез крупного рогатого скота, вызываемый *Mycobacterium bovis*, членом комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (МТВс), продолжает оставаться одной из ведущих, наиболее сложных, социально- и экономически значимых зоонозных инфекций, представляя глобальную проблему Единого здоровья [1, 3]. Огромные экономические потери для индустрии животноводства связаны с затратами на диагностику, убой животных, обезвреживание молока, санацию помещений и территории, а также с ограничениями продажи и экспорта животных [4, 5].

Известно, что представители рода микобактерий, в частности *M. bovis* и *M. tuberculosis*, обладают множеством общих антигенов, что объясняется их тесным генетическим родством и схожим эволюционным происхождением. Микобактериальная клетка активно синтезирует множество разнообразных белков, которые играют ключевую роль в адаптации и уклонении от иммунной системы организма-хозяина и в патогенезе инфекции. В то же время, распределение отдельных белков и их антигенных эпитопов в микобактериальных клетках видоспецифично и связано с их функциональными характеристиками и особенностями взаимодействия с иммунной системой хозяина после инфицирования. Важными диагностическими биомаркерами считаются белки, которые характерны для *M. bovis* и *M. tuberculosis* и связаны с основными патологическими процессами [5, 7]. Современные исследования в области диагностики *M. bovis* и *M. tuberculosis* придают большое значение созданию тестов на основе видоспецифичных биомаркеров, способных обеспечить более доступную и эффективную диагностику, а также позволить проводить дифференциальную диагностику [8]. Учитывая требования Всемирной организации здравоохранения к диагностическим средствам, можно предположить, что маркеры, не связанные с ДНК, имеют больший потенциал для соответствия практическим и финансовым требованиям [9].

В связи с этим, выявление и изучение иммунологических характеристик иммунодоминантных видоспецифичных антигенов *M. bovis* и *M. tuberculosis* являются актуальной задачей и могут послужить основой для разработки новых экспресс-методов и диагностикомов для дифференциации неспецифических аллергических реакций и быстрой постановки точного диагноза.

Целью работы явилось определение степени сходства антигенного профиля микобактерий *M. bovis* и *M. tuberculosis* и выявление потенциальных маркеров их дифференциации.

Материалы и методы исследований

Культуры *M. bovis* (Bovinus-8 штамм 700201) и *M. tuberculosis* (H37Rv TBC1/47, штамм 7004031) выращивали в жидкой питательной среде Сотона в течение 5 месяцев. С целью выделения продуктов экспрессии *M. tuberculosis* и *M. bovis* клетки микобактерий из среды Сотона осаждали 20 минутным центрифугированием при 7500 g, супернатант фильтровали через ацетатцеллюлозные мембраны MFAS-MA-6 (ZАО STC Vladipor, Vladimir, Russian Federation). Фильтрат культуральной среды (ФКС) концентрировали путем насыщения сульфатом аммония. Далее пробы последовательно фильтровали центрифугированием (4000g, 20 мин), используя концентраты

Vivaspin®2 (Sartorius Stedim Biotech) с размером пор 10 кДа, 30 кДа и 50 кДа.

Аналитический электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) антигенных препаратов проводили по Леммли (1970) [6] используя пластинчатый 12,5 % ПААГ. Для выявления белков использовали как Кумаси бриллиантовый синий G-250, так и более чувствительный метод окрашивания с применением азотнокислого серебра по Гребиножко [2].

Электроперенос белков фракционированных в ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) с размером пор

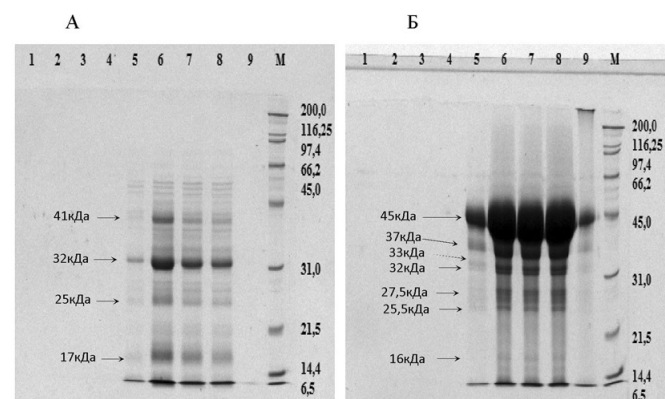


Рисунок 1. Электрофореграммы белков, содержащихся в ФКС *M. bovis* (А) и *M. tuberculosis* (В). Треки: 1 - ФКС исходный, 2 - фильтрат 10 кДа, 3 - фильтрат 30 кДа, 4 - фильтрат 50 кДа, 5 - концентрат ФКС, 6 - смыв с концентратора 10 кДа, 7 - смыв с концентратора 30 кДа, 8 - смыв с концентратора 50 кДа, 9 - этаноловый осадок ФКС, М - маркер молекулярных масс Broad Range ("Bio-Rad").

Fig. 1. Electrophoregrams of proteins contained in the filtrate of culture medium (FCM) *M. bovis* (A) and *M. tuberculosis* (B). Lanes: 1 - FCM initial, 2 - filtrate 10 kDa, 3 - filtrate 30 kDa, 4 - filtrate 50 kDa, 5 - concentrate FCM, 6 - washout from the concentrator 10 kDa, 7 - washout from the concentrator 30 kDa, 8 - washout from the concentrator 50 kDa, 9 - ethanol sediment FCM, M - Molecular Weight Marker Broad Range ("Bio-Rad").

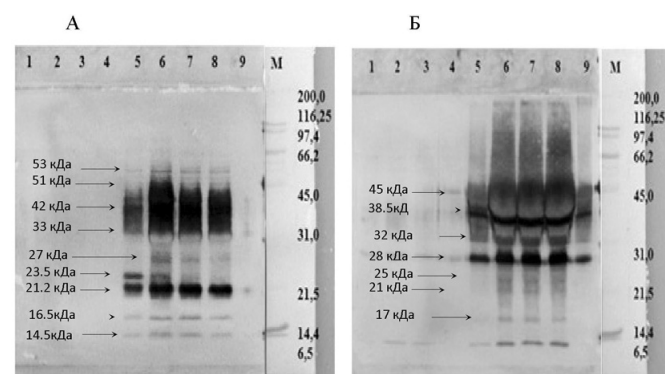


Рисунок 2. Вестерн-блот белков, содержащихся в ФКС *M. bovis* (А) и *M. tuberculosis* (В), полученных с помощью гипериммунной сыворотки к *M. tuberculosis*. Треки: 1 - ФКС исходный, 2 - фильтрат 10 кДа, 3 - фильтрат 30 кДа, 4 - фильтрат 50 кДа, 5 - концентрат ФКС, 6 - смыв с концентратора 10 кДа, 7 - смыв с концентратора 30 кДа, 8 - смыв с концентратора 50 кДа, 9 - этаноловый осадок ФКС, М - маркер молекулярных масс Broad Range ("Bio-Rad").

Fig. 2. Western blot proteins contained in the filtrate of culture medium (FCM) *M. bovis* (A) and *M. tuberculosis* (B), obtained with hyperimmune serum to *M. tuberculosis*. Lanes: 1 - FCM initial, 2 - filtrate 10 kDa, 3 - filtrate 30 kDa, 4 - filtrate 50 kDa, 5 - concentrate FCM, 6 - washout from the concentrator 10 kDa, 7 - washout from the concentrator 30 kDa, 8 - washout from the concentrator 50 kDa, 9 - ethanol sediment FCM, M - Molecular Weight Marker Broad Range ("Bio-Rad").

0,45 мкм проводили в системе полусухого переноса по Тоубин [10]. Результаты электрофореза и иммуноблотинга документировали в системе Gel Doc XR+ Sistem (Bio-Rad) и обрабатывали с использованием программы Image Lab Software 5.1 (Bio-Rad). Для определения молекулярной массы белков использовали коммерческий набор белков с известной молекулярной массой "SDS-PAGE Standards, broad-range" (Bio-Rad).

Результаты исследований и их обсуждение

Спектр секретируемых белков *M. bovis* и *M. tuberculosis* в исходном ФКС и фильтратов полученных при помощи концентраторов Vivaspin с диаметром пор 10 кДа, 30 кДа и 50 кДа определяли, используя метод аналитического электрофореза (рис. 1).

Полученные результаты показали, что смывы с мембран содержат специфические антигены, по которым можно серологически дифференцировать *M. bovis* и *M. tuberculosis*. На электрофореграмме видно что, спектры секретируемых белков *M. bovis* и *M. tuberculosis* значительно различаются: у *M. bovis* спектр белков включает 5 мажорных фракций, мало различающихся между собой в количественном отношении и 3–4 минорные фракции, тогда как у *M. tuberculosis* более 90% приходится на белки с молекулярными массами, располагающимися в интервале 32 кДа – 45 кДа.

Следует отметить, что белковые спектры *M. bovis* в материалах снятых с поверхности фильтров несколько отличаются между собой в количественном отношении. Наиболее плотные белковые фракции присутствуют на 6-ом треке (смыв с концентратора 10 кДа), тогда как в треках с материалами снятыми с концентраторов 30 кДа до 50 кДа наблюдается снижение плотности белковых фракций. Причем снижение плотности фракций, наблюдается сразу во всех фракциях, что позволяет предположить о том, что в ФСК белковые молекулы присутствуют в спонтанно образованных агрегатах.

На белковых спектрах *M. tuberculosis* каких-либо различий увидеть не представляется возможным из-за весьма неравномерного распределения материала по высоте геля. Как уже указывалось ранее, более 90% белков содержащихся в ФСК *M. tuberculosis* занимают не более 1/5 высоты геля. Из-за высокой интенсивности серопозитивной зоны, даже небольшое удаление белков в процессе фильтрования становится невидимым. Аналогичные результаты были получены и при электрофоретическом фракционировании (рис. 1 Б).

Материал аналитического электрофореза белков фильтратов *M. tuberculosis* и *M. bovis* далее был изучен на предмет серологической активности с гомологичными гипериммунными сыворотками крови (рис. 2).

Из результатов иммуноблотинга (рис. 2) наглядно видны весьма значительные различия в белковых спектрах, содержащихся в ФКС этих двух видов микобактерий. Результаты определения молекулярных масс серопозитивного материала следующие: у *M. bovis*: 14 кДа, 16 кДа, 20 – 22 кДа, 24,5 кДа, 28 кДа, 33 – 47 кДа и 56 кДа; у *M. tuberculosis*: 12 кДа, 16 кДа, 22 – 27 кДа, 29 – 31 кДа, 32 – 51 кДа. Эти различия в антигенных профилях микобактерий подчеркивают их потенциальную ценность как биомаркеров для дифференциальной диагностики туберкулеза.

Заключение

Проведенными исследованиями, обнаружены значительные различия в белковых спектрах секретируемых продуктов *M. bovis* и *M. tuberculosis* и в спектрах серопо-

зитивных продуктов этих двух видов микобактерий, что позволяет использовать выделенные уникальные антигены *M. bovis* и *M. tuberculosis* для дифференциальной диагностики. Полученные новые данные могут дополнить наше понимание иммунологических особенностей и спектра антигенов, что, в свою очередь, может способствовать разработке более точных и эффективных диагностических средств.

Литература

1. Доклад ВОЗ о глобальной борьбе с туберкулезом, 2022 г. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022> (дата обращения: 10.09.2023).
2. Гребиножко, Э.И. Простой метод обнаружения белков в полиакриламидном геле с помощью импрегнации их серебром / Э.И. Гребиножко, А.И. Николаенко, Ф.П. Иванов // Укр. биохим. журнал. 1986. - Т. 58, №5. С. 62-65.
3. Мингалеев Д.Н. Ретроспективный анализ изменений эпизоотической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота в республике Татарстан за 1960 - 2018 гг. / Д.Н. Мингалеев, А.Г. Хисамутдинов, М.А. Ефимова, А.И. Трубкин, Ю.Р. Камалиева // Сельское хозяйство и продовольственная безопасность: технологии, инновации, рынки, кадры: Научные труды международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию аграрной науки, образования и просвещения в Среднем Поволжье, Казань, 13-14 ноября 2019 года. - Казань: Казанский государственный аграрный университет, 2019. - С. 498-504.
4. Муковнин, А. А. Туберкулез крупного рогатого скота в России / А. А. Муковнин, А. Х. Найманов, А. М. Гулюкин // Ветеринария. - 2020. - № 7. - С. 19-23.
5. Kanabalan, R.D. Human Tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis Complex: A Review on Genetic Diversity, Pathogenesis and Omics Approaches in Host Biomarkers Discovery. / R.D. Kanabalan, L.J. Lee, T.Y. Lee, P.P. Chong, L. Hassan, R. Ismail, V.K. Chin // Microbiol. Res. - 2021. - 246:126674. DOI:10.1016/j.micres.2020.126674.
6. Laemmli, U.K. Cleavage structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. - 1970. - V. 227. - P. 680-685.
7. Ncube, P. Evidence, Challenges, and Knowledge Gaps Regarding Latent Tuberculosis in Animals. / P. Ncube, B. Bagheri, W.J. Goosen, MA. Miller, SL. Sampson // Microorganisms. - 202. - 10(9):1845. DOI: 10.3390/microorganisms10091845.
8. Smith, K. Cell-Mediated Immunological Biomarkers and Their Diagnostic Application in Livestock and Wildlife Infected With Mycobacterium bovis / K. Smith, L. Kleynhans, RM. Warren, WJ. Goosen and MA. Miller // Front. Immunol. - 2021. - 12:639605. DOI: 10.3389/fimmu.2021.639605
9. Song, S. A combined application of molecular docking technology and indirect ELISA for the serodiagnosis of bovine tuberculosis. / S. Song, Q. Zhang, H. Yang, J. Guo, M. Xu, N. Yang, J. Yi, Z. Wang, C. Chen // J. Vet. Sci. - 2022. - 23(3):e50. DOI: 10.4142/jvs.21270.
10. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1979. - 76 (9). - P.: 4350-4354.

References

1. WHO Report on the Global Control of Tuberculosis, 2022 [Electronic resource] Mode of access: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022> (Accessed on 10.09.2023).
2. Grebinozhko, E.I. A simple method of protein determination in polyacrylamide gel using silver staining / E.I. Grebinozhko, A.N. Nikolaenko, A.P. Ivanov // Ukrainskii biokhimicheskiy zhurnal. - 1986. - Vol. 58(5). - P. 62-65.
3. Mingaleev D.N. Retrospective analysis of changes in the epizootic situation of bovine tuberculosis in the Republic of Tatarstan for 1960 - 2018 / Mingaleev D.N., Khisamutdinov A.G., Efimova M.A., Trubkin A.I., Kamaliev Yu.R. // Agriculture and Food Security: Technologies, Innovations, Markets, Personnel: Scientific Proceedings of the International Scientific and Practical Conference Dedicated to the 100th Anniversary of Agrarian Science, Education and Enlightenment in the Middle Volga Region, Kazan, 13-14 November 2019 Year. Kazan: Kazan State Agrarian University, 2019. P. 498-504.
4. Mukovnin, A. A. Tuberculosis of Cattle in Russia. / A. A. Mukovnin, A. Kh. Naimanov, A. M. Gulyukin // Veterinary - 2020. - № 7. P. 19-23.