



УДК 616.36.-002.14:578.891-078.33

ЭКСПРЕССИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИГЕНОВ *T. PALLIDUM* В *E. COLI*

**В.Н. Лазарев², М. Шкарупета², С. Левицки,² Г. Бакирова¹, К.Н. Мукантаев¹,
К.К. Муканов¹, Е.М. Раманкулов¹, Б.М. Султанкулов³, Е.О. Айтенев³**

lil@biocenter.kz

¹РГП «Национальный центр биотехнологии РК», г. Астана²ФГУ «НИИ Физико-химической медицины» ФМБА России, г. Москва³РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», г. Астана

В ходе выполнения работы были отобраны 5 белков – кандидатов для использования в качестве антигенов. Кроме этого, были разработаны системы праймеров для специфической PCR-амплификации кодирующих эти белки генов. Получены 10 экспрессионных плазмидных векторов, определена растворимость продуцируемых рекомбинантных белков, а также оптимизированы условия экспрессии клонированных генов.

Введение

На сегодняшний день в странах СНГ, в том числе и Республике Казахстан, высокая заболеваемость сифилисом остается одной из актуальных проблем в области практического здравоохранения. Во многом этому способствует сложившаяся в странах СНГ экономическая и демографическая ситуация (снижение социально-экономического уровня населения; создание рынка интимных услуг, наличие неконтролируемых миграционных потоков населения) [1, 2]. В настоящее время во всем мире доминирующая роль в лабораторной диагностике сифилиса принадлежит серологическим методам исследования [3, 4, 5]. В диагностике сифилиса применяют серологические реакции, основанные на различных принципах, главным образом, преципитации, агглютинации, адгезии, лизиса, иммунофлюоресценции, иммуноферментного анализа. Необходимость комплексной серодиагностики сифилиса диктуется тем, что любая из предлагаемых реакций не является абсолютно чувствительной и специфичной. Специфичность и чувствительность во многом зависят от качества трепонемного антигена, который может быть получен из патогенных и культуральных бледных трепонем [6-7].

Одним из наиболее перспективных путей совершенствования диагностических тест-систем является использование в качестве антитело-связывающего субстрата рекомбинантных белков бледной спирохеты, синтезированных в различных экспрессирующих системах. Использование таких рекомбинантных белков, сохраняющих антигенные детерминанты возбудителя сифилиса, вместо убитого микробного антигена патогенной или непатогенной спирохеты, увеличивает специфичность и чувствительность тест-систем.

В связи с вышесказанным, основной целью исследования являлось получение потенциальных антигенных структур *Treponema pallidum* в качестве рекомбинантных белков с целью производства реагентов для иммуноферментного определения антител к *Treponema pallidum* в сыворотке крови.

Для решения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- клонирование генов кандидатных белков;
- выбор перспективных клонов, продуцирующих рекомбинантные белки по степени продукции;
- оптимизация условий экспрессии рекомбинантных белков.



Материалы и методы

Поиск возможных белков для использования в диагностической иммуноферментной тест-системе для диагностики сифилиса проводили с использованием баз данных PubMed NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) и GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Анализ и подбор нуклеотидных последовательностей проводился с использованием пакета программ Vector NTI 9.0 (Invitrogen, США).

Синтез олигонуклеотидов проводили методом твердофазного амидофосфитного синтеза на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800. В работе использовали штаммы *E. coli* DH5 и B834(DE3) (Novagen, USA), плазмидные векторы pGEM-TEasy (Promega, USA), pET15b и pET32a (Novagen, США). Выделение плазмидной ДНК, а также препаративное разделение фрагментов ДНК проводили методами, описанными Маниатисом и соавторами [5].

Для лигирования фрагментов ДНК использовали ДНК-лигазу фага T4 производства «Promega» (США). Первичную структуру ДНК определяли по методу Sanger [6] с использованием наборов BigDye на автоматических анализаторах ДНК ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США).

Наработка и очистка рекомбинантного белка: полученными плазмидами трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма B834(DE3), трансформантов высевали на селективную среду, содержащую ампициллин (100 мкг/мл). Выросшие единичные колонии инокулировали в 100 мл 2хУТ среды (ампициллин 100 мкг/мл), культивировали на шейкере, до достижения оптической плотности $OD_{600} \sim 0.8$ при 37°C, 120 rpm. Экспрессия интересующего гена индуцировалась добавлением IPTG (0.1 mM). После добавления индуктора температура культивирования снижалась до 30°C.

После этого клетки собирали центрифугированием (3000g 15', +4°C), промывали небольшим объемом охлажденного буфера (25mM натрий-фосфатный буфер pH 7.4,

400mM NaCl) и разрушали ультразвуком, следуя рекомендациям производителя прибора. Полученный лизат осветляли центрифугированием (40 000g 45', +4°C). Рекомбинантный белок очищали на колонке HisTrap (Amersham) с использованием аффинной хроматографической системы AktaFPLC (Amersham).

Денатурирующий электрофорез белков (SDS-PAGE) проводили в вертикальной камере («Хеликон», Россия) в стеклах 10x8 см. Нижний, разделяющий, гель имел размеры 5x8 см. При проведении электрофореза использовались гели и буферы следующих составов:

- разделяющий: 12% полиакриламид (акриламид: метиленбисакриламид в соотношении 29:1); буфер разделяющего геля: 0.375M Tris-HCl pH 8,8; 0.1% SDS;
- концентрирующий гель: 5% полиакриламид (акриламид: метиленбисакриламид в соотношении 29:1); буфер разделяющего геля: 0,125M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS;
- электродный буфер: 25mM Tris-OH; 250mM глицин; 0,1% SDS;
- условия проведения электрофореза: 25mA на один гель, разделение проводилось до выхода красителя (бромфенола синего) из геля.

Результаты и обсуждение

Большинство из описанных в литературе антигенов *T. pallidum*, к которым вырабатываются антитела, в серологической диагностике наиболее часто используются в качестве рекомбинантных белков TrpN15, TrpN17, TrpN41, TrpN47. Согласно данным литературы [7, 8, 9, 10], чувствительность и специфичность теста на основе рекомбинантных белков очень высоки 99,3-99,5%, что позволяет рассматривать тест как новый диагностический тест на сифилис.

На основании изложенных данных, после компьютерного анализа были выбраны следующие белки *Treponema pallidum* TrpN15, TrpN 17, TrpN47, TrpK, Trp0453.

**TrpN15**

Липопротеин *Treponema pallidum* TrpN15 был выбран в качестве потенциального антигена для использования в диагностической тест-системе по нескольким причинам. Во-первых, согласно данным литературы, он вырабатывается *T. pallidum* на всех стадиях развития инфекции и является одним из наиболее узнаваемых иммунной системой человека антигенов сифилиса, у большинства больных сифилисом обнаруживаются IgG и IgM антитела к этому белку [14]. Во-вторых, TrpN15 - самый небольшой из известных липопротеинов *Treponema pallidum*, и его небольшой размер повышает вероятность успешной гетерологичной экспрессии в лабораторных штаммах *E. coli*. В третьих, большинство известных тест-систем основаны на использовании именно этого антигена.

TrpN17

TrpN17 называют «величайшим мембранным белком». Максимум выработки антител к нему наблюдается при вторичном сифилисе.

TrpN47

Пенициллин - связывающий белок с карбоксипептидазной активностью TrpN47 *T. pallidum* является основным мембранным антигеном возбудителя сифилиса [14]. Помимо этого, он обладает необычными для пенициллин связывающего белка характеристиками, в частности, неканоническими последовательностями в связывающих b-лактамазных последовательностях [15]. Важной характеристикой этого антигена для диагностики является тот факт, что лишь к нему образуются значительные количества антител у пациентов, страдающих ВИЧ-инфекцией [16]. Помимо необычности этого белка, перспективной выглядит возможность его продукции в лабораторных штаммах *E. coli*, поскольку белок амфифилен и по физико-химическим характеристикам сходен со многими липопротеинами кишечной палочки.

TrpK

Периплазматический белок TrpK (GenBank: AY685249) был выбран в каче-

стве потенциального антигена для использования в диагностической тест-системе по двум причинам. Во-первых, для этого белка показано существование достаточно сильного иммунного ответа у целого ряда пациентов. Кроме того, этот белок достаточно гетерогенен среди различных штаммов *T. pallidum*, и, следовательно, его применение, вероятно, могло бы повысить специфичность разрабатываемой системы по отношению к штаммам, циркулирующим на территории Казахстана.

Trp0453

Гипотетический липопротеин внешней мембраны *T. pallidum* Trp0453 был предложен для использования в иммуноферментной тест-системе для диагностики сифилиса по нескольким причинам. Во-первых, согласно литературным данным, этот белок является мощным антигеном, и антитела к нему формируются практически у всех зараженных сифилисом пациентов. Кроме того, антитела к Trp0453, обнаруживаемые в сыворотках больных сифилисом на всех стадиях течения заболевания, обладают высокой специфичностью и не имеют кросс-реактивности с антигенами других микроорганизмов [16].

Было установлено, что у всех отобранных белков возможные области узнавания антителами распределены равномерно по всей длине их аминокислотных последовательностей. В связи с этим нами было принято решение в дальнейшей работе по разработке иммуноферментной тест-системы клонировать полноразмерные гены отобранных белков-кандидатов.

Подбор последовательностей олигонуклеотидов для PCR-амплификации генов выбранных белков *Treponema pallidum* осуществляли с помощью программного пакета Vector NTI 9.0. В 5'-концевые области подбираемых олигонуклеотидов дополнительно вводились сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI, *Nde*I и *Xho*I для последующего клонирования полученных амплифицированных генов в составе экспрессирующих плазмидных векторов. Для каждого из выбранных генов подбирали по



3 олигонуклеотида; 2 праймера, комплиментарных 5'-концевой последовательности гена и один праймер комплиментарный 3'-концевой области гена. Два разных 5'-концевых олигонуклеотида потребовались для внесения в 5'-концевую часть амплифици-

рованных фрагментов двух разных сайтов рестрикции для последующего клонирования в составе разных векторных систем, при этом 3'-концевой сайт рестрикции был одинаков для разных систем.

Таблица 1

Первичные структуры подобранных олигонуклеот

Наименование	Последовательность 5'-3'	Длина	Аmplифицируемый ген
15Bf	GGATCCGTGAAAAGAGGTGGCGCG	24	TrpN15, 5'
17Bf	GGATCCAAAGGATCTGTCCGCGCG	24	TrpN17, 5'
47Bf	GGATCCGTGAAAGTGAAATACGCAC	25	TrpN47, 5'
TKBf	GGATCCGTGGTGTATCAGCGGGTA	24	TrpK, 5'
15Nf	CATATGGTGAAAAGAGGTGGCGCG	24	TrpN15, 5'
17Nf	CATATGAAAGGATCTGTCCGCGCG	24	TrpN17, 5'
47Nf	CATATGGTGAAAGTGAAATACGCAC	25	TrpN47, 5'
TKNf	CATATGGTGGTGTATCAGCGGGTA	24	TrpK, 5'
15r	CTCGAGCTACCTGCTAATAATGGC	24	TrpN15, 3'
17r	CTCGAGGGAAGGGAAGGGGCAGAC	24	TrpN17, 3'
47r	CTCGAGCTACTGGGCCACTACCTTC	25	TrpN47, 3'
TKr	CTCGAGCTACCAAATCAAGCGACATG	26	TrpK, 3'
T53B	GGATCCCGTGGTTGTACGCAGGG	23	Trp0453, 5'
T53N	CATATGCGTGGTTGTACGCAGGG	23	Trp0453, 5'
T53R	CTCGAGTTACGAACTTCCCTTTTGG	26	Trp0453, 3'

В последовательностях подчеркиванием и курсивом выделены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI, *Nc*/el и *Xho*I.

Гены отобранных белков-кандидатов были амплифицированы с использованием соответствующих пар олигонуклеотидов, подобранных и синтезированных в ходе первого этапа выполнения проекта. В качестве матрицы для амплификации была использована ДНК возбудителя сифилиса *Treponema pallidum*.

В результате проведения PCR-амплификации были получены достаточные для последующего клонирования количества копий генов *tpn15*, *tpn17*, *tpn47*, *tpk* и *tp0453*, несущие на 3'-концах сайты узнавания эндонуклеазы *Xho*I, а на 5'-концах – сайты узнавания эндонуклеаз *Nde*I или *Bam*HI в зависимости от пары использованных в амплификации олигонуклеотидов.

Полученные продукты амплификации были клонированы в состав плазмидного вектора pGem-TEasy. После селективного отбора и PCR-анализа была определе-

на нуклеотидная последовательность клонированных участков. По результатам анализа полученных последовательностей клонированной ДНК было показано, что содержащиеся в составе плазмидных векторов гены по своей первичной структуре полностью соответствуют последовательностям, размещенным в базе данных NCBI.

После этого плазмиды, содержащие клонированные гены, обрабатывали парами эндонуклеаз рестрикции *Nde*I-*Xho*I или *Bam*HI-*Xho*I. После гидролиза отщепленные фрагменты ДНК, соответствующие генам выбранных белков, препаративно очищали электрофорезом в агарозном геле и клонировали в состав плазмидных векторов pET15b, и pET32a, обработанных теми же эндонуклеазами соответственно.

В результате этого, после селективного отбора выросших трансформантов и их PCR-анализа, нами были получены 10 экспрессионных векторов. Пять из них, сконструированные на основе плазмиды pET15b, несли гены белков TrpN15, TrpN17, TrpN47, TrpK и Trp0453, к N-концевой части которых



был присоединен гистиридиновый гексапептид для последующей эффективной очистки методом аффинной металл-хелатирующей хроматографии (рис. 1). Эти векторы получили названия p15/T15, p15/T17, p15/T47, p15/TK и p15/T0453 соответственно. Другие пять экспрессионных векторов, полученных на основе плазмиды pET32a, несли гены тех же белков, слитых с тиоредоксином A *E. coli* для увеличения растворимости рекомбинантных полипептидов. Эти плазмиды получили названия p32/T15, p32/T17, p32/T47, p32/TK и p32/T0453 соответственно. У таких слитых рекомбинантных белков гистиридиновый гексапептид располагался в линкерном участке между последовательностями тиоредоксина A и антигена (рис. 2).

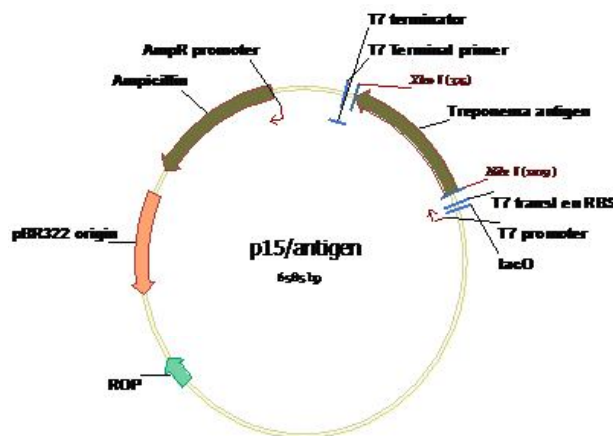


Рис. 1. Схема экспрессионных векторов, полученных на основе плазмиды pET15b

Гены отобранных белков-кандидатов (*Treponema antigen*) были клонированы по сайтам рестрикции NdeI и XhoI.

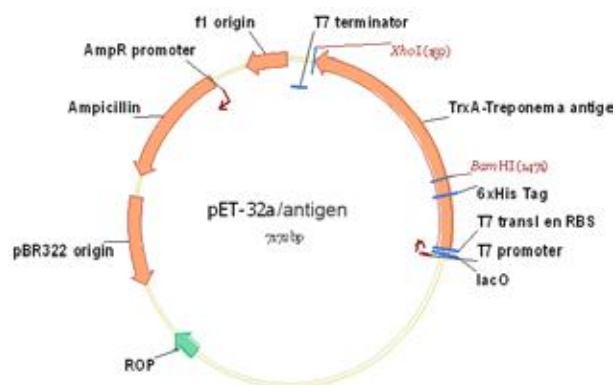


Рис. 2. Схема экспрессионных векторов, полученных на основе плазмиды pET32a

Гены отобранных белков-кандидатов (*Treponema antigen*) были клонированы по сайтам рестрикции BamHI и XhoI.

Предполагаемым белковым продуктом экспрессии клонированных генов являются слитые полипептиды, содержащие в N-концевой части последовательность тиоредоксина A *E. coli*.

Для оценки уровня экспрессии рекомбинантных белков каждая из полученных плазмид была трансформирована в компетентную клетку *E. coli* штамма B834. После культивирования трансформантов на селективной агаризованной среде не менее 5 различных клонов (для каждого экспрессионного вектора) переносили в жидкую питательную среду с антибиотиком и культивировали до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0.8$, а затем добавляли индуктор экспрессии изопропил, D-тиогалактопиранозид (IPTG) до концентрации 0,1 mM. После культивирования клетки собирали центрифугированием, клеточный осадок инкубировали в денатурирующем буфере для образцов при 95°C в течение 5 минут. Клеточные лизаты анализировали методом электрофореза по Лэмбли. В результате такого исследования было показано, что все клоны, содержащие полученные рекомбинантные конструкции, демонстрировали примерно одинаковый уровень продукции потенциальных антигенов.

Для определения оптимальных параметров культивирования штаммов-продуцентов рекомбинантных белков *Treponema pallidum* в первую очередь, необходимо было определить, являются ли продуцируемые рекомбинантные белки растворимыми. Для этого каждый из 10 штаммов-продуцентов (*E. coli* B834, трансформированные p15/T15, p15/T17, p15/T47, p15/TK, p15/T0453, p32/T15, p32/T17, p32/T47, p32/TK и p32/T0453) культивировали аналогичным образом, указанным выше. После центрифугирования клетки ресуспендировали в буфере (25 mM натрий-фосфатный буфер pH 7.4, 400 mM NaCl, 10% глицерин) и разрушали ультразвуком. После этого растворимую и нерастворимую фракции разделяли высокоскоростным центрифугированием (40 000g 45 минут). Образцы растворимой (цитоплазма и периплазма) и нерастворимой (клеточ-



ная стенка, цитоплазматическая мембрана, тельца включения) фракций анализировали методом электрофореза по Лэмли. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2

Локализация рекомбинантных белков при их продукции в клетках *E. coli*.

Штамм-продуцент <i>E. coli</i>	Локализация рекомбинантного белка	
	растворимая фракция	нераствори- мая фракция
B834/p15/T15	-/+	+
B834/p15/T17	-/+	+
B834/p15/T47	-	+
B834/p15/TK	-	+
B834/p15/T0453	-/+	+
B834/p32/T15	+	+/-
B834/p32/T17	+	+/-
B834/p32/T47	-/+	+
B834/p32/TK	-/+	+
B834/p32/NJ453	+/-	-/+

Из приведенных данных видно, что в большей степени растворимы слитые белки, имеющие в своем составе в N-концевой части последовательность тиоредоксина А *E. coli*. На основании полученных результатов было принято решение оптимизировать

условия экспрессии клонированных генов только для штаммов, содержащих плазмиды, полученные на основе вектора pET32a (p32/T15, p32/T17, p32/T47, p32/TK и p32/T0453).

Оптимизация условий гетерологичной экспрессии клонированных генов подразумевает, в первую очередь, выбор условий культивирования штаммов-продуцентов для максимизации продукции рекомбинантных белков. Основными параметрами культивирования в выбранной для продукции потенциальных антигенов *T. pallidum* системе являются концентрация индуктора (IPTG) и температура среды при инкубации после внесения в среду индуктора.

В ходе оптимизации продукции рекомбинантных белков для каждого из выбранных штаммов-продуцентов были протестированы следующие параметры культивирования: концентрации индуктора 0,1 мМ, 0,25 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ; температуры питательной среды 30°C и 37°C. При этом оценивалось относительное содержание рекомбинантных белков в растворимой фракции лизатов штаммов-продуцентов. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

Относительные количества рекомбинантных белков в растворимых фракциях лизатов штаммов-продуцентов при различных условиях индукции экспрессии

<i>E. coli</i> B834/p32/T15				
	0,1 мМ IPTG	0,25 мМ IPTG	0,5 мМ IPTG	1 мМ IPTG
30°C	20%	15%	10%	н/д
37°C	15%	н/д	н/д	н/д
<i>E. coli</i> B834/p32/T17				
	0,1 мМ IPTG	0,25 мМ IPTG	0,5 мМ IPTG	1 мМ IPTG
30°C	25%	17%	12%	н/д
37°C	19%	н/д	н/д	н/д
<i>E. coli</i> B834/p32/T47				
	0,1 мМ IPTG	0,25 мМ IPTG	0,5 мМ IPTG	1 мМ IPTG
30°C	10%	7%	н/д	н/д
37°C	н/д	н/д	н/д	н/д
<i>E. coli</i> B834/p32/TK				
	0,1 мМ IPTG	0,25 мМ IPTG	0,5 мМ IPTG	1 мМ IPTG
30°C	10%	н/д	н/д	н/д
37°C	н/д	н/д	н/д	н/д
<i>E. coli</i> B834/p32/T0453				
	0,1 мМ IPTG	0,25 мМ IPTG	0,5 мМ IPTG	1 мМ IPTG
30°C	14%	7%	н/д	н/д
37°C	11%	н/д	н/д	н/д

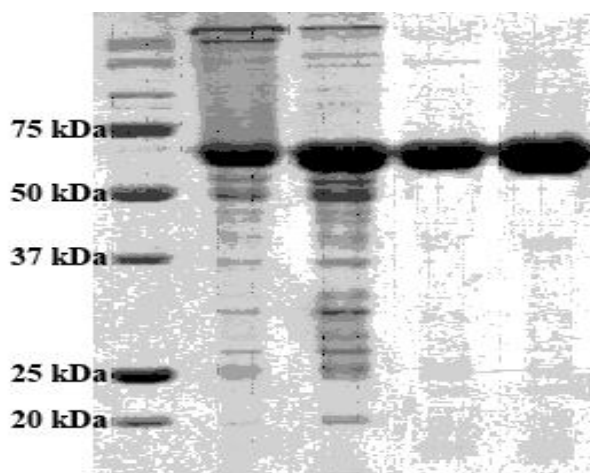
Примечание - н/д – не детектируется.



Как следует из приведенных данных, для всех выбранных для дальнейшей работы штаммов-продуцентов максимальная продукция рекомбинантных белков в растворимой фракции отмечена при следующих условиях культивирования: концентрация индуктора 0,1 мМ, температура культивирования после индукции экспрессии 30°C.

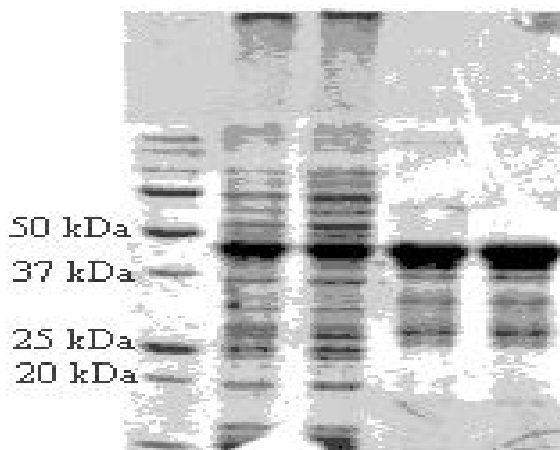
Далее нами был разработан протокол очистки рекомбинантного белка *Treponema pallidum*. Клетки *E. coli*, содержащие наработанный химерный рекомбинантный белок, осаждали центрифугированием при 3000g в течение 20 минут, осадок промывали 1/3 объема физраствора, центрифугировали при 3000g 20 минут и ресуспендировали в 10-30 мл буфера для металл-аффинной хроматографии (25 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7.4, 400 мМ NaCl, 20 мМ имидазол). Клетки разрушали ультразвуком (22kHz, 4 раза по 20 секунд), нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием при 50000g в течение 45 минут. Нерастворимую фракцию (осадок) ресуспендировали в 10 мл 25 мМ буфера для металл-аффинной хроматографии с 8М мочевиной, инкубировали 1 час на магнитной мешалке, затем центрифугировали при 50000g в течение 45 минут. Полученный таким образом осветленный лизат фильтровали через нейлоновый фильтр (диаметр пор 0,45 мкм) и подвергали металл-аффинной хроматографии. Рекомбинантный белок очищали на колонке HisTrap (Amersham, США) с использованием хроматографической системы AktaFPLC (Amersham, США). Элюцию проводили буфером (Buffer B: 25 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7.4, 400 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 8М мочевиной).

Ренатурацию рекомбинантного белка проводили с помощью диализа против 300-кратного объема 25 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7.25 с 300 мМ NaCl. Исходный лизат, растворимую и нерастворимую фракции, а также элюат и ренатурированный белок анализировали денатурирующим электрофорезом в 12% ПААГ (рис. 3.)



1 - маркер молекулярных масс; 2, 3 - индуцированные клетки; 4, 5 - фракции белков после элюции с колонки при металл-аффинной хроматографии

Рис. 3. Электрофорез рекомбинантного белка TrpN47



1 - маркер молекулярных масс; 2, 3 - индуцированные клетки; 4, 5 - фракции белков после элюции с колонки при металл-аффинной хроматографии

Рис. 4. Электрофорез рекомбинантного белка TrpN17

Из результатов электрофореза (рис. 3, 4) видно, что в очищенных препаратах молекулярная масса рекомбинантного белка TrpN47 (4, 5 дорожка) составляет 66 кД, а молекулярная масса TrpN17 - 45 кД, что соответствует литературным данным.

Выводы

Таким образом, в ходе выполнения работы были клонированы гены белков-кандидатов для использования в качестве антигенов в иммуноферментной тест-системе для диагностики сифилитической



инфекции. Получены 10 экспрессионных плазмидных векторов, определена растворимость продуцируемых рекомбинантных белков, а также оптимизированы условия экспрессии клонированных генов. Предложен и реализован протокол выделения, очистки и ренатурации рекомбинантного белка *Treponema pallidum* с помощью металл-аффинной хроматографии и последующего диализа.

Литература

1. Болезни, передаваемые половым путем: ведение пациентов // Доклад ВОЗ Сер. Техн. - Москва, 1994; 810.
2. Диагностика, лечение и профилактика заболеваний, передаваемых половым путем: Метод. материалы. - М.: Ассоциация САНАМ, 1996.
3. Van Dyck E., Meheus A.Z., Piot P. Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases. - Geneva, 1999. - P. 135.
4. Jurado R.L. Syphilis serology: a practical approach // Div. of Infectious Dis. Depart. of Med. Decatur, Georgia infect. Dis. In Clin. Pract., 1996, 5, P. 351-358.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: - М.: Мир, 1982.
6. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1977. - v.74. - pp. -5463-5467.
7. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сифилиса // Вестник дерм. и венер.- 1996. - №2. - С. 29-33.
8. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сифилиса // Вестник дерм. и венер. - 1996. - №3. - С.33-38.
9. Egglestone S.I., Turner A.J.L. Serological diagnosis of syphilis // Public Health Laboratory, Institute of Pathology, Newcastle General Infirmary, Newcastle upon Tyne NE4 6BE, UK. Common Dis Public Health. - 2000. - 3. - P. 158-162.
10. Маликов В.Е., Кудрина М.И., Петришина С.В. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики сифилиса // Вестник дерм. и венер. - 2001. - №1. - С. 16-18.

Түйін

Жұмысты орындау барысында антиген ретінде қолдану мақсатында 5 ақуыз сұраптан алынды. Одан басқа осы ақуыз гендерін кодтауға телімді PCR - амплификациясы үшін праймерлер жүйесі өнделді. 10 экспрессионды плазмидті векторлар алынды және өндіруші рекомбинантты ақуыздардың ерігіштігі анықталды, сонымен бірге клондалған гендердің экспрессия шарттары оңтайландырылды.

Summary

Five protein candidates were chosen as antigens during the project. We developed system of primers for PCR-amplification of genes coding those proteins and created 10 expression plasmid vectors; their recombinant protein products solubility and gene expression were determined.