

УДК 57.083.3:616-097:579.834.114

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СТРУКТУРНЫЙ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ OSPC НОВОСИБИРСКИХ ИЗОЛЯТОВ СПИРОХЕТ *BORRELIA GARINII* И *BORRELIA AFZELII*

Александр Владимирович РЯБЧЕНКО, Виталий Семенович КАРАВАЕВ,
Анатолий Борисович БЕКЛЕМИШЕВ

НИИ биохимии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

В работе представлен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков OspC спирохет генов *Borrelia garinii*, двух групп NT29 и 20047T, и *Borrelia afzelii*. Гомология белков составила 60–67 %. Столь высокая вариабельность первичных структур этих белков обусловила их существенные антигенные отличия. На примере рекомбинантных белков OspC *B. garinii* 20047T и *B. afzelii* показано различие в их чувствительности как антигенов при определении специфических антител в сыворотках крови от больных иксодовым клещевым боррелиозом с локализованной и диссеминированной стадиями инфекции. Чувствительность выявления специфических иммуноглобулинов, реагирующих с OspC изолята *B. garinii* 20047T, находилась в пределах 60,9–71,4 % для IgM и 70,0–75,0 % для IgG в зависимости от стадии инфекции. Чувствительность выявления специфических иммуноглобулинов, реагирующих с OspC изолята *B. afzelii* составляла 39,3 % и 50,0 % для IgM сывороток от больных с диссеминированной и локализованной стадиями инфекции соответственно и 50,0 % для IgG независимо от стадии болезни.

Ключевые слова: *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, гомология, антиген OspC, иксодовый клещевой боррелиоз, иммуноферментный анализ (ИФА).

Borrelia – это грамотрицательные бактерии семейства *Spirochaetaceae*, переносимые клещами рода *Ixodes* и вызывающие у человека иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ). По отличиям в нуклеотидных последовательностях ДНК боррелий выделяют 13 геновидов, которые объединены в комплекс под названием *Borrelia burgdorferi sensu lato* [1]. Иксодовые клещевые боррелиозы вызываются преимущественно спирохетами трех патогенных геновидов: *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (s.s.), *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* [1]. Все эти геновиды боррелий были обнаружены на европейской территории России [2–4]. На территории Сибири и, в частности, Новосибирской области до настоящего момента было найдено только два патогенных геновида боррелий: *Borrelia garinii* (группы 20047^T и NT29) и *Borrelia afzelii* [2, 5–9]. Недавно в Омской области был обнаружен патогенный геновид *Borrelia spielmani* [10]. В виду разнообразия клинических проявлений ИКБ, для подтверждения диагноза используют дополнительные лабораторные методы, среди которых широкое распространение получили методы, основанные на выявлении антител к возбудителю. В качестве антигенов предпочтение отдается рекомбинантным антигенам боррелий [11]. Большая изменчивость антигенов возбудителя обуславливает сложность серодиаг-

ностики ИКБ. Высокая вариабельность особенно характерна для внешних поверхностных белков боррелий, ярким представителем которых является белок OspC. Этот антиген одним из первых вызывает иммунный ответ у больных ИКБ, благодаря чему используется в различных диагностических тест-системах. Иммуноглобулины М против OspC присутствуют в крови в высоком титре уже через одну-две недели после заражения [12]. Белку OspC свойственна высокая гетерогенность среди различных геновидов боррелий, достигающая 40 % аминокислотного состава. С вариабельностью первичных структур коррелирует и изменчивость антигенных свойств – сыворотки больных ИКБ, инфицированных спирохетами какого-либо геновида, как правило, плохо реагируют с OspC, происходящим из географически отдаленных изолятов этого же геновида или других патогенных геновидов *B. burgdorferi* s.l. [13]. В связи с этим **целью настоящего исследования** являлось получение рекомбинантных антигенов OspC западносибирских изолятов спирохет *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* и сравнение их первичных структур и иммунохимических свойств.

Материал и методы

Амплификация генов ospC. Ампликоны генов *ospC B. garinii* и *B. afzelii* получали с помощью по-

Рябченко А.В. – к.б.н., старш.н.с. лаборатории генной инженерии, e-mail: borrelia@mail.ru
Караваев В.С. – к.м.н., ведущ.н.с. лаборатории генной инженерии, e-mail: karavaev@soramn.ru
Беклемишев А.Б. – д.б.н., зав. лабораторией генной инженерии, e-mail: beklem@soramn.ru

лимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием двух пар праймеров:

прямой праймер (№ 196)

5'-AGGGGTACCATGAAAAAGAATACATTAAGTGC GA-3';

обратный праймер (№ 197)

5'-GAGCTCGAGAGGTTTTTTGGACTTTCTGC-3';

прямой праймер (№ 278)

5'-CGGAATTCTGGGGATACTGCATCTACTAATC-3';

обратный праймер (№ 279)

5'-GTGGTGGTGCTCGAGAGGTTTTTTGGACT-3'.

Праймеры содержали на 5'-концах сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции (сайты подчеркнуты), используемые для клонирования ампликонов. Первую пару праймеров (№ 196 и № 197) использовали для амплификации и секвенирования участка гена *ospC*, кодирующего предшественник OspC, вторую пару (№ 278 и № 279) — для амплификации и последующей экспрессии участка гена *ospC*, кодирующего зрелый OspC, в клетках *E. coli*. Для проведения ПЦР использовали амплификатор МС-2 («ДНК-технология», Москва). Для амплификации применяли термостабильную химерную ДНК-полимеразу «Phusion» фирмы «Finnzymes» (Финляндия). Температурные режимы отжига праймеров соответствовали температурам их плавления.

Рестрикцию и лигирование фрагментов ДНК проводили с помощью соответствующих эндонуклеаз рестрикции и Т4 ДНК лигазы фирмы «Сибэнзим» (Новосибирск).

Клонирование гена *ospC* изолятов *B. garinii* и *B. afzelii* в клетках *E. coli* в составе экспрессирующего вектора. В качестве экспрессирующего вектора была использована модифицированная нами плазмида pET36b(+) (фирма «Novagen», США). В работе использовали клетки *E. coli* штамма Rosetta 2. Трансформацию клеток *E. coli* рекомбинантными ДНК проводили с помощью электропорации согласно методике фирмы — производителя прибора («PeqLab, Biotechnologie GmbH», Германия). Рекомбинантные клоны *E. coli* отбирали на селективной среде LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина.

Выделение плазмидных ДНК осуществляли щелочным методом, анализ плазмидных ДНК и фрагментов ДНК размером от 500 до 6000 пар нуклеотидов проводили методом электрофореза в агарозном геле, с окрашиванием ДНК бромистым этидием [14].

Секвенирование генов *ospC*. Определение нуклеотидных последовательностей клонированных генов осуществлял Центр коллективного пользования СО РАН «Секвенирование ДНК» (Новосибирск). Секвенирование проводили по методу Сенгера, с использованием набора реагентов «Big Dye terminator ready reaction kit v.3.1» («Applied Biosystems», США). Продукты реакций секвенирования были проанализированы на автоматическом генном анализаторе «ABI PRIZM 3100-Avant» («Applied Biosystems»).

Сравнительный анализ первичных структур белков OspC. Для сравнения аминокислотных последовательностей белков использовали программу «BLAST on-line» ресурса Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Получение и очистка рекомбинантных антигенов OspC. Ночную культуру клеток *E. coli*, содержащих плазмиду pETm со встроенным геном *ospC*, выращивали при 37 °С в 5 мл среды LB с канамицином 30 мкг/мл. Затем культуру пересевали в разведении 1:100 в свежую среду LB, содержащую антибиотик, и выращивали при 37 °С до ОП₆₀₀, равной 1,0 ± 0,1 оп.ед., после чего в нее вносили изопропил-β-D-1-тиогалактопиноназид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. Культуру инкубировали в течение 12–16 часов при 30 °С, клетки осаждали центрифугированием (3000 об./мин, 15 мин) и хранили при –20 °С для последующего выделения белков. Часть биомассы анализировали методом электрофореза лизата клеток в полиакриламидном геле по Лэммли.

Выделение и очистку рекомбинантных белков из биомассы клеток *E. coli* осуществляли с помощью аффинной хроматографии лизата клеток на колонке с Ni-NTA-сефарозой CL-6B в нативных условиях согласно протоколу фирмы-производителя аффинного сорбента «Quiagen» («Quiagen», Германия). Целевые белки элюировали ступенчатым градиентом имидазола 25–500 мМ. Аликвоты по 5–10 мкл из каждой хроматографической фракции анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли. Фракции с наибольшим содержанием белка и наименьшим количеством примесей объединяли. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрическим методом по Лоури.

Анализ иммунохимических свойств антигенов OspC. Для изучения иммунохимических свойств рекомбинантных белков OspC западносибирских изолятов *B. afzelii* группы 20047^T и *B. garinii* методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) использовали образцы сывороток крови больных с достоверным диагнозом ИКБ с локализованной и диссеминированной стадиями инфекции. Сыворотки крови были получены от пациентов 1-й городской инфекционной больницы г. Новосибирска и областного центра «СПИД» (г. Новосибирск) в рамках договоров о научном сотрудничестве. В качестве контроля использовали образцы сывороток крови здоровых доноров. Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законами РФ об охране здоровья граждан» (в ред. Указа Президента РФ от 24.12.1993 № 2288, Федеральных законов от 02.03.1998 № 30-ФЗ, от 20.12.1999 № 214-ФЗ, от 25.11.2009 № 267-ФЗ). Сыворотки использо-

вали в разведении 1/80 и 1/160. Для выявления специфического комплекса «антиген – антитело» использовали пероксидазные конъюгаты на основе моноклональных антител к IgG и IgM человека, которые были получены из лаборатории гибридомных технологий ЦНИИ рентгенорадиологии Минздрава России. Для эффективной сорбции на полистироле исследуемые антигены использовали в концентрации 3–5 мкг/мл, суммарное количество антигена составляло не менее 0,5 мкг на лунку планшета. Результаты ИФА регистрировали на ридере «Multiscan» (Финляндия).

Получение экспрессирующего вектора pETm для клонирования в его составе генов *ospC* в клетках *E. coli*. В качестве исходной конструкции при получении экспрессирующего вектора pETm была использована плазмида pET36b(+). Для удобства клонирования генов *ospC* под регуляторную область промотора фага T7 в плазмиду pET36b(+) был встроен фрагмент ДНК (полилинкер), содержащий набор сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции (EcoRI, KpnI, BssHII, BstEII, HindIII и XhoI), и участок, кодирующий восемь аминокислотных остатков гистидина, за которым следовал стоп-кодон трансляции белка. Встраиваемый фрагмент ДНК получали гибридизацией пары комплементарных олигонуклеотидов. В результате гибридизации образовывался двунитевой фрагмент ДНК, содержащий на 5'- и 3'-концах «липкие концы» для эндонуклеаз рестрикции EcoRI и BamHI соответственно.

Плазмиду pET36b(+) гидролизуют эндонуклеазами рестрикции EcoRI и BamHI, отделяли от продуктов гидролиза в агарозном геле, затем извлекали фрагмент плазмидной ДНК с помощью соответствующего набора (фирма «Биосилика», Новосибирск). Полученные фрагменты вектора pET36b(+) лигировали T4 ДНК-лигазой со встраиваемым фрагментом ДНК в молярном соотношении 1:20. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3). Трансформированные клетки *E. coli* рассевали на селективную среду LB, содержащую канамицин, и выращивали в течение 12–16 часов. Из полученных клонов выделяли рекомбинантные плазмиды. Правильность встройки полилинкера проверяли секвенированием. Из клона, удовлетворяющего этим требованиям, выделяли плазмиду pETm и использовали для клонирования в ее составе генов *ospC*.

Результаты и обсуждение

Получение фрагментов кодирующих областей генов *ospC* изолятов *B. garinii* и *B. afzelii*. Ранее нами были получены культуры западносибирских изолятов *B. garinii* и *B. afzelii* [8]. Из части этих культур выделяли суммарные препараты ДНК с помощью гуанидин-хлорида [14]. Поскольку в литературе на примере поверхностного белка боррелий OspA было показано, что этот антиген токсичен для клеток *E. coli* в своем полноразмерном виде

и не токсичен при удалении 17 аминокислотных остатков в N'-концевом регионе белка [15], мы использовали эту же стратегию для клонирования гена *ospC*. По нашим предположениям, такие усеченные варианты белков OspC могли синтезироваться в клетках *E. coli*, не приводя к их гибели. Области генов *ospC*, кодирующие зрелые белки OspC, амплифицировали методом ПЦР. В качестве матриц-мишеней использовали ДНК изолятов *B. garinii* группы 20047^T (музейный изолят № 10; NSK-10-06) и *B. afzelii* (музейный изолят № 5; NSK-05-06). Размер продуктов ПЦР составлял примерно 580 пар нуклеотидов. Ампликоны нарабатывали в количестве 1–2 мкг, очищали и последовательно гидролизуют эндонуклеазами рестрикции XhoI и EcoRI.

Клонирование генов *ospC* изолятов *B. garinii* и *B. afzelii* в клетках *E. coli* в составе вектора pETm. Плазмиду pETm и гены *ospC* изолятов *B. garinii* группы 20047^T и *B. afzelii* гидролизуют эндонуклеазами рестрикции EcoRI и XhoI. Вектор и гены очищали от продуктов гидролиза и лигировали в молярном соотношении 1:5. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli*. Полученные клоны *E. coli* анализировали на наличие в рекомбинантных плазмидах вставки генов *ospC* методом ПЦР с праймерами № 196 и № 197. Новые рекомбинантные плазмиды, несущие гены *ospC* спирохет *B. garinii* и *B. afzelii*, были названы pETm-OspC-Bg и pETm-OspC-Ba соответственно. Клоны, содержащие плазмиды pETm-OspC-Bg и

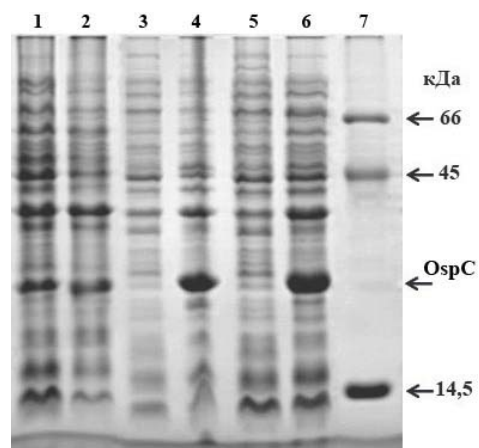


Рис. 1. Электрофореграмма лизатов индуцированных ИПТГ и неиндуцированных клеток клонов *E. coli* шт. Rosetta 2, содержащих рекомбинантные плазмиды pETm со встроенными фрагментами генов *ospC* изолятов *B. garinii* (Bg) 20047^T и *B. afzelii* (Ba). Дорожки: 1, 3 и 5 – лизаты неиндуцированных ИПТГ клеток *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды pETm (1), pETm-OspC-Bg (3) и pETm-OspC-Ba (5); 2, 4 и 6 – лизаты индуцированных ИПТГ клеток *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды pETm (2), pETm-OspC-Bg (4) и pETm-OspC-Ba (6); 7 – маркерные белки массой 66, 45 и 14,5 кДа.

B.afzelii	1	MKKNTLSAILMTLFLFISCSNNSGKGDSASTNPADESAGPNLTEISKKITDSNAFVLAV	60
B.garinii 20047	1-..T.....E.....I.....	57
B.garinii NT29	1	..F.....	50
B.afzelii	61	KEVETLVSSIDELAS-AIGKKIQNNGLGANV-DKNGSLLAGAYAISTLIT---EKLKAL	115
B.garinii 20047	58	...A.L.....K...Q...D....A.ATQ...T.....A.K---Q..DG.	113
B.garinii NT29	51TP.V...-NHH..FC.DA-NY.....V.....L.LIIDG.TG.	108
B.afzelii	116	KNSGELKAKIEDAKKCPEDFTKKLAAGHAQLGIDGA--TDNDSKEAILKTNGTKTGAE	173
B.garinii 20047	114	QPEG.NKE..A...S.A..N..KEK.QD..VANGDT...NA.A....H..ED..VK.	173
B.garinii NT29	109	EGLE..N.E..E..EASAAI.NIR.A..DA.KRDT--..DNAQK.....AN.D...K.	166
B.afzelii	174	LVKLSVASLSKAAQEASANSVKELTSPVVAESPCKP	211
B.garinii 20047	174	.KD.LK..E..A...A..S.....M.....	211
B.garinii NT29	167	.EE.FK..E.....K.SLT.....N..I	197

pETm-OspC-Ba, исследовали на индуцируемую продукцию рекомбинантных белков OspC методом электрофореза лизатов клеток в полиакриламидном геле. Пример такого анализа представлен на **рис. 1**. Молекулярная масса рекомбинантных белков OspC изолятов *B. garinii* группы 20047^T и *B. afzelii* составляла примерно 21–22 кДа, что соответствовало расчетной молекулярной массе. Средняя доля целевых рекомбинантных белков OspC от общего белка клетки составляла 20–28 %.

Сравнение аминокислотных последовательностей рекомбинантных белков OspC западносибирских изолятов спирохет *B. garinii* (группы 20047^T и NT29) и *B. afzelii*. Установленные нуклеотидные последовательности фрагментов генов *ospC* западносибирских изолятов *B. garinii* 20047^T и *B. afzelii* и кодируемые этими генами аминокислотные последовательности были депонированы в Международную электронную базу данных «GenBank» под номерами EU979626.1 и EU979627.1.

Ранее в нашей лаборатории был клонирован ген *ospC* изолята NSK-20-97 *B. garinii* NT29, выделенного из клеща *Ixodes persulcatus*, отловленного на территории Новосибирской области [16]. Мы исследовали гомологию всех трех рекомбинантных белков OspC. Гомология между белками OspC изо-

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей фрагментов белков OspC западносибирских изолятов боррелий: *B. afzelii* (NSK-05-06), *B. garinii* 20047^T (NSK-10-06) и *B. garinii* NT29 (NSK-20-97). Области праймеров подчеркнуты.

лятов *B. garinii* 20047^T и *B. afzelii* составила 67 %, изолятов *B. garinii* 20047^T и *B. garinii* NT29 – 60 %, изолятов *B. afzelii* и *B. garinii* NT29 – 66 %. Результаты сравнения аминокислотных последовательностей всех трех геновидов представлены на **рис. 2**.

На **рис. 2** видно, что наибольшая консервативность белков наблюдается в N-концевых областях (идентичные аминокислотные остатки представлены точками). Начиная примерно с 65 аминокислотных остатков, появляются вариабельные участки, которые сохраняются до С-концевых участков последовательностей. Учитывая, что все три изолята боррелий циркулируют на одной территории Новосибирской области, выявленная гомология этих белков достаточно низка. Однако в целом низкая гомология аминокислотных последовательностей белков OspC боррелий является известным фактом и, по оценкам некоторых авторов, достигает 60 % [17]. Вполне понятно, что такие отличия в первичных структурах этих антигенов могут обуславливать их различную иммунореактивность с сыворотками больных ИКБ.

Анализ иммунохимических свойств антигенов OspC. Для исследования иммунохимических свойств рекомбинантных белков OspC изолятов *B. garinii* группы 20047^T и *B. afzelii* их выделяли

Таблица

Данные иммуноферментного выявления в сыворотках больных ИКБ специфических антител класса IgM и IgG к рекомбинантным белкам OspC западносибирских изолятов *B. garinii* группы 20047^T и *B. afzelii*

Антигены	Вид	Количество сывороток с положительными результатами (% чувствительности)			
		IgM		IgG	
		Стадия I (с МЭ; n = 46) (а)	Стадия II (без МЭ; n = 28) (б)	Стадия I (с МЭ; n = 30) (а)	Стадия II (без МЭ; n = 24) (б)
OspC-Ba	<i>B. afzelii</i>	23 (50,0)	11 (39,3)	15 (50,0)	12 (50,0)
OspC-Bg	<i>B. garinii</i> 20047 ^T	28 (60,9)	20 (71,4)	21 (70,0)	18 (75,0)

Примечание: (а) – группа больных ИКБ с мигрирующей эритемой (МЭ; локализованная инфекция – стадия I), сыворотка взята в период 2–4 недели с начала заболевания; (б) – группа больных ИКБ без мигрирующей эритемы (диссеминированная инфекция – стадия II), сыворотка взята в период 4–8 недель с начала заболевания; n – количество исследуемых образцов сывороток.

из биомассы клеток *E. coli* с помощью аффинной хроматографии на никель-хелатном сорбенте. Чистота белков по данным электрофореза в полиакриламидном геле достигала не менее 95 %. Выход очищенных белков составлял 40–45 мг/л культуры клеток продуцента.

Анализ иммунореактивности и специфичности рекомбинантных белков OspC в опытах с сыворотками больных ИКБ с ранней и диссеминированной стадиями заболевания показал, что при выявлении антител к боррелиям как IgM, так и IgG классов наибольшей диагностической чувствительностью обладал рекомбинантный белок OspC изолята *B. garinii* 20047^T (OspC-Bg). Для рекомбинантного белка OspC изолята *B. afzelii* (OspC-Ba) диагностическая чувствительность была несколько ниже. Результаты этих исследований представлены в таблице.

Такое различие можно объяснить тем фактом, что встречаемость геновида *B. garinii* 20047^T в клещах *I. persulcatus* на территории Новосибирской области примерно в 4 раза больше встречаемости *B. afzelii* [7–9]. Можно ожидать, что это отражается и на инфицировании людей соответствующими геновидами боррелий. Больные, инфицированные геновидом *B. garinii* 20047^T, будут встречаться чаще, и не исключено, что в нашей выборке сывороток преобладали именно такие пациенты. А поскольку антигены OspC двух геновидов боррелий имеют существенные аминокислотные отличия, которые обуславливают специфичность взаимодействия с антителами, OspC *B. garinii* 20047^T будет более специфичен к антителам сывороток больных, инфицированных данным геновидом боррелии, нежели к пациентам, инфицированным геновидом *B. afzelii*, и наоборот. Подобные наблюдения были отмечены и для изолятов боррелий, циркулирующих на территории Европы [13].

Анализ на выявление специфичных антител классов IgM и IgG к рекомбинантным белкам OspC в контрольной группе сывороток здоровых доноров (30 образцов) не выявил ни одного ложноположительного результата.

Проанализировав взаимодействия сывороток с каждым рекомбинантным белком OspC (данные не представлены), мы обнаружили, что белок OspC-Ba выявляет антитела в сыворотках, которые не обнаруживаются антигеном OspC-Bg, и наоборот. Однако антитела в части сывороток выявлялись обоими антигенами. Если предположить одновременное использование в тесте пары антигенов OspC-Ba и OspC-Bg, то можно ожидать повышения чувствительности выявления специфических антител в сыворотках больных. На рис. 3 представлены данные ожидаемого количества сывороток больных ИКБ, содержащих специфичные антитела классов IgM и IgG.

При выявлении антител классов IgM и IgG перекрест между антигенами OspC-Bg и OspC-Ba

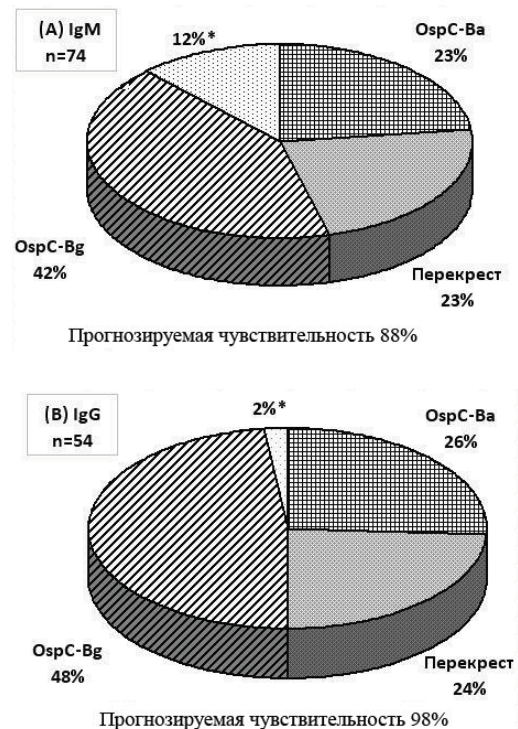


Рис. 3. Ожидаемое количество (% чувствительности) выявляемых сывороток больных ИКБ, содержащих специфичные антитела IgM (А) и IgG (В) к паре антигенов OspC-Ba и OspC-Bg. Перекрест – количество сывороток, прореагировавших с обоими антигенами; * – количество сывороток, не прореагировавших ни с одним антигеном; n – количество исследуемых сывороток, с каждым в отдельности антигеном.

на исследуемой панели сывороток составил 23 и 24 % соответственно. Этот перекрест может быть обусловлен как наличием общих эпитопов у этих антигенов среди ряда изолятов двух геновидов боррелий, так и инфицированием человека одновременно двумя геновидами возбудителя ИКБ. Таким образом, прогнозируемая диагностическая чувствительность для пары антигенов OspC-Bg и OspC-Ba составит 88 % при выявлении антител класса IgM и 98 % при выявлении антител класса IgG независимо от стадии инфекции.

Заключение

Результаты сравнения аминокислотных последовательностей и антигенных свойств рекомбинантных белков OspC убедительно свидетельствуют в пользу необходимости использования для серодиагностики ИКБ гомологичных вариабельных антигенов, полученных из различных патогенных геновидов спирохет *B. burgdorferi* s.l., циркулирующих на конкретных территориях. Иными словами, для серодиагностики ИКБ на территории Новосибирской области целесообразно наряду с другими иммунодоминантными антигенами использовать антигены OspC всех патогенных геновидов боррелий (*B. garinii* 20047^T и NT29 и *B. afzelii*), циркулирующих в этом регионе.

Список литературы

1. Steere A.C. Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme Connecticut // Wien. Klin. Wochenschr. 2006. 118. (21–22). 625–633.
2. Postic D., Korenberg E., Gorelova N. et al. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates // Res. Microbiol. 1997. 148. (8). 691–702.
3. Горелова Н.Б., Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В. и др. Изоляция боррелий от клещей *Ixodes trianguliceps* (Ixodidae) и возможное значение этого вида в эпизоотологии иксодовых клещевых боррелиозов // Паразитология. 1996. 30. (1). 13–18.
4. Gorelova N.B., Korenberg E.I., Kovalevskii Yu.V. et al. The isolation of *Borrelia* from the tick *Ixodes trianguliceps* (Ixodidae) and the possible significance of this species in the epizootiology of ixodid tick-borne borrelioses // Parazitologiya. 1996. 30. (1). 13–18.
4. Масузава Т., Наумов Р.Л., Кудекен М. и др. Обнаружение *Borrelia burgdorferi sensu stricto* в Московской области, Россия // Мед. паразитол. и паразитарные болезни. 2001. (2). 52.
5. Masuzava T., Naumov R.L., Kudeken M. et al. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in the Moscow region, Russia // Med. parazitol. i parazitarnye bolezni. 2001. (2). 52.
5. Sato Y., Miyamoto K., Iwaki A. et al. Prevalence of Lyme disease spirochetes in *Ixodes persulcatus* and wild rodents in Far Eastern Russia // Appl. Environ. Microbiol. 1996. 62. 3887–3889.
6. Morozova O.V., Dobrotvorskyy A.K., Livanova N.N. et al. PCR detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, tick-borne encephalitis virus, and the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes persulcatus* ticks from Western Siberia, Russia // J. Clin. Microbiol. 2002. 40. (10). 3802–3804.
7. Beklemishev A.B., Dobrotvorskyy A.K., Piterina A.V. et al. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in *Ixodes persulcatus* ticks in West Siberia, Russia // FEMS Microbiol. Lett. 2003. 227. (2). 157–161.
8. Рябченко А.В., Ивлева И.Н., Беклемишев А.Б. Комплексная оценка зараженности клещей *Ixodes persulcatus*, распространенных в рекреационной зоне Новосибирского научного центра, спирохетами *Borrelia burgdorferi s.l.* // Журнал инфекционной патологии. 2004. 11. (3–4). 107–110.
9. Ryabchenko A.V., Ivleva I.N., Beklemishev A.B. Complex estimation infection rate of *Ixodes persulcatus* ticks in a recreational zone of a Novosibirsk centre of science *Borrelia burgdorferi s.l.* spirochete // Zhurnal infektsionnoy patologii. 2004. 11. (3–4). 107–110.
9. Рябченко А.В., Мамаев А.Л. Инфицированность клещей *Ixodes persulcatus*, отловленных весной 2006 г. в лесопарковой зоне новосибирского Академгородка, спирохетами *Borrelia burgdorferi s.l.* // Бюл. СО РАМН. 2007. (5). 58–61.
10. Ryabchenko A.V., Mamaev A.L. Infection rate of *Ixodes persulcatus* ticks, caught in the recreation zone of Novosibirsk Academtown in the spring 2006, by *Borrelia burgdorferi s.l.* spirochete // Bul. SO RAMN. 2007. (4). 58–61.
10. Рудакова С.А., Коломеец А.Н., Самойленко И.Е. и др. Экспресс-индикация трансмиссивных патогенов как основа дифференцированного подхода к профилактике инфекций, передающихся иксодовыми клещами // Бюл. СО РАМН. 2007. (4). 116–119.
11. Rudakova S.A., Kolomeetz A.N., Samojlenko I.E. et al. Express-detection of transmissible pathogens as the basis of differential approaches in prophylactics tick-borne infections // Bul. SO RAMN. 2007. (4). 58–61.
11. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis // FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 2007. 49. (1). 13–21.
12. Rauer S., Spohn N., Rasiah C. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant ospC and internal 14-kDa flagellin fragment for serodiagnosis of early Lyme disease // J. Clin. Microbiol. 1998. 36. (4). 857–861.
13. Bunkis J., Olsen B., Westman G. et al. Variable serum immunoglobulin responses against different *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in population at risk for patients with Lyme disease // J. Clin. Microbiol. 1995. 33. (6). 1473–1478.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984. 480 с.
15. Maniatis T., Frich Je., Sjembruk Dzh. Methods of genetic engineering. Molecular cloning. M., 1984. 480 p.
15. Dunn J.J., Lade B.N., Barbour A.G. Outer surface protein A (OspA) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi* high level expression and purification of a soluble recombinant form of OspA // Protein Expression and Purification. 1990. 1. (2). 159–168.
16. Пат. 2260047 РФ. Рекомбинантная плазмидная ДНК, обеспечивающая синтез иммунодоминантного белка *Borrelia garinii* NT29, используемого для диагностики Лайм-боррелиоза (варианты) / Беклемишев А.Б., Иванов И.Д.; опубл. 10.09.2005.
- Patent 2260047 RF. Recombinant plasmid DNA providing synthesis immunodominant protein of *Borrelia garinii* NT29, used for Lyme disease diagnostic (variants) / Beklemishev A.B., Ivanov I.D.; published 10.09.2005.
16. Wang I.N., Dykhuezen D.E., Qiu W. et al. Genetic diversity of ospC in local population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* // Genetics. 1999. 151. (1). 15–30.

COMPARATIVE STRUCTURAL AND IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF RECOMBINANT OSPC ANTIGENS OF NOVOSIBIRSK *BORRELIA GARINII* AND *BORRELIA AFZELII* ISOLATES

Aleksandr Vladimirovich RYABCHENKO, Vitaly Semenovich KARAVAEV,
Anatoly Borisovich BEKLEMISHEV

Scientific Research Institute of Biochemistry SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov st., 2

In the paper a comparative analysis of amino acid sequences of *B. garinii* NT29 and 20047^T, and *B. afzelii* OspC proteins is presented. Homology of the proteins was 60–67 %. Such a high variability of the primary structures of these proteins led to significant antigenic differences. Recombinant OspC proteins of *B. garinii* 20047^T and *B. afzelii* showed the difference in their sensitivity as antigens in the determination of specific antibodies in the serum of patients with Lyme disease in localized and disseminated stages of infection. The sensitivity of detection of specific immunoglobulins, binding with OspC of *B. garinii* 20047^T isolate, was within 60,9–71,4 % for IgM and 70,0–75,0 % for IgG depending on the stage of infection. The sensitivity of detection of specific immunoglobulins, binding with OspC of *B. afzelii* isolates was 39,3 % and 50,0 % for IgM of sera from patients with disseminated and localized stages of infection, respectively, and 50,0 % for IgG, regardless of the stage of disease.

Key words: *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, homology, OspC antigen, Lyme disease, ELISA.

Ryabchenko A.V. – candidate of biological sciences, researcher of the genetic engineering laboratory,
e-mail: borrelia@mail.ru

Karavaev V.S. – candidate of medical sciences, leading researcher of the genetic engineering laboratory,
e-mail: karavaev@soramn.ru

Beklemishev A.B. – doctor of biological sciences, head of the genetic engineering laboratory,
e-mail: beklem@soramn.ru