



FUNKČNÍ VZOREK

**Příprava rekombinantního proteinu SUAM
(*Streptococcus uberis* adhesion molecule)
a jeho potenciální využití pro získání specifických
protilátek IgY imunizací slepic**

**Mgr. Šárka Kobzová
Mgr. Hana Štěpánová, Ph.D.
Mgr. Karolína Hlavová, Ph.D.
MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.
Mgr. Adam Norek, Ph.D.
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.**

3272
2023

Funkční vzorek 3272/2023

**Příprava rekombinantního proteinu SUAM (*Streptococcus uberis*
adhesion molecule) a jeho potenciální využití pro získání
specifických protilátek IgY imunizací slepic**

Mgr. Šárka Kobzová

Mgr. Hana Štěpánová, Ph.D.

Mgr. Karolína Hlavová, Ph.D.

MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.

Mgr. Adam Norek, Ph.D.

Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.

ISBN 978-80-7672-034-3

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu s názvem „Veterinární léčebný
přípravek na bázi obohacení protilátkami IgY“, registrační číslo
CZ.01.1.02/0.0/0.0/20_321/0024962, který je spolufinancován Ministerstvem
průmyslu a obchodu jako řídicí orgán Operačního programu Podnikání a inovace pro
konkurenceschopnost.

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Cíl.....	3
3. Příprava rekombinantního proteinu SUAM.....	3
3.1 Kultivační média	3
3.2 Pufry	4
3.3 Klonování	4
3.4 Exprese v LB médiu, purifikace.....	5
3.5 Identifikace proteinu pomocí LC-MS/MS z SDS-PAGE gelu.....	6
4. Imunizace	7
5. Detekce protilátek proti SUAM v séru slepic metodou ELISA.....	7
6. Srovnání novosti postupů.....	9
7. Uplatnění funkčního vzorku.....	9
8. Ekonomické aspekty	9
9. Seznam použité literatury.....	9
10. Dedikace.....	9

1. Úvod

Streptococcus uberis je častým patogenem v mléčných stádech. Způsobuje subklinickou a klinickou mastitidu u laktujících, nelaktujících krav i jalovic po celém světě. Mastitida vede k velkým ekonomickým ztrátám v chovech skotu v důsledku snížené produkce a kvality mléka, nákladů na léčbu nebo utracení zvířat trpících chronickým a přetrvávajícím onemocněním.

Adhezivní molekula *S. uberis* (SUAM) s afinitou k bovinnímu laktoferinu hraje určitou roli v adherenci *S. uberis* k buňkám epitelu mléčné žlázy skotu. Schopnost adherovat k povrchu hostitelské buňky je považována za důležitou strategii virulence u mnoha patogenů mléčné žlázy, proto má molekula SUAM potenciál pro vývoj vakcín. Existují studie, kde protilátky proti proteinu SUAM, nebo proti jeho N-koncovému peptidu, inhibovaly adherenci *S. uberis* a bránily tak internalizaci bakterie do epiteliálních buněk mléčné žlázy skotu (Almeida et al. 2006, Prado et al. 2010).

Slepice mají mimo jiné schopnost tvořit protilátky, produkované ve vaječných žloutcích, a to dokonce ve větším množství, než kolik dokáže vyprodukovat savec v určitém časovém rozmezí. Zároveň jsou části molekul ptačích imunoglobulinů natolik odlišné od savčích, že nedochází k aktivaci komponent imunitního systému a jejich účinnost je dána pouze vznikem fyzikální (sterické) zábrany, jež blokuje funkci rozpoznávané molekuly vazbou.

2. Cíl

Připravit rekombinantní protein SUAM (jeho N-koncovou část) s potenciálem získat specifické protilátky izotypu IgY imunizací slepic.

3. Příprava rekombinantního proteinu SUAM

3.1 Kultivační média

LB médium [g/L]

Objem	1000 ml	500 ml	100 ml
Tryptone	10	5	1
Yeast extract	5	2,5	0,5
NaCl	10	5	1
Glucose	1	0,5	0,1

Ztužené LB médium [g/L]

Objem	1000 ml	500 ml	100 ml
Tryptone	10	5	1
Yeast extract	5	2,5	0,5
NaCl	10	5	1
Agar	30	15	3
Glucose	1	0,5	0,1

3.2 Pufry

Desintegrační pufr pH 7,5

	[Da]	[mM]	[g/L]
Tris HCl	121,14	100	12,1
NaCl	58,44	300	17,53
Triton-X-100			1
Imidazol	68,07	10 mM	0,68
β-merkapt ethanol			0,1

Nanášecí pufr pH 7,5

	[Da]	[mM]	[g/L]
Tris HCl	121,14	100	12,1
NaCl	58,44	500	29,22
Imidazol	68,07	10 mM	0,68
β-merkapt ethanol			0,1

Eluční pufr pH 7,5

	[Da]	[mM]	[g/L]
Tris HCl	121,14	100	12,1
NaCl	58,44	500	29,22
Imidazol	68,07	300	20,42
β-merkapt ethanol			0,1

Dialyzační pufr pH 7,5

	[Da]	[mM]	[g/L]
Tris HCl	121,14	100	12,1
NaCl	58,44	300	17,53
β-merkapt ethanol			0,1

3.3 Klonování

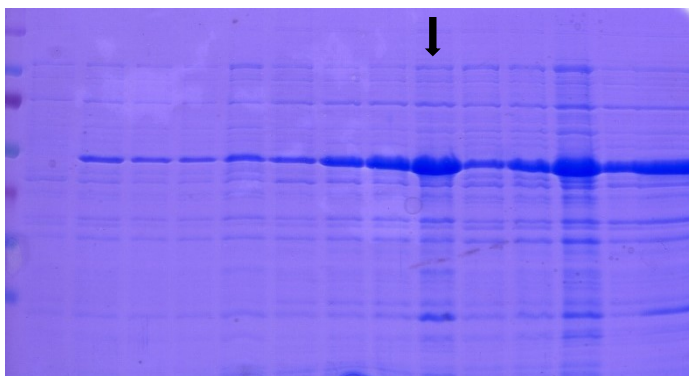
N-terminální část proteinu byla naklonována do expresního vektoru pUbEx15. K amplifikaci N-terminálního úseku genu SUAM z genomové DNA bakterie *S. uberis* (kmen 94) byla použita metoda PCR za použití primeru forward 5'-ATATCCATGGTTATGACAACCTGCTGATCAATCACC-3' a reverse 5'-ATATGCGGCCGCTTATGGAGCAACCATTTTATTAGCACC-3'. Amplifikovaný DNA produkt byl purifikován za použití kitu (E.Z.N.A.® MicroElute® Cycle Pure Kit) podle návodu výrobce. Tento gen dále posloužil jako inzert v následném klonování do expresního vektoru pUbEx15 pomocí restrikčních enzymů NcoI a NotI. Rekombinantní DNA byla transformována do buněk DH10β, transformované buňky byly vysety na misky s LB agarem obsahující kanamycin (50 µg/ml). Z jednotlivých kolonií byla izolována plasmidová DNA (E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I) a pro potvrzení správného klonování byly vybrané vzorky sekvenovány.

Sekvence naklonované N-terminální části proteinu SUAM:

MTTADQSPKLRGEEATLAPTNIEDTKAAIDTKTATLAEQTDALNTVNETITSTNEELVTLEG
GLADKETAVADA EKTLESVSNASEEEFNQLAEQNKADLAKTQEELKLAEATKEEVATQVLTQ
SDEVTAANEAKKMAEKVAQAETKVS DLT K MVNQPEAITAQVEIEQNNVKI I SEDLAKAKTD
LVAVTDNTKTQLANDLATAQSSLSAKQNELAKVQSQTSNVAVNVMGANKMVAP

3.4 Expresa v LB médiu, purifikace

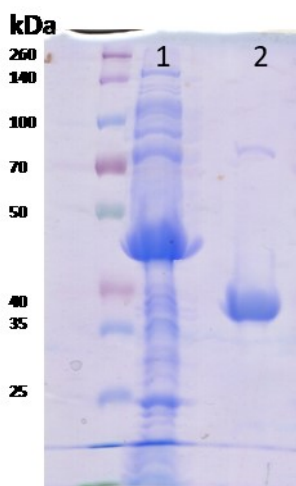
Plasmidová DNA byla transformována do expresních buněk *E. coli* kmen BL21(DE3). Expresa SUAMu byla indukována 0,4 mM isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG) při optické denzitě (OD₆₀₀) 0,6. Indukované bakteriální buňky byly poté inkubovány dalších 16 hod při 25 °C a 200 ot./min. Následně byly buňky stočeny (4000 ot./min. 10 min, 4 °C), dezintegrovány a purifikovány.



Obr. 1: SDS-PAGE gel. Expresa proteinu N-SUAM. Šipka označuje expresi po 16 hodinách od začátku indukce (OD 0,6) při 25 °C.

Pelet byl rozpuštěn v dezintegračním pufru a sonikován (SonoPlus, Bandelin) po dobu 30 minut (1s puls, 4s pauza, amplituda 30). Sonikovaná suspenze byla centrifugována při 15000 g po dobu 1 hodiny. K purifikaci byl využit přístroj pro proteinovou kapalinovou chromatografii (AZURA® BIO PURIFICATION) a 5 ml Ni-NTA kolona (GE Health Care). Kolona byla nejprve ekvilibrována 25 ml ekvilibračního pufru. Po nanesení vzorku byla kolona promyta ekvilibračním pufrům dokud absorbance neklesla na úroveň pozadí. Následně byla kolona proplachována 25 ml směsí pufru o finální koncentraci imidazolu cca 40 mM, tzv. WASH (10 % elučního pufru, 90 % ekvilibračního pufru). Cílový protein byl uvolněn elučním pufrům. Po ukončení purifikace byl vzorek převeden do dialyzačního pufru s využitím kolony HiPrep 26/10 Desalting GE Health Care. U dialyzovaného SUAMu byla určena proteinová koncentrace (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Roztok proteinu byl doplněn glycerolem na výslednou koncentraci 20 % a smíchan v hmotnostním poměru 1:30 s TEV proteázou za účelem

odštěpení fúzaného ubiquitinu. Po 2,5hodinové inkubaci při pokojové teplotě byl odstraněn ubiquitin s afinitní kotvou reversní chromatografií na 5 ml Ni-NTA niklové koloně. Kontaminující leader peptid byl zachycen a cílový protein SUAM volně protekl kolonou. Následně byl SUAM dialyzován (HiPrep 26/10 Desalting GE Health Care) do PBS pufru a zamražen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jeho čistota byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

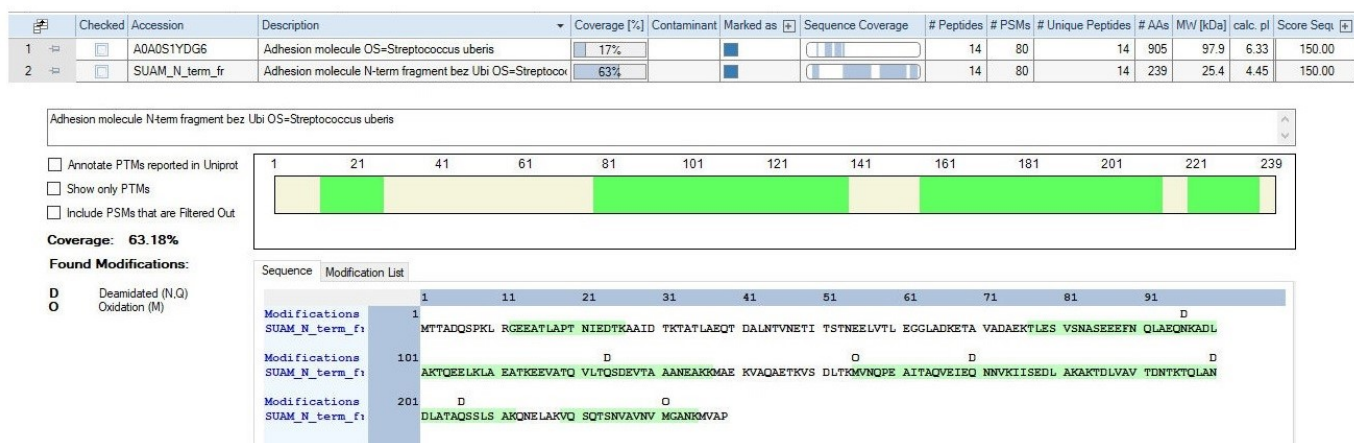


Obr. 2: SDS-PAGE gel. Gel znázorňuje přečištěný protein.

1 – celkový obsah proteinů před přečištěním; 2 – purifikovaný N-SUAM po štěpení TEV proteázou a odsolení do PBS

3.5 Identifikace proteinu pomocí LC-MS/MS z SDS-PAGE gelu

Identita a sekvence proteinu SUAM byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie. Z SDS-PAGE gelu byl vyříznut band v oblasti mezi 35 – 40 kDa (viz obr. 2, vzorek 2), odbarven inkubací ve směsi 50 % acetonitrilu a 50 mM TEAB pufru (triethylammonium bicarbonate, Thermo Scientific) a připraven pro MS analýzu metodou in-gel digesce. Proteiny v gelu byly redukovány pomocí 10 mM DTT (dithiothreitol, Sigma-Aldrich) a alkylovány pomocí 50 mM IAA (iodacetamid, Serva). Poté byly štěpeny trypsinem v 50 mM TEAB pufru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 hodiny, poté přes noc při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl po stočení odebrán a evaporován na vakuové odparce (Eppendorf Vacufuge plus). Peleta naštěpených peptidů byla poté rozpuštěna v mobilní fázi uHPLC (Ultimate 3000 RSCLnano, Thermo Scientific). Peptidy byly separovány na C18 koloně a hmotnostní spektra měřena pomocí přístroje Q Exactive Orbitrap (Thermo Scientific). Vyhodnocení spekter a identifikace proteinů bylo provedeno pomocí softwaru Proteome Discoverer v2.4 (Thermo Scientific).



Obr.3: Identifikace proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie a pokrytí aminokyselinové sekvence identifikovanými peptidy

Pomocí LC-MS/MS a Uniprot databáze pro *Streptococcus uberis* byla ověřena přítomnost Adhesion molecule (Accession number A0A0S1YDG6), podle aminokyselinové sekvence se jedná o N-terminální fragment tohoto proteinu. Předpokládaná sekvence byla do proteinové databáze vložena pod Accession number „SUAM_N_term_fr“ a pokrytí sekvence identifikovanými peptidy pro tuto sekvenci je 63 % (14 peptidů), jak znázorňuje obr. 3.

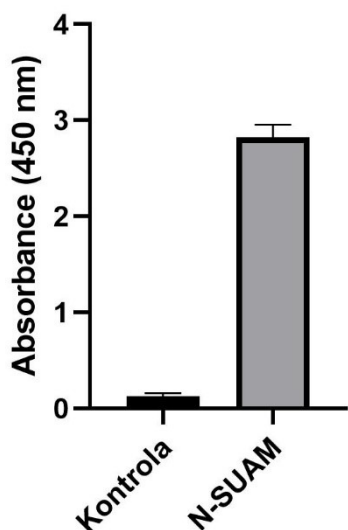
4. Imunizace

Roztok SUAM o koncentraci 1 mg/ml byl v poměru 1:1 důkladně promísen až do vytvoření homogenní emulze s Freundovým kompletním adjuvans (Freund's Adjuvant, Complete, Sigma Aldrich) pro primovakcinaci a s Freundovým inkompletním adjuvans (Freund's Adjuvant, Incomplete, Sigma Aldrich) pro revakcinaci. Vakcinační dávka byla každému zvířeti podána intramuskulárně do prsního svalu v celkovém objemu 0,5 ml. Revakcinace proběhla 3 týdny po primovakcinaci a následně byla opakována vždy 1x měsíčně.

5. Detekce protilátek proti SUAM v séru slepic metodou ELISA

ELISA test byl připraven potažením jamek mikrotitrační desky Maxisorp (Nunc, Dánsko) rekombinantním antigenem SUAM v pracovním ředění 1 µg/ml v karbonát-bikarbonátovém pufru (0,05 M, pH 9,6) v objemu 100 µl na jamku (inkubace přes noc, 4 °C). Následně byly desky 5x promyty PBS s obsahem 0,05 % Tween 20 (PBS-T, pH 7,2). Do jamek bylo napipetováno 200 µl roztoku obsahujícího 0,5% kaseinového hydrolyzátu a 10% sacharózy. Poté se deska inkubovala při pokojové teplotě 5 minut, následně byl její obsah odstraněn odsátím a vysušen 30 min při teplotě 37°C. Vyšetřované vzorky sér byly ředěny 100x v PBS-

T s přidavkem 0,5% kaseinového hydrolyzátu a v objemu 100 μ l byly aplikovány do jamek mikrotitrační desky a testovány vždy v duplikátech. Inkubace probíhala 60 minut při pokojové teplotě. Jamky byly opět 5x promyty roztokem PBS a 0,05% Tween 20. Poté byla do jamek přidána 30 000x ředěná sekundární protilátka konjugovaná křenovou peroxidázou (Anti-Chicken IgY (IgG) (whole molecule)–Peroxidase antibody, produced in rabbit (Sigma-Aldrich)) v objemu 100 μ l na jamku v ředícím roztoku (PBS, 0,5% Tween a 0,5% kaseinový hydrolyzáte). Inkubace probíhala při pokojové teplotě 30 minut. Po inkubaci byly jamky opět 5 \times promyty promývacím roztokem. Následně byl do jamek aplikován substrát s chromogenem TMB complete (Test-line, Česká republika) v objemu 100 μ l do každé jamky, který se nechal působit po dobu 10 minut. Pro zastavení reakce byla přidána 1M H₂SO₄ v objemu 50 μ l do každé jamky. Absorbance byla měřena při 450 nm pomocí multikanálového spektrofotometru Synergy H1 (BioTek, USA).



Graf 1: Srovnání naměřených hodnot absorbancí metodou ELISA.

Pomocí metody ELISA byla testována reaktivita sér imunizovaných slepic s proteinem SUAM (exprimovaný v *E. coli* buňkách), kde byla prokázána schopnost protilátek se vázat na antigen s vysokou afinitou. U všech sér imunizovaných slepic (N-SUAM) byla prokázána pozitivita na kvalitativní úrovni oproti vzorkům získaných z neimunizovaných slepic (Kontrola). Byla tím prokázána imunogenita připraveného rekombinantního proteinu SUAM, tedy schopnost indukovat produkci specifických IgY protilátek u slepic po imunizaci.

6. Srovnání novosti postupů

Aplikace lokálních nebo celkových antibiotik je první volbou při terapii mastitid, k léčbě je doporučováno zejména použití penicilinů. V poslední době byl zaznamenaný viditelný pokles citlivosti izolátů *S. uberis* k penicilinu, ale i jiným antimikrobiálním látkám. Vzhledem k výskytu kmenů s multirezistencí k antibiotikům vzrůstá potřeba výzkumu zaměřeného na testování možných alternativ k antibiotické léčbě, které by se mohly stát součástí běžné veterinární praxe. Hledání alternativních přípravků k léčbě i prevenci zánětů mléčné žlázy dojného skotu je v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 o veterinárních léčivých přípravcích, které mimo jiné přináší významné restriktce pro preventivní použití antimikrobiálních látek. Na trhu není dostupný přípravek na bázi IgY s potenciálem snížit adhezenci *S. uberis* k epitelialním buňkám mléčné žlázy skotu.

7. Uplatnění funkčního vzorku

Předkládané řešení poskytuje potenciálně účinnou složku v podobě IgY protilátek vhodnou pro léčebný či preventivní přípravek, který je alternativou k antibiotické léčbě mastitid dojného skotu.

8. Ekonomické aspekty

Metoda přípravy rekombinantního proteinu SUAM je na pracovišti autorů zavedena a připravena k použití. Je plně využitelná k přípravě specifických IgY protilátek imunizací slepic. Případné další komerční využití záleží na poptávce potenciálních zákazníků. V současné době nelze ekonomické aspekty odhadnout.

9. Seznam použité literatury

Almeida RA, Luther DA, Park HM, Oliver SP. Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). *Vet Microbiol.* 2006 Jun 15;115(1-3):183-91. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.02.005.

Prado ME, Almeida RA, Ozen C, Luther DA, Lewis MJ, Headrick SJ, Oliver SP. Vaccination of dairy cows with recombinant *Streptococcus uberis* adhesion molecule induces antibodies that reduce adherence to and internalization of *S. uberis* into bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011 Jun 15;141(3-4):201-8. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.02.023.

10. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu s názvem „Veterinární léčebný přípravek na bázi obohacení protilátkami IgY“, registrační číslo CZ.01.1.02/0.0/0.0/20_321/0024962, který

je spolufinancován Ministerstvem průmyslu a obchodu jako řídicí orgán Operačního programu
Podnikání a inovace pro konkurenceschopnost.

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz