

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА P60 *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Тургимбаева А.М. , Абельденов С.К. , Мухлис Ш.Е. , Каукабаева Г.К. , Унышева Г.Б. , Ахметкаримова Ж.С. , Ескендинова С.З. *

Национальный центр биотехнологии, Кургальжинское шоссе, здание 13/5, Астана, Казахстан

*Автор корреспонденции: eskendirova@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Listeria monocytogenes является значимым пищевым патогеном, характеризующийся внутриклеточным жизненным циклом, выраженными адаптационными механизмами и широким спектром факторов вирулентности. Целью исследования явилось получение рекомбинантного антигена р60 *L. monocytogenes* из изолятов, циркулирующих на территории Республики Казахстан. С использованием технологии рекомбинантной ДНК получен штамм-продуцент *Escherichia coli* ArcticExpress(DE3)/Lmp60, обеспечивающий экспрессию белка с молекулярной массой 50,3 кДа. Специфичность рекомбинантного антигена р60 подтверждена методами ИФА и иммуноблотинга. Полученные результаты подтверждают диагностическую значимость белка р60 *L. monocytogenes* как целевого антигена для разработки высокоспецифичной иммуноферментной тест-системы, направленной на ускоренную идентификацию *L. monocytogenes* в пищевых продуктах.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, рекомбинантный антиген, р60, иммуноферментный анализ, диагностика, экспрессионная система.

ВВЕДЕНИЕ

Листериоз – инфекционное заболевание человека и животных сапрозоонозного характера, возбудителем которого является *Listeria monocytogenes*. Основным источником и резервуаром возбудителя инфекции признаны объекты внешней среды и природные субстраты. Заражение человека листериозом происходит алиментарно - при употреблении продуктов питания, не прошедших термическую обработку. Листериоз относится к числу наиболее опасных пищевых токсикоинфекций с высокой степенью летальности до 20-40%. Увеличение заболеваемости листериозом связано с длительным хранением пищевых продуктов при низкой температуре, что способствует размножению в них листерий при первично слабой контаминации ими [1-3]. Распространению *L. monocytogenes* через пищевые продукты способствует устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды: высокая концентрация соли, широкий температурный диапазон (1°C-45°C), низкий уровень рН и кислорода желудочно-кишечного тракта человека. Благодаря образованию биопленок и осмоадаптации, *L. monocytogenes* также устойчивы к высушиванию и дезинфицирующим агентам. В связи со всем вышеперечисленным, *L. monocytogenes* могут легко размножаться на любых поверхностях, повышая вероятность вспышек листериоза за счет загрязненных пищевых продуктов [4].

Листерия – уникальный патоген, поскольку имеет внутриклеточный жизненный цикл и характеризуется высокими адаптационными свойствами [5]. В патогенезе инфекции важное значение имеют факторы патогенности *L. monocytogenes*, обеспечивающие их незавершенный фагоцитоз, внутриклеточный паразитизм, высокую скорость инфицирования клеток, формирование антибиотикорезистентности [6,7]. Исследованиями биологии и генетики вирулентности возбудителя листериоза определен набор биологически активных молекул и поверхностных белков клеточной стенки патогенных листерий - листериолизин О, фосфолипаза С, лецитиназа, металлопроте-

иназа, интерналин, белки *ActA* и *PrfA*. Эти факторы патогенности листерии позволяют им активно проникать и размножаться не только в фагоцитах, но и эндотелиальных и эпителиальных клетках человека и животных [4,5,9,10]. В связи с особой патогенностью для человека методы диагностики направлены на ускоренную идентификацию *L. monocytogenes* в пищевом сырье и продуктах питания. Быстрое обнаружение и идентификация *L. monocytogenes* в образцах продуктов питания или объектах внешней среды обеспечит надлежащую стратегию контроля и потенциально сократит вспышки листериоза.

Традиционные бактериологические методы диагностики листериоза и обнаружения *L. monocytogenes* в пищевых продуктах включают предварительное обогащение, селективное обогащение и этапы изоляции, которые требуют много времени и труда. Большинство методов обнаружения требуют предварительного обогащения для увеличения концентрации патогена до обнаруживаемых уровней 10⁴-10⁵ КОЕ/мл [8, 11,12]. В качестве альтернативы этим проблемам были разработаны многие методы, основанные на детекции бактериальных нуклеиновых кислот, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и гибридизация ДНК. Хотя эти молекулярные методы обладают высокой чувствительностью, они дорогостоящие и требуют специальной технической подготовки и оборудования [4,8,11]. Методы ПЦР подвержены влиянию ингибиторов и не могут различать жизнеспособные и мертвые клетки. Жизнеспособные клетки могут распознаваться с помощью ПЦР, если только в качестве мишени используется РНК или клетки были обработаны пропидием моноазидом перед анализом, что является дополнительными трудоемкими этапами диагностики.

Длительность и трудоемкость бактериологического исследования на селективных средах с последующей идентификацией биотипов и серотипов, дороговизна ПЦР анализов обуславливают значимость иммунологических методов выявления *L. monocytogenes*. Иммунологические методы (иммуноферментный анализ (ИФА), иммуно-

сенсоры, иммунохроматографический анализ) являются альтернативой из-за их низкой стоимости, высокой чувствительности и специфичности, а также простоты интерпретации данных. Современные методы иммуноанализа позволяют обнаруживать от 10^3 до 10^5 КОЕ/мл цельных бактериальных клеток, при этом предел чувствительности рекомбинантных антигенов достигает уровня наногрмм белка на миллилитр [4,8,11,12]. Иммунологические методы разрабатываются с использованием поликлональных и моноклональных антител, произведённых против различных целевых антигенов *L.monocytogenes*. Однако некоторые методы демонстрируют низкую специфичность из-за высокого генетического разнообразия среди штаммов *L.monocytogenes*. Более того, экспрессия антигенов листерии может значительно зависеть от обогащающих сред или условий роста, используемых для культивирования бактерий, а также от стресса, вызванного кислотой, солью и температурой перед иммунологическим определением. Жизненно важные целевые белки должны быть связаны с поверхностью клеток и экспрессироваться всеми серотипами *L.monocytogenes* [4,8,12].

Одним из таких целевых белков является фактор вирулентности *L.monocytogenes* - внеклеточный белок р60, вовлеченный в инвазию клеток млекопитающих. Высококонсервативный антиген р60, экспрессируемый всеми видами бактерий рода *Listeria* (сходство составляет 80-90%), представляет собой наружный белок клеточной стенки, участвующий в процессе инвазии клеток млекопитающих. Инвазионно-ассоциированный белок р60, кодируемый геном *iap*, рассматривается как фермент муреингидролаза, способный расщеплять пептидогликан клеточной стенки *Listeria*, что способствует проникновению бактерии в эукариотическую клетку-хозяина. Этот белок играет ключевую роль как фактор вирулентности *L.monocytogenes* [2,4,6,7, 9, 10]. Участвуя в клеточном делении, белок р60 секретируется в больших количествах в межклеточную среду, что обуславливает его высокую диагностическую ценность как идеального индикаторного белка для обнаружения *L.monocytogenes* в зараженных пищевых продуктах. [13-16].

Целью данной работы является получение рекомбинантного антигена р60 *L.monocytogenes* с помощью технологии рекомбинантной ДНК из изолятов, циркулирующих в Республике Казахстан, для разработки отечественной иммуноферментной тест-системы на основе поликлональных и моноклональных антител, обеспечивающей безопасность пищевых продуктов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Среды

В ходе эксперимента использовали два вида среды LB для культивирования клеток *E. coli*: стандартная солевая (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl) и сниженная солевая (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl). Для инкубации трансформированных клеток использовали среду SOC (2% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM $MgSO_4$, 20 mM глюкозы, pH7,5) с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл.

Реактивы

В ходе исследования применялись реактивы от ведущих производителей: Sigma-Aldrich, AppliChem, все с категорией чистоты «Для молекулярной биологии». Ферменты рестрикции и T4 ДНК-лигаза были производства компанией Thermo Scientific.

Приготовление хемокомпетентных клеток

Для приготовления хемокомпетентных клеток DH5 α использован следующий протокол: культуру высевали на твердую питательную среду и культивировали в суховоздушном термостате при температуре +37°C в течение 16 часов до образования отдельных колоний. Затем отдельную колонию культивировали в среде LB при температуре +18°C в объеме 200 мл в течение 20 часов до достижения оптической плотности $OD_{600}=0,6$. Собранные центрифугированием клетки отмывали буфером CC (10 mM HEPES, 15 mM $CaCl_2$, 55 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 250 mM KCl, pH 6,7). К ресуспендированной культуре в объеме 7,44 мл добавляли 0,56 мл диметилсульфоксида. Клетки аликвотировали по 50 мкл в пробирках объемом 1,5 мл и замораживали на жидком азоте. Пробирки с хемокомпетентными клетками хранили при температуре -80°C. Эффективность трансформации составляла не ниже 1×10^5 КОЕ/мкг.

Трансформация методом теплового шока

Процедура трансформации включала добавление 100 нг плазмидной ДНК в 50 мкл клеточной суспензии хемокомпетентных клеток, с последующей инкубацией на льду в течение 30 минут. После этого клетки подвергали температурному шоку при +42°C в водяной бане в течение 60 секунд, с последующим охлаждением на льду в течение 2 минут. Далее к смеси добавляли 950 мкл среды SOC и инкубировали в термостатируемом шейкере при +37°C с встряхиванием 180 об/мин в течение 1 часа без антибиотика. После этого культуру высевали на твердую питательную среду с соответствующим антибиотиком в рабочей концентрации для селекции и выдерживали в суховоздушном термостате при температуре +37°C в течение 16 часов до появления выраженных колоний.

ПЦР-скрининг

Для выполнения ПЦР-скрининга отбирали колонию, погружали его в смесь для ПЦР, а затем в 5 мл LB-среды с соответствующим антибиотиком. Компоненты ПЦР-смеси включали 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, дНТФ микс (0,2 mM каждого), 1x Taq буфер, 2 mM $MgCl_2$, 5 ед. Taq ДНК-полимеразы, а также образец изъятый колонии. Температурный режим ПЦР-скрининга включал следующие этапы: нагрев до +95°C – 5 минут; 30 циклов: +95°C – 1 минут, +55°C – 1 минут, +72°C – 1 минут; завершающий этап при +72°C – 10 минут; окончание при +4°C – 30 минут.

Выделение плазмидной ДНК

Экстракцию плазмидной ДНК выполняли с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit от Thermo Fisher Scientific в соответствии с указаниями производителя. Процесс включал следующие изменения: так как применяемые в работе векторы из серии pET представляют собой высококопийные плазмиды, использовали 5 мл насыщенной культуры, выращенной в течение 15-18 часов. Культуру с плазмидной ДНК доводили до плотности $OD_{600}=1,2-1,5$. Время инкубации колонок с элюиру-

ющим буфером было увеличено с 1 минуты до 5 минут, а элюцию ДНК осуществляли в два этапа для сбора оставшейся фракции плазмиды.

Очистка ДНК после проведения ПЦР

Для очистки амплифицированного продукта ПЦР, воду добавляли к смеси ПЦР до объема 100 мкл. Затем в эту смесь добавляли 100 мкл хлороформа. Получившуюся однородную суспензию тщательно перемешивали и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре. После этого отбирали водную фазу смеси, смешивали ее с 1/10 объема 3 М CH_3COONa (pH=5.2) и добавляли 3 объема 96% этанола. Полученную смесь инкубировали при температуре -20°C в течение 20 минут. Очистение осуществляли центрифугированием при 13200 об/мин в течение 30 минут при +4°C. После удаления надосадочной жидкости осадок промывали 96% этанолом в объеме 200 мкл и повторно осаждали центрифугированием при 13200 об/мин в течение 5 минут при +4°C. Очищенная таким образом ДНК ресуспендировалась в необходимом объеме деионизированной воды.

Электрофорез в агарозном геле

Для приготовления агарозного геля взвешивали 1 г агарозы, добавляли буферный раствор TAE до объема 100 мл. Раствор агарозы доводили до кипения, затем остужали до температуры +50°C-+60°C. В раствор добавляли 1 мкл бромистого этидия концентрацией 10 мг/мл (окончательная концентрация 0,1 мг/мл), тщательно перемешивали и заливали в форму для геля.

Секвенирование

Определение нуклеотидной последовательности было выполнено методом Сэнгера с применением набора «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit» и следующего протокола:

Генетическая конструкция: 5 мкл (100 нг/мкл); праймер прямой (концентрация 3,2 мкМ): 2 мкл; праймер обратный (концентрация 3,2 мкМ): 2 мкл; Terminator Ready Reaction Mix: 1,5 мкл; реакционный буфер 5x: 3,5 мкл; безнуклеазная вода: 6 мкл.

Режимы амплификации: +96°C: 1 мин; +96°C: 10 сек; +55°C: 5 сек; +60°C: 4 мин; 25 циклов, +10°C. Очистку реакционной смеси проводили ацетатно-спиртовой смесью. Разделение фрагментов гена осуществляли с использованием автоматического секвенатора ABI 3730xl (Applied Biosystems, США). Анализ хроматограмм и сравнение их с референсной последовательностью проводились с использованием программного обеспечения Vector NTI 11.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание генно-инженерной конструкции pLmp60, содержащей ген *p60* *L.monocytogenes*

В ходе BLAST-анализа была определена нуклеотидная последовательность гена *iap*, кодирующего антиген p60 *Listeria monocytogenes*:

Нуклеотидная последовательность гена p60 из *Listeria monocytogenes*

atgaaaaagcaactatcgcggtacagctgggattgcggtaacagcatttgctgcgcaacaatcgatccgcaagcactgtagtagtcgaagctggtagactcttgggtatcgcsaagaagtaaggactactgttgacgcaattaaaaagcaacaattaac

aacagataaaatcgaccaggtcaaaaattacaagtaataatgaggtgctgctgtaaaaaacagagaaatctgttagcgcaactgggtaaacgtccgtagtgccgctgggtgtgataacagtattattacgtccatcaaaaggtggaacaaaagtaactgttgaacaaccgaatctaacggctggcacaataattactacaacagtggaataactggttcgttaacggtaataactaactgacaaaagcagtaagcactccagttgcaccaacacaagaagtgaataaagaactactactcaacaagctgcacgtgctgcagaacaaaactgaagtaaaaacaatacacaagcaactacacgtcgccctaaagtagcagaacgaagaagaactccagtagtagatcaaaatgctactacacacgtgttaaaagcgggtgacactatttgggctttatccgtaaaatcggtgtttctgttcaagacattatgcatggaataattatcttcttcttatttatgtaggtaaaaagctgtgtattaaacaaactgtaacacagctactccaaaagcagaagtgaacacggaagctccagcagctgaaaacaaagcagctccagtagttaagaaaactaacaacaatactgctactacagagaaaaaagaacagcaacgcaacaacaaacagcacctaaagcacaacagaagctgcaaaaccagctctgcacatctacaacacaaatgctaataaaacaaatacaatacaatacaatacaatacaataactaataacacactatcaaaataactaatacaaaactaataactaataacgaatacaactcaaatgctaataaaggttctccaacataacagcaattcaagtgcagtgctattattgctgaagctcaaaaacaccttggaagcttattcatgggggtgtaacggaccaactacattgattgctctggttacataaatgtattgctaaagcgggaatctccctccacgtactctggcgcaatacgtgactacagaatactctgaatctcaagcaaacctggtgatttagtattcttgactatgtagcggaattctcagctggtatctacgttggaatggtcaaatgattaacgcgaagacaatggcggttaatacgaatacatccacggctctggctgggtaaatatctagttggcttcgctgcgtataa

Ген p60, лишённый N-концевого сигнального домена, амплифицировали из геномной ДНК двух изолятов *L.monocytogenes*, выделенных на территории Республики Казахстан, с использованием праймеров Fw-Nde-Lmp60 (5' CGCATATGAGCACTGTAGTAGTC 3'), Rv-BamHI-Lmp60 (5' ATGGATCCTTATACGCGACCGAAG 3') (рисунк 1).

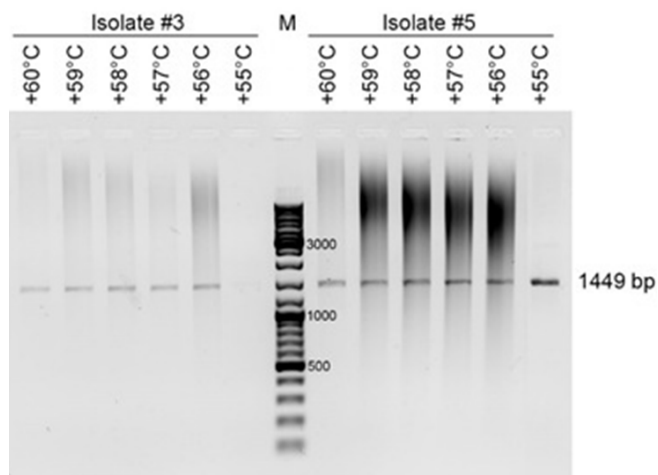


Рисунок 1. ПЦР-амплификация гена *p60* *Listeria monocytogenes* из геномной ДНК (градиент температур отжига праймеров)

Полученный ПЦР-продукт, амплифицированный из изолята 5, был клонирован в промежуточную плазмиду pJET1.2. Методом температурного шока полученной лигазной смесью были трансформированы хемокомпетентные клетки *E.coli* DH5.

Для выявления плазмиды с встроенным геном *p60* был проведен ПЦР-скрининг трансформированных колоний. У клонов, содержащих плазмиду pJET1.2, амплифицировались ПЦР продукты длиной 118 п.о. (фрагмент плазмиды, окаймляемый праймерами Fw-, Rv-pJET1.2). У клонов, содержащих плазмиду pJET1.2/Lmp60, ампли-

фицировались ПЦР продукты длиной 1567 п.о.: фрагмент плазмиды, окаймляемый праймерами Fw-, Rv-pJET1.2 (118 п.о.) и длина гена *p60* (1449 п.о.).

Нуклеотидная последовательность гена-вставки в полученной плазмиде была проверена на отсутствие каких-либо мутаций с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Полученную нуклеотидную последовательность сравнивали с последовательностью из базы данных NCBI GenBank (ID: CP023861.1, диапазон: 618931-620379).

Из полученной промежуточной плазмиды pJET1.2/Lmp60 был амплифицирован ген *p60* с сайтами рестрикции NdeI и BamHI с использованием олигонуклеотидов Fw-Lmp60NdeI (5'-ATGAAAAAAGCAACTATCGCGG-3') и Rv-Lmp60BamHI (5'-TTATACGCGACCGAAGCCAAC-3') (рисунок 2).

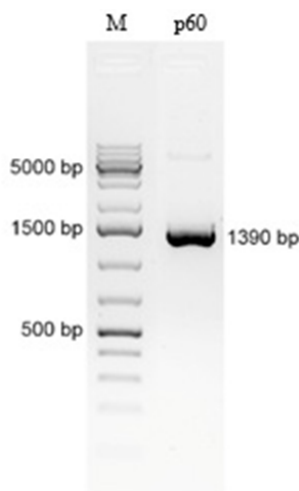


Рисунок 2. ПЦР-продукт фрагмента гена *p60* *L. monocytogenes*

Длина ПЦР-продукта составила 1390 п.о.: из них 1374 п.о. длина гена, 16 п.о. довески с сайтами рестрикции NdeI, BamHI (рис.2). Ген *Lmp60* протяженностью 1374 пар нуклеотидов был клонирован в составе вектора pET-28c(+) по сайтам NdeI и BamHI. Лигазной смесью (ген-вставка *p60* cut и вектор pET28c(+), гидролизированные рестриктазами NdeI и BamHI) трансформировали хемокомпетентные клетки *E.coli* DH5.

У клонов, содержащих плазмиду pET28c(+), амплифицировались ПЦР продукты длиной 317 п.о. (фрагмент плазмиды, окаймляемый праймерами Fw-, Rv-T7). У клонов, содержащих плазмиду pET28c(+)/Lmp60, амплифицировались ПЦР продукты длиной 1766 п.о.: фрагмент плазмиды, окаймляемый праймерами Fw-, Rv-T7 (317 п.о.) и длина гена *p60* (1449 п.о.). Нуклеотидная последовательность гена-вставки в полученной плазмиде была проверена на отсутствие каких-либо мутаций с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Таким образом, была получена экспрессирующая генетическая конструкция pET28c(+)/Lmp60. Ген *Lmp60* из *L. monocytogenes* находится под контролем высокопродуктивного T7-промотора (рисунок 3).

Полученная генно-инженерная конструкция pLmp60 является бактериальным экспрессионным плазмидным вектором с геном *p60* *L. monocytogenes*, встроенного под контроль промотора РНК полимеразы бактериофага T7.

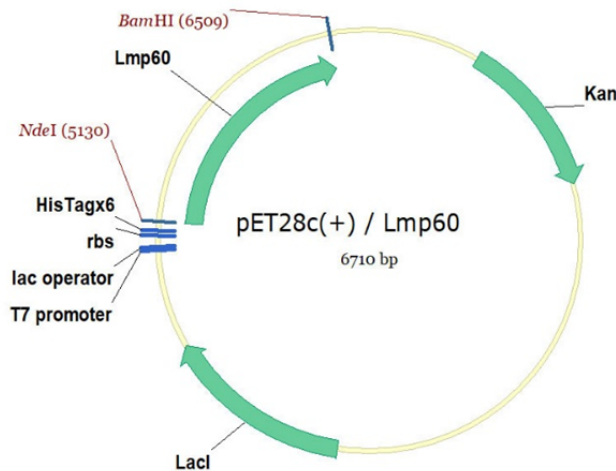


Рисунок 3. Генетическая конструкция pET28c(+)/Lmp60

В качестве селективного маркера вектор pLmp60 содержит ген *kan*, обеспечивающий устойчивость клеток *E. coli* к антибиотику канамицину. Ген *p60* был клонирован таким образом, чтобы целевой белок не имел сигнального пептида на N-конце для предотвращения секреции белка рекомбинантным штаммом во внешнюю среду.

Генетическая конструкция позволяет получить белок Lmp60 длиной в 478 аминокислотных остатка:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSTVVVEAGDTLW
GIAQSKGTTVDAIKKANLLTDDKIVPGQKLQVNNEVA
AAEKTEKSVSATWLNVRSGAGVDNSIITSIKGGTKVT
VETTESNGWHKITYNDGKTGFVNGKYLTDAVSTPV
APTQEVKKETTTQQAAPAAETKTEVKQTTQATTAPK
VAETKETPVVDQNAATHAVKSGDTIWALSVKYGVSVQ
DIMSWNNLSSSSIVVGQKLAIKQTANTATPKAEVKTEA
PAAEKQAAPVVKENTNTNTATTEKKETATQQQTAPKA
PTEAAKPAPAPSTNTNANKTNTNTNTNTNTNTNTNT
PSKNTNTNSNTNTNTNSNTNANQGSSNNNSNSSASAI
AEAQKHLGKAYSWGGNGPTTFDCSGYTKYVFAKAGIS
LPRTSGAQYASTTRISESAKPGDLVFFDYGSGISHVGI
YVGNGQMINAQDNGVKYDNIHSGSWGKYLVGFGGRV.

Расчетная молекулярная масса белка Lmp60 составляет 50,3 кДа.

Создание штамма-продуцента *E. coli* ArcticExpress(DE3)/Lmp60 и выделение рекомбинантного антигена *p60* *L. monocytogenes*

В качестве хозяйской бактерии использовался штамм *E. coli* ArcticExpress(DE3), являющийся производным от *E. coli* BL-21. Клетки штамма *E. coli* ArcticExpress(DE3) не содержат протеазы Lon и OmpT, что предотвращает расщепление рекомбинантного белка. Кроме того, в клетках штамма ArcticExpress конститутивно экспрессируются шаперонины Crp10 и Crp60 *Oleispira antarctica*, которые способствуют правильному сворачиванию рекомбинантного белка. В хромосому штамма интегрирована кассета, в которой T7 РНК-полимераза экспрессируется из промотора *lacUV5*. Индукция экспрессии T7 РНК-полимеразы с помощью ИПТГ приводит к экспрессии рекомбинантного белка, управляемого T7-промотором.

Полученной плазмидой pET28c(+)/Lmp60 методом электропорации трансформировали экспрессирующий

штамм *E.coli* Arctic Express (DE3). Отбор трансформантов проводили на твердой агаризованной среде с канамицином в качестве селективного маркера.

Для выделения рекомбинантного антигена p60 *L.monocytogenes* единичную колонию штамма Arctic Express (DE3)/ pET28c(+)/Lmp60 инокулировали в LB-среде с канамицином (50 мкг/мл). При $OD_{600}=0.6$ индуцировали культуру с помощью 0,5 мМ ИПТГ. Культуру инкубировали в течение 16 часов, при +22°C и встряхивании 100 об/мин. Ночную культуру собирали центрифугированием при +4°C, 6000×g в течение 7 минут. Осадок ресуспендировали в буфере (150 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl pH 8.0) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics). Клетки лизировали с помощью лизоцима (3 мг/мл) при +22°C в течение 20 минут, затем соницировали на частоте 50 кГц. Центрифугировали лизат при +4°C, 18 000×g в течение 60 минут. В осветленном лизате концентрацию NaCl довели до 500 мМ. Белок очищали с помощью колонки HisTrap HP (Cytiva) методом аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами Ni^{2+} . Белок фракционировали в линейном градиенте имидазола от 50 мМ до 500 мМ. Гомогенность полученных фракций проверяли разделением в 12% ПААГ-ДСН (рисунок 4).

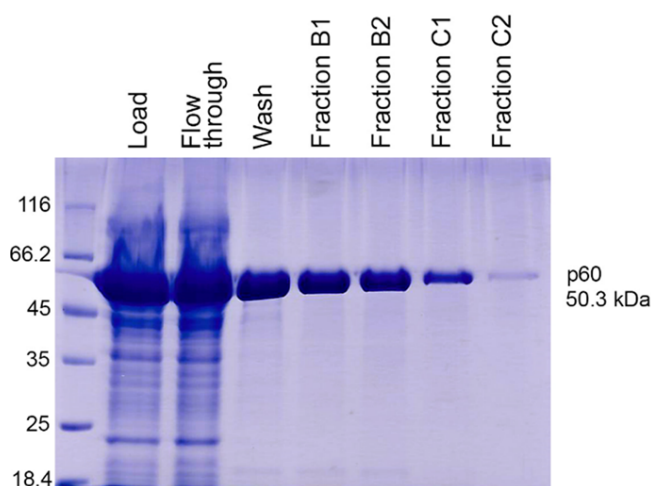


Рисунок 4. Очистка рекомбинантного белка p60 *L. monocytogenes*.

В результате был получен очищенный рекомбинантный белок p60 *L. monocytogenes* с 98% электрофоретической чистотой.

Кандидатный белок верифицирован жидкостной хроматографией в сочетании с масс-спектрометрией. Получен высокий показатель идентификации пептидов выделенного белка – 16951, указывающий на их принадлежность белку – p60 *L. monocytogenes* в базе данных Swiss -Prot (алгоритм Mascot).

Штамм депонирован в депозитарии ТОО «Республиканская коллекция микроорганизмов», регистрационный номер депонированного объекта В-РКМ 1182. Исследования по определению безопасности штамма показали, что штамм *E.coli* ArcticExpress(DE3)/Lmp60 относится к

III классу опасности.

Определение специфичности рекомбинантного антигена p60

Определение специфичности рекомбинантного антигена p60 проводили иммуноферментным анализом с использованием специфической поликлональной листериозной сыворотки. Поликлональную сыворотку получали путем иммунизации кроликов вакцинным штаммом *L. monocytogenes* АУФ. Для иммунизации кроликов вакцину разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации 5 млрд микробных клеток/см³. Вакцину вводили внутримышечно двукратно с интервалом 10 дней в объеме 0,5 мл.

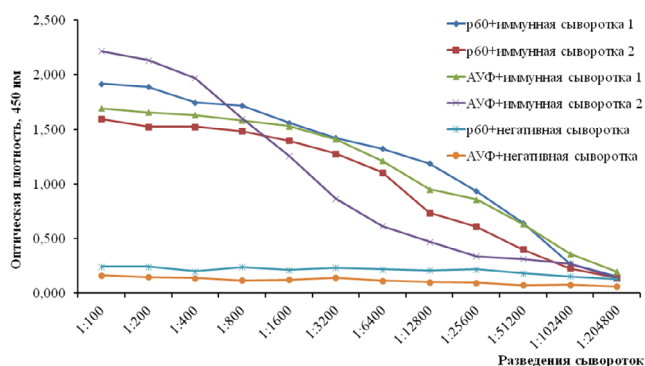
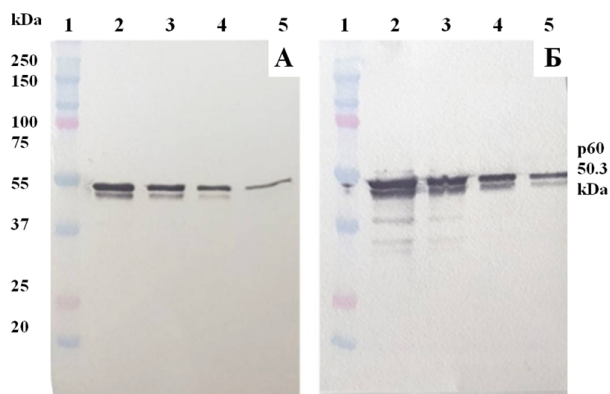


Рисунок 5. Титры специфических антител в сыворотках крови кроликов, иммунизированных вакцинным штаммом *L. monocytogenes* АУФ.

Иммунизация кроликов вакцинным штаммом *L. monocytogenes* АУФ обеспечила высокий уровень выработки специфических антител против испытуемого антигена. Так, максимальная активность титров антител в сыворотках крови иммунизированных кроликов составила в среднем - 1: 51 200, тогда как все сыворотки крови контрольных (здоровых) кроликов показали отрицательный результат (рисунок 5). Специфические антитела поликлональной сыворотки кроликов взаимодействовали как со взвесью интактных клеток вакцинного штамма *Listeria monocytogenes*, так и с очищенным препаратом рекомбинантного антигена p60.

Иммунохимическое проявление рекомбинантного антигена p60 и взвеси интактных клеток *Listeria*



1- маркер; 2-5 p60 в количестве: 2 мкг; 1 мкг; 0,5 мкг; 0,25 мкг

Рисунок 6. Результаты иммуноблоттинга рекомбинантного антигена p60 (А) и взвеси интактных клеток *Listeria monocytogenes* АУФ(Б) с поликлональной сывороткой кролика.

monocytogenes методом иммуноблотинга достоверно подтвердило специфичность детекции поликлональных антител (ПКА) эпитопа белка *p60 L. monocytogenes* (рисунков 6).

На всех иммуноблотах четко представлена иммунопозитивная фракция белка с молекулярной массой 53 кДа, что соответствует молекулярной массе рекомбинантного антигена *p60 L. monocytogenes*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Listeria monocytogenes является потенциальным контаминантом продовольственного сырья и пищевых продуктов, которые как факторы передачи играют ведущую роль в возникновении листериоза у людей [1-3]. Быстрое обнаружение и достоверная идентификация антигенов *L. monocytogenes* в образцах продуктов питания или объектах внешней среды обеспечит надлежащую стратегию контроля вспышек листериоза.

Длина полноразмерного антигена *p60* составляет 1452 пар нуклеотидов, что приводит к образованию белка с теоретической молекулярной массой 50 кДа. Трехмерная структура *p60 Listeria monocytogenes* показала, что полноразмерный белок обладает выраженной доменной структурой с двумя консервативными регионами на N- и C-концах. Длина которых составляет 100 и 120 аминокислот, соответственно. Центральная часть белка содержит высоковариабельные для видов листерии области аминокислотных последовательностей. С-концевой регион идентифицирован как каталитический элемент, а N-концевой регион как элемент распознавания и связывания субстрата (пептидогликана). В консервативном районе на N-конце *p60* 1-27 аминокислотные остатки кодируют сигнальную последовательность [4-5,9, 17].

Биоинформатическими исследованиями структурной организации *p60 Listeria monocytogenes* установлено, что N-концевая часть полноразмерного белка *p60* включает два домена *LysM*, разделенные доменом *SH3*, тогда как C-концевая часть белка представлена доменом *NlpC/p60* [18,19]. Исследования функциональных характеристик структурных доменов *p60 L. monocytogenes* показали, что основной иммуномодулирующей и иммуностимулирующей ролью обладает домен N-конца белка *p60 LysM*. Этот небольшой белковый домен, состоящий примерно из 50 аминокислот, был идентифицирован как главный иммуносвязывающий участок с высокой аффинностью к полимерам N-ацетилглюкозамина пептидогликана [18-20]. Таким образом, секреция белка *p60* в цитозоль клетки хозяина сопровождается расщеплением сигнального пептида, что позволяет активировать иммунологически значимые домены N-концевой части белка *p60* [8,9,18-20].

В результате исследований с использованием гена белка *p60 Listeria monocytogenes* создана генетическая конструкция для получения рекомбинантного антигена *p60* без сигнального пептида и продемонстрировано накопление в индуцированных культурах экспрессионного штамма *Escherichia coli Arctic Express (DE3)/pET28c(+)/Lmp60*.

Иммунологические анализы, основанные на детерминантах вирулентности возбудителя инфекции, создают

прочную основу для разработки диагностических или детекционных инструментов, специфичных для патогена.

Поликлональные (*PAb*) и моноклональные (*MAb*) антитела, полученные против ключевых иммунодоминантных антигенов *L. monocytogenes*, как специфические иммуореагенты оказались полезными при разработке и модификации иммуоферментных методов контроля и профилактики листериоза. Использование полноразмерного или пептидного фрагмента белка *p60 L. monocytogenes* оказалось весьма эффективно для получения высокоспецифичных *PAb* и *MAb* антител и разработки методов специфической иммуодетекции патогенных листерий в пищевых продуктах.

Успешная разработка и применение МКА, направленных против полноразмерного белка *p60 L. monocytogenes*, для выявления листерий в пищевых продуктах с использованием сэндвич-варианта ИФА описаны в работе Yu K. и соавт. (2004). МКА *p6007* специфически распознавали белок *p60* среди серотипов *Listeria monocytogenes*, в то время как МКА *p6017* обладали более широким спектром распознавания *p60* различных видов *Listeria*, что указывает на различия в их эпитопной специфичности [15]. В работе Lim H.Y. и соавт. (2003) было показано, что МКА гибридомы 1H4 к белку *p60*, селективно взаимодействовали со всеми представителями рода *Listeria*, не реагируя с близкородственными микроорганизмами [21]. Высокая специфичность МКА 10E7 и 9H3 к полноразмерному белку *p60 L. monocytogenes* позволила использовать их для создания ИХА на основе золотых наночастиц с пределом обнаружения 10^3 - 10^4 КОЕ/мл [22].

Селективное обнаружение *Listeria monocytogenes* было достигнуто с применением МКА, направленных против короткого высококонсервативного пептида высоковариабельного центрального региона белка *p60 L. monocytogenes*. Гидрофильный пептид *PerD* из одиннадцати аминокислот (QQQTAPKAPTE) был идентифицирован в составе белка *p60* как консервативная область, характерная исключительно для серотипов *L. monocytogenes*. Экспрессия этого уникального фрагмента белка *p60* позволила получить высокоспецифичные антитела для распознавания различных серотипов *L. monocytogenes* [13]. Данный пептид был эффективно использован в качестве мишени для разработки иммуофлюоресцентного метода обнаружения листерий в пищевых продуктах [16]. Применение МКА с аналогичной эпитопной специфичностью в сэндвич-варианте ИФА обеспечило достижение чувствительности метода на уровне 10^3 КОЕ/мл [14].

Проведенные исследования по определению специфичности полученного рекомбинантного антигена *p60 L. monocytogenes* методами ИФА и иммуноблотинга показали, что сыворотки иммунных кроликов, вакцинированных вакциной *L. monocytogenes* АУФ, специфически реагировали с рекомбинантным антигеном *p60*. Как известно, данный белок *p60* значительно экспрессируется извне во время активного размножения патогенных листерий, в том числе при их культивировании. Это свойство *p60* делают его предпочтительным для обнаружения по сравнению с другими антигенными мишенями [[2,4,6,7,9,10]] и обуславливает его высокую диагностическую ценность как идеального индикаторного белка для обнаружения

L.monocytogenes в зараженных пищевых продуктах [13-16].

Зарубежные коммерческие наборы ИФА для идентификации листерии на основе моноклональных антител «Solus Listeria ELISA» PerkinElmer США и «Listeria monocytogenes p60 ELISA» Kit» Cell Biolabs, США имеют предел детекции обнаружения p60 *L.monocytogenes* до 625 пг/мл. Применение современных методов ускоренной идентификации листерий позволяет существенно сократить срок проведения анализа и повысить достоверность полученных результатов даже при низкой концентрации возбудителя в исследуемой пробе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием технологий рекомбинантной ДНК из изолята *L.monocytogenes*, циркулирующего в Республике Казахстан получен штамм-продуцент *Escherichia coli* ArcticExpress(DE3)/*Lmp60*, экспрессирующий рекомбинантный антиген p60 *L.monocytogenes* с удалённой сигнальной последовательностью.

Созданный штамм-продуцент позволяет получить рекомбинантную муреингидролазу p60, который является высокоэффективным диагностическим маркером и перспективным индикаторным белком для выявления *Listeria monocytogenes* в заражённых пищевых продуктах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант №BR218004/0223 «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Manyi-Loh C.E., Lues R. Listeria monocytogenes and listeriosis: the global enigma // *Foods*. – 2025. – Vol. 14. – P. 1266. doi:10.3390/foods14071266
2. Zakir S., Abdo S., Bushra M., Hussein J. A. Current epidemiologic status and public health importance of listeriosis: a review // *Journal of Veterinary Physiology and Pathology*. – 2022. – Vol. 1(3). – P. 61–68. doi:10.58803/jvpp.v1i3.10
3. Koncurat A., Sukalic T. Listeriosis: characteristics, occurrence in domestic animals, public health significance, surveillance and control // *Microorganisms*. – 2024. – Vol. 12. – P. 2055. doi:10.3390/microorganisms12102055
4. Lopes-Luz L., Mendonça M., Bernardes Fogaça M., Kipnis A., Bhunia A.K., Bühner-Sékula S. Listeria monocytogenes: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays // *Crit Rev Microbiol*. – 2021. – Vol. 47. – P. 647-666. doi: 10.1080/1040841X.2021.1911930.
5. Radoshevich L., Cossart P. Listeria monocytogenes: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis

// *Nat Rev Microbiol*. – 2018. – Vol. 16. – P. 32-46. doi: 10.1038/nrmicro.2017.126.

6. Lee B.H., Cole S., Badel-Berchoux S., Guillier L., Felix B., Krezdorn N., Hébraud M., Bernardi T., Sultan I., Piveteau P. Biofilm Formation of Listeria monocytogenes Strains Under Food Processing Environments and Pan-Genome-Wide Association Study // *Front Microbiol*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2698. doi: 10.3389/fmicb.2019.02698.

7. Roberts B.N., Chakravarty D., Gardner J.C. 3rd, Ricke S.C., Donaldson J.R. Listeria monocytogenes Response to Anaerobic Environments // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – P.210. doi: 10.3390/pathogens9030210.

8. Matle I., Mbatha K.R., Madoroba E. A review of Listeria monocytogenes from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis // *Onderstepoort J Vet Res*. – 2020. – Vol. 87. – P. 1-20. doi: 10.4102/ojvr.v87i1.1869.

9. Meireles D., Pombinho R., Cabanes D. Signals behind Listeria monocytogenes virulence mechanisms // *Gut Microbes*. – 2024. – Vol.16. – №1. – P. 2369564. doi: 10.1080/19490976.2024.2369564.

10. Matsuda Y., Yamauchi H., Hara H. Activation of inflammasomes and mechanisms for intracellular recognition of Listeria monocytogenes // *Microbiol Immunol*. – 2023. – Vol. 67(10). – P. 429-437. doi: 10.1111/1348-0421.13091

11. Quereda J.J., Morón-García A., Palacios-Gorba C., Dessaux C., García-Del Portillo F., Pucciarelli M.G., Ortega A.D. Pathogenicity and virulence of Listeria monocytogenes: A trip from environmental to medical microbiology // *Virulence*. – 2021. – Vol. 12. – P. 2509-2545. doi: 10.1080/21505594.2021.1975526.

12. Lathrop A.L., Bailey N.B., Kim K.P., Bhunia A.K. Pathogen-specific antigen target for production of antibodies produced by comparative genomics // *Antibody Technology Journal*. – 2014. – Vol. 4. – P. 13-22. doi: 10.2147/ANTI.S54848.

13. Bubert A., Schubert P., Kohler S., Frank R., Goebel W. Synthetic peptides derived from the Listeria-monocytogenes P60-protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free L-monocytogenes P60-proteins // *Appl Environ Microbiol*. – 1994. – Vol. 60(9). – P. 3120-3127.

14. Coutu J.V., Morissette C., D'Auria S., Lacroix M. Development of a highly specific sandwich ELISA for the detection of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen // *Microbiology Research International*. – 2014. – Vol. 2(4). – P. 46-52.

15. Yu K.Y., Noh Y., Chung M., Park H.J., Lee N., Youn M., Jung B.Y., Youn B.S. Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of Listeria monocytogenes // *Clin Diagn Lab Immunol*. – 2004. – Vol. 11(3). – P. 446-51. doi: 10.1128/CDLI.11.3.446-451.2004

16. Beauchamp S., D'Auria S., Pennacchio A., Lacroix M. A new competitive fluorescence immunoassay for detection of Listeria monocytogenes // *Analytical Methods, Royal Society of Chemistry*. – 2012. – Vol. 4. – P. 4187-92.

17. Wiktorczyk-Kapischke N., Skowron K., Walecka-Zacharska E. Genomic and pathogenicity islands of Listeria

monocytogenes-overview of selected aspects // Front Mol. Biosci. – 2023. – Vol. 14;10. – P. 1161486. doi: 10.3389/fmolb.2023.1161486

18. Yu M., Yang J., Guo M. Is the LysM domain of *L. monocytogenes* p60 protein suitable for engineering a protein with high peptidoglycan binding affinity? // Bioengineered. – 2016. – Vol. 7(6). – P. 406-410. doi: 10.1080/21655979.2016.1200772

Schmidt R.L., Filak H.C., Lemon J.D., Potter T.A., Lenz L.L. A LysM and SH3-domain containing region of the *Listeria monocytogenes* p60 protein stimulates accessory cells to promote activation of host NK cells // PLoS Pathog. – 2011. – Vol. 7(11). – P. 2368. doi: 10.1371/journal.ppat.1002368

20. Griffin M.E., Klupt S., Espinosa J., Hang H.C. Peptidoglycan NlpC/P60 peptidases in bacterial physiology and host interactions // Cell Chem. Biol. – 2023. – Vol. 18;30(5). – P. 436-456. doi: 10.1016/j.chembiol.2022.11.001

21. Lim H.Y., Oh Y.K., Kim, J.S., Lim, Y.K. Lee, Y.S and Yoon, B.S. Production of Monoclonal Antibody for *Listeria* spp. P60 Protein Based on iap Gene // Journal of Food Hygiene and Safety. – 2013. – Vol. 8. – P. 25-29.

22. Wang W., Liu L., Song S., Xu L., Zhu J., Kuang H. Gold nanoparticle-based paper sensor for multiple detection of 12 *Listeria* spp. by P60-mediated monoclonal antibody // Food and Agricultural Immunology. – 2017. – Vol. 28:2 – P. 274-287. doi: 10.1080/09540105.2016.1263986

REFERENCES

1. Manyi-Loh C.E., Lues R. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: the global enigma // Foods. – 2025. – Vol.14. – P. 1266. doi:10.3390/foods14071266

2. Zakir S., Abdo S., Bushra M., Hussein J. A. Current epidemiologic status and public health importance of listeriosis: a review // Journal of Veterinary Physiology and Pathology. – 2022. – Vol. 1(3). – P. 61–68. doi:10.58803/jvpp.v1i3.10

3. Koncurat A., Sukalic T. Listeriosis: characteristics, occurrence in domestic animals, public health significance, surveillance and control // Microorganisms. – 2024. – Vol. 12. – P. 2055. doi:10.3390/microorganisms12102055

4. Lopes-Luz L., Mendonça M., Bernardes Fogaça M., Kipnis A., Bhunia A.K., Bühner-Sékula S. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays // Crit Rev Microbiol. – 2021. – Vol. 47. – P. 647-666. doi: 10.1080/1040841X.2021.1911930.

5. Radoshevich L., Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis // Nat Rev Microbiol. – 2018. – Vol. 16. – P. 32-46. doi: 10.1038/nrmicro.2017.126.

6. Lee B.H., Cole S., Badel-Berchoux S., Guillier L., Felix B., Krezdorn N., Hébraud M., Bernardi T., Sultan I., Piveteau P. Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* Strains Under Food Processing Environments and Pan-Genome-Wide Association Study // Front Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 2698. doi: 10.3389/fmicb.2019.02698.

7. Roberts B.N., Chakravarty D., Gardner J.C. 3rd, Ricke S.C., Donaldson J.R. *Listeria monocytogenes* Response to

Anaerobic Environments // Pathogens. – 2020. – Vol. 9. – P.210. doi: 10.3390/pathogens9030210.

8. Matle I., Mbatha K.R., Madoroba E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis // Onderstepoort J Vet Res. – 2020. – Vol. 87. – P. 1-20. doi: 10.4102/ojvr.v87i1.1869.

9. Meireles D., Pombinho R., Cabanes D. Signals behind *Listeria monocytogenes* virulence mechanisms // Gut Microbes. – 2024. – Vol.16. – №1. – P. 2369564. doi: 10.1080/19490976.2024.2369564.

10. Matsuda Y., Yamauchi H., Hara H. Activation of inflammasomes and mechanisms for intracellular recognition of *Listeria monocytogenes* // Microbiol Immunol. – 2023. – Vol. 67(10). – P. 429-437. doi: 10.1111/1348-0421.13091

11. Quereda J.J., Morón-García A., Palacios-Gorba C., Dessaux C., García-Del Portillo F., Pucciarelli M.G., Ortega A.D. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology // Virulence. – 2021. – Vol. 12. – P. 2509-2545. doi: 10.1080/21505594.2021.1975526.

12. Lathrop A.L., Bailey N.B., Kim K.P., Bhunia A.K. Pathogen-specific antigen target for production of antibodies produced by comparative genomics // Antibody Technology Journal. – 2014. – Vol. 4. – P. 13-22. doi: 10.2147/ANTI.S54848.

13. Bubert A., Schubert P., Kohler S., Frank R., Goebel W. Synthetic peptides derived from the *Listeria-monocytogenes* P60-protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L-monocytogenes* P60-proteins // Appl Environ Microbiol. – 1994. – Vol. 60(9). – P. 3120-3127.

14. Coutu J.V., Morissette C., D'Auria S., Lacroix M. Development of a highly specific sandwich ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen // Microbiology Research International. – 2014. – Vol. 2(4). – P. 46-52.

15. Yu K.Y., Noh Y., Chung M., Park H.J., Lee N., Youn M., Jung B.Y., Youn B.S. Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria monocytogenes* // Clin Diagn Lab Immunol. – 2004. – Vol. 11(3). – P. 446-51. doi: 10.1128/CDLI.11.3.446-451.2004

16. Beauchamp S., D'Auria S., Pennacchio A., Lacroix M. A new competitive fluorescence immunoassay for detection of *Listeria monocytogenes* // Analytical Methods, Royal Society of Chemistry. – 2012. – Vol. 4. – P. 4187-92.

17. Wiktoreczyk-Kapischke N., Skowron K., Wałęcka-Zacharska E. Genomic and pathogenicity islands of *Listeria monocytogenes*-overview of selected aspects // Front Mol. Biosci. – 2023. – Vol. 14;10. – P. 1161486. doi: 10.3389/fmolb.2023.1161486

18. Yu M., Yang J., Guo M. Is the LysM domain of *L. monocytogenes* p60 protein suitable for engineering a protein with high peptidoglycan binding affinity? // Bioengineered. – 2016. – Vol. 7(6). – P. 406-410. doi: 10.1080/21655979.2016.1200772

Schmidt R.L., Filak H.C., Lemon J.D., Potter T.A., Lenz L.L. A LysM and SH3-domain containing region of the

Listeria monocytogenes p60 protein stimulates accessory cells to promote activation of host NK cells // PLoS Pathog. – 2011. – Vol. 7(11). – P. 2368. doi: 10.1371/journal.ppat.1002368

20. Griffin M.E., Klupt S., Espinosa J., Hang H.C. Peptidoglycan NlpC/P60 peptidases in bacterial physiology and host interactions // Cell Chem. Biol. – 2023. – Vol. 18;30(5). – P. 436-456. doi: 10.1016/j.chembiol.2022.11.001

21. Lim H.Y., Oh Y.K., Kim, J.S., Lim, Y.K. Lee, Y.S and Yoon, B.S. Production of Monoclonal Antibody for *Listeria* spp. P60 Protein Based on iap Gene // Journal of Food Hygiene and Safety. – 2013. – Vol. 8. – P. 25-29.

22. Wang W., Liu L., Song S., Xu L., Zhu J., Kuang H. Gold nanoparticle-based paper sensor for multiple detection of 12 *Listeria* spp. by P60-mediated monoclonal antibody // Food and Agricultural Immunology. – 2017. – Vol. 28:2 – P. 274-287. doi: 10.1080/09540105.2016.1263986

P60 *LISTERIA MONOCYTOGENES* РЕКОМБИНАНТТЫ АНТИГЕНІН АЛУ

Тургимбаева А.М., Абельденов С.К., Мухлис Ш.Е., Каукабаева Г.К., Унышева Г.Б., Ахметкаримова Ж.С., Ескендірова С.З.*

«Ұлттық биотехнология орталығы», Қорғалжын тас жолы 13/5, Астана, Қазақстан

*Корреспондент автор: eskendirova@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Listeria monocytogenes бұл жасушаішілік өмірлік циклмен, айқын бейімделу механизмдерімен және вируленттік факторлардың кең ауқымдылығымен сипатталатын маңызды тағамдық патогендердің бірі. Зерттеудің мақсаты — Қазақстан Республикасының аумағында айналымда жүрген *Listeria monocytogenes* изоляттарынан алынған р60 рекомбинантты антигенін алу болып табылады. Рекомбинантты ДНҚ технологиясын пайдалану нәтижесінде 50,3 кДа молекулалық массасы бар ақуызды экспрессиялайтын *Escherichia coli* ArcticExpress(DE3)/Lmp60 штамм-продуценті алынды.

Рекомбинантты р60 антигенінің спецификалығы иммуноферменттік талдау (ИФА) және иммуноблотинг әдістері арқылы расталды. Алынған нәтижелер *L. monocytogenes* р60 ақуызының диагностикалық маңыздылығын дәлелдеп, оны тағам өнімдерінде *L. monocytogenes*-ті жедел анықтауға арналған жоғары телімді иммуноферменттік тест-жүйені әзірлеуде мақсатты антиген ретінде қолданудың болашағы бар екенін көрсетеді.

Кілт сөздер: *Listeria monocytogenes*, рекомбинантты антиген, р60, иммуноферменттік талдау, диагностика, экспрессиондық жүйе.

RECOMBINANT PRODUCTION OF THE P60 ANTIGEN OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Turgimbayeva A.M., Abeldenov S.K., Mukhlis S.E., Kaukabayeva G.K., Unysheva G.B., Akhmetkarimova Z.S., Eskendirova S.Z.*

National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhyn Highway, Astana, Kazakhstan

*Author correspondent: eskendirova@biocenter.kz

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a significant foodborne pathogen characterized by an intracellular life cycle, pronounced adaptive mechanisms, and a broad spectrum of virulence factors. The aim of this study was to obtain the recombinant p60 antigen of *L. monocytogenes* from isolates circulating in the Republic of Kazakhstan. Using recombinant DNA technology, a producer strain *Escherichia coli* ArcticExpress(DE3)/Lmp60 was generated, enabling the expression of the protein with a molecular mass of 50.3 kDa. The specificity of the recombinant p60 antigen was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting. The obtained results highlight the diagnostic value of the p60 protein of *L. monocytogenes* as a target antigen for the development of highly specific ELISA-based test systems aimed at the rapid identification of *L. monocytogenes* in food products.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, recombinant antigen, p60, ELISA, diagnostics, expression system.