



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA SARDEGNA "G. Pegreffi"**

DIPARTIMENTO *PRODUZIONI*
LABORATORIO di **RICERCAe SVILUPPO**

Ricerca Corrente IZS SA 06/01: Relazione finale

*“Produzione di proteine ricombinanti di *Mycoplasma agalactiae*
a scopo vaccinale”*

Responsabile: Dott.ssa Sebastiana Tola

Premessa

Il *Mycoplasma agalactiae* è l'agente responsabile dell'agalassia contagiosa nei piccoli ruminanti, patologia che oramai da circa 5 lustri rappresenta un grave problema per l'allevamento ovino e caprino sardo. Tale problema è ingigantito soprattutto dal fatto che la economia zootecnica ruota intorno alla produzione lattea.

L'emergenza agalassia è stata affrontata dai servizi veterinari e dal sistema sanitario nel suo complesso con risultati alterni. Il problema principale è che tutte le contromisure adottate non hanno bloccato la diffusione della malattia, sia nelle fasi iniziali dell'emergenza sia tuttora, dove la malattia si presenta in maniera intermittente o assumendo caratteri di vera e propria epidemia in alcune aree a forte densità ovinicola. La rapida diffusione della malattia trova spiegazione in una serie di fattori: 1) l'elevata densità dei capi per km²; 2) le caratteristiche degli allevamenti sardi, con aziende quasi sempre frammentate in diversi appezzamenti che impongono lo spostamento degli animali durante le fasi del ciclo produttivo annuale per ottimizzare la disponibilità foraggera dei pascoli; 3) l'abitudine di prestare animali, in modo particolare i maschi da rimonta e infine 4) lo spostamento degli addetti alla mungitura da un allevamento all'altro (Contini et al., 1988, Leori et al., 1998).

Il momento tipico del contagio è appunto la mungitura quando l'operatore, imbrattandosi le mani con i soggetti malati o asintomatici ma eliminatori, trasmette la malattia ai soggetti ancora sani. Tale meccanismo non è scongiurato, anzi addirittura aggravato dalla mungitura meccanica, pratica oramai introdotta nella quasi totalità delle aziende sarde: le tettarelle

sporche con latte infetto possono veicolare l'agente eziologico ai soggetti sani. Da una fase iniziale di gestione dell'emergenza si è passati a approfondire lo studio riguardante il genoma e il proteoma del batterio. Alcuni risultati ottenuti si sono rivelati utili da una parte per lo sviluppo di sistemi diagnostici biotecnologici (Tola et al., 1994; 1996;1997) e, dall'altra, per la produzione di vaccini da utilizzare nella profilassi immunitaria (Tola et al., 1999). In modo particolare , è stato importante rilevare che nelle regioni a ovinicoltura , circola un solo ceppo di *Mycoplasma agalactiae* (Tola et al., 1996). Dallo studio delle proteine di membrana e dei sieri provenienti da pecore infette naturalmente da 1 , 15 e 30 giorni dalla manifestazione clinica della malattia, si è evidenziato che le proteine P80 e P55 kDa sono immunodominanti e presenti nella quasi totalità dei ceppi isolati da focolai di agalassia contagiosa (Tola et al., 1997).

Pertanto lo scopo di questa ricerca è stato quello di produrre le proteine ricombinanti a partire dai geni codificanti le P80 e P55 e di utilizzarle a scopo vaccinale.

Materiale e metodi

Ceppi e condizioni colturali

I ceppi di *M. agalactiae* sono stati isolati da campioni di latte provenienti da diversi focolai di agalassia contagiosa della Sardegna (NU-658, NU-2697, SS-440 e OR-352). I ceppi sono stati clonati e identificati mediante PCR (Tola et al., 1996).

I ceppi di *M. agalactiae* sono stati seminati in 1000 ml di brodo di Hayflick modificato contenente 2mg/ml di rosso fenolo e 8% di siero equino e fatto

crescere a 37 °C fino alla fase logaritmica di crescita. Il numero delle cellule vitali è stato determinato dall'ultima diluizione positiva in una coltura liquida seriale, in accordo con il metodo standard di Rodwell e Whitcomb (1983). I micoplasmi sono stati pellettati a 12,000 rpm per 30 min, lavati 2 volte con phosphate buffer saline (PBS, 0.1 M phosphate, 0.33 M NaCl, pH 7.4) e infine risospesi nei corrispettivi originali volumi. La concentrazione delle proteine totali delle sospensioni lavate è stata determinata utilizzando il Kit DC protein assay reagent (Bio-Rad, Richmond, CA) secondo il protocollo della casa produttrice. La sospensione contenente il pool di micoplasmi (costituita da 10^{10} CCU/ml) è stata aliquotata e conservata a -20°C .

SDS-PAGE

La separazione delle proteine totali del pool di micoplasmi è stata effettuata mediante corsa elettroforetica in SDS-PAGE.

L'SDS-PAGE è stato effettuato secondo la metodica descritta da Laemmli (1970). Le corse elettroforetiche sono state eseguite utilizzando l'apparecchio Mini Protean II Cell (Bio-Rad). I gels sono stati preparati in modo da avere un "separating gel" ad una concentrazione finale di acrylamide/bisacrylamide (Bio-Rad, 37.5: 1) al 12% e uno "stacking gel" al 4%. 20 µg di proteine, provenienti dai ceppi di micoplasmi (Nu-658, Nu-2697, SS-440 e OR-352) sono stati solubilizzati in 20 µl di loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerolo e 0.01% Bromophenol Blue), bolliti per 5 min e raffreddati a 20 °C.

I campioni sono stati fatti correre in un Vertical Stab Gel Apparatus (Bio-Rad) contenente 800 ml di running buffer (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS; pH 8.3) a 200 Volts per 1 ora. La mobilità elettroforetica delle proteine dei campioni è stata valutata in relazione alla mobilità elettroforetica degli standards molecolari utilizzati, costituiti da una miscela di proteine con peso molecolare compreso tra 14.4 e 97.4 kDa (Promega). Le proteine, dopo la corsa elettroforetica, sono state colorate con una soluzione allo 0.25% di Blue Comassie R 250 (Sigma) in 25% di isopropanolo (Sigma) e 10% di acido acetico (Carlo Erba) o processate per l'immunoblotting.

Purificazione e concentrazione delle lipoproteine di membrana.

Le bande proteiche corrispondenti alle proteine P80 e P55 sono state tagliate dal gel di SDS-PAGE in seguito ad una corsa elettroforetica di proteine totali di *M. agalactiae*. Le singole proteine sono state elettroeluite e concentrate utilizzando i Microcon 30 (Amicon) secondo le istruzioni della casa produttrice (Figura 1).

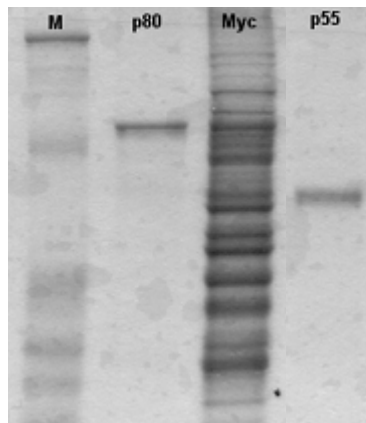


Figura 1- Corsa elettroforetica in SDS-PAGE delle proteine P80 E P55 di *Mycoplasma agalactiae* purificate e concentrate. M, marker caleidoscopico (Bio-Rad), Linea 1, proteina p80; linea 2, Micoplasmi totali; Linea 3, proteina p55.

Produzione di anticorpi contro le proteine P80 e P55.

Per la produzione degli antisieri specifici contro le proteine purificate P80 e P55, abbiamo utilizzato 2 agnelli di razza *sarda* di età compresa tra i 30 e i 40 giorni. Gli agnelli sono stati sottoposti a visita clinica preliminare per escludere patologie in atto o pregresse mentre per escludere qualsiasi contatto con micoplasmi abbiamo analizzato campioni di siero mediante immunoblotting. Prima di iniziare il protocollo di immunizzazione, ciascun animale è stato sottoposto a trattamento antiparassitario e ad un periodo di acclimatemento di 15 giorni. Durante le fase di acclimatemento e immunizzazione gli agnelli sono stati tabulati presso i paddocks della Facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari.

Protocollo di immunizzazione

Il protocollo di immunizzazione è stato così articolato:

- un inoculo sottocute di 0.2 ml di antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con adiuvante completo di Freund);
- un inoculo sottocute, dopo tre settimane, di 0.2 ml di antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con adiuvante incompleto di Freund);
- un inoculo sottocute, dopo una settimana, di 0.2 ml di antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con adiuvante incompleto di Freund);
- un inoculo intramuscolo, dopo otto giorni, di 0.2 ml di antigene (solo proteina purificata).

Dopo una settimana dall'ultimo inoculo si è proceduto a salassare gli agnelli (30 ml da ciascun agnello). Il sangue è stato sierato ed il siero stoccato a -20°C.

I sieri sono stati testati mediante immunoblotting.

Immunoblotting

I gels, dopo la corsa elettroforetica, sono stati tenuti per 15 min in 300 ml di transfer buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanolo) e successivamente le proteine trasferite su membrane di nitrocellulosa da 0.45 µm (Sigma) mediante un SemiDry Apparatus (Bio-Rad) a 15 Volts per 1 ora. Ogni membrana di nitrocellulosa è stata tagliata

in corrispondenza della "lane" del marker e la striscia colorata con 0.5% amido nero (Sigma) in 45% di metanolo (Carlo Erba) e 10% di acido acetico e decolorata con 10% di acido acetico e 45% di metanolo. Le restanti porzioni di nitrocellulosa sono state incubate per 30 min a temperatura ambiente (t.a.) in PBS pH 7.4 contenente 2% di skim milk (Difco, Detroit, USA).

Le nitrocellulose sono stata poi messe ad incubare a 37 °C per 1 ora con i sieri iperimmuni anti-P80 e anti-P55 prodotti in agnello e diluiti 1:1500 in PBS-2% skim milk. Dopo 4 lavaggi di 10 min ciascuno con PBS-2% skim milk a t.a. ed in leggera agitazione, le membrane sono state incubate a 37 °C per 1 ora con immunoglobuline anti IgG di pecora coniugate con fosfatasi (Sigma) diluite in PBS-2% skim milk. Dopo 4 ulteriori lavaggi di 10 min ciascuno in PBS-2% skim milk, le membrane sono state messe a contatto con il buffer di sviluppo della fosfatasi (100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100 mM Tris (pH 9.5) contenente bromochloroindolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT, Promega, Madison, WI). Dopo lo sviluppo del colore, le nitrocellulose sono state lavate con H₂O distillata e asciugate all'aria (Figura 2)

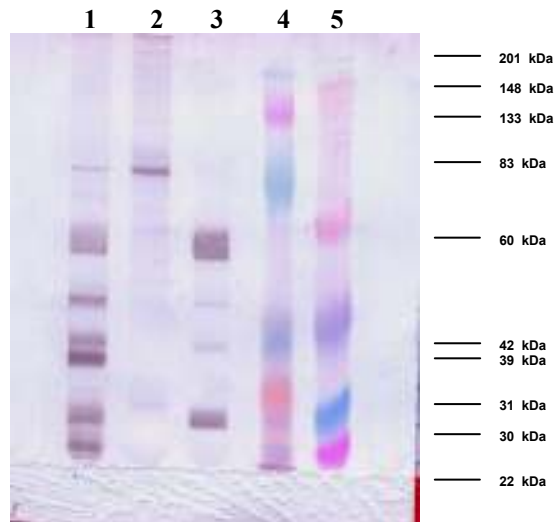


Figura 2- Immunoblotting. Le proteine totali di *Mycoplasma agalactiae* dopo la corsa elettroforetica in SDS-PAGE, sono state trasferite su nitrocellulosa e successivamente testate con gli antisieri anti-P80 (linea 2) e anti-P55 (linea 3) prodotti in agnello. Linea 1, corrisponde al pool di micoplasmi testati con un siero proveniente da una pecora infetta naturalmente; linee 4 e 5, differenti markers caleidoscopici.

Analisi schematica del gene P80 e P55

Il gene della P80 è stato registrato in banca dati (GenBank) sotto il numero di accesso X95628 ed è schematizzato nella Figura 4.

Il gene della P55 è stato registrato in banca dati sotto il numero di accesso AF248865 ed è siglato con *VpmaU*. L'Open Reading Frame (ORF) è schematizzato nella Figura 5.

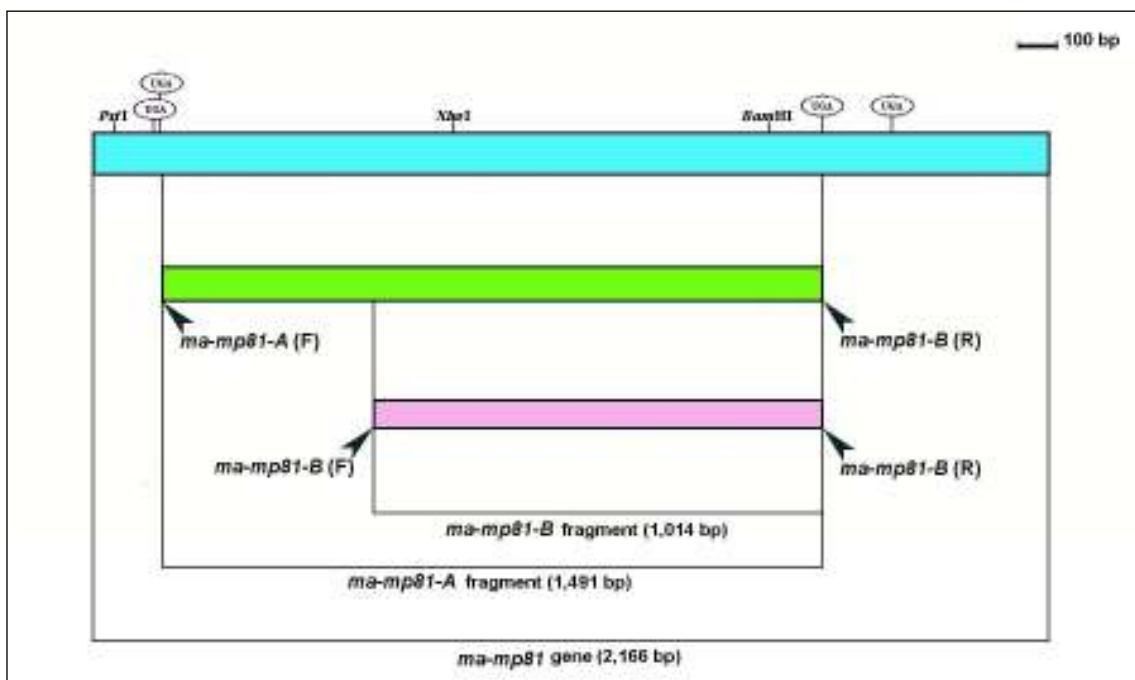


Figura 4- Rappresentazione schematica del gene della proteina P80 e di due frammenti da 1491 e 1041 privi di TGA (codone che in *E.coli* codifica per lo stop mentre nei micoplasmi per il triptofano).

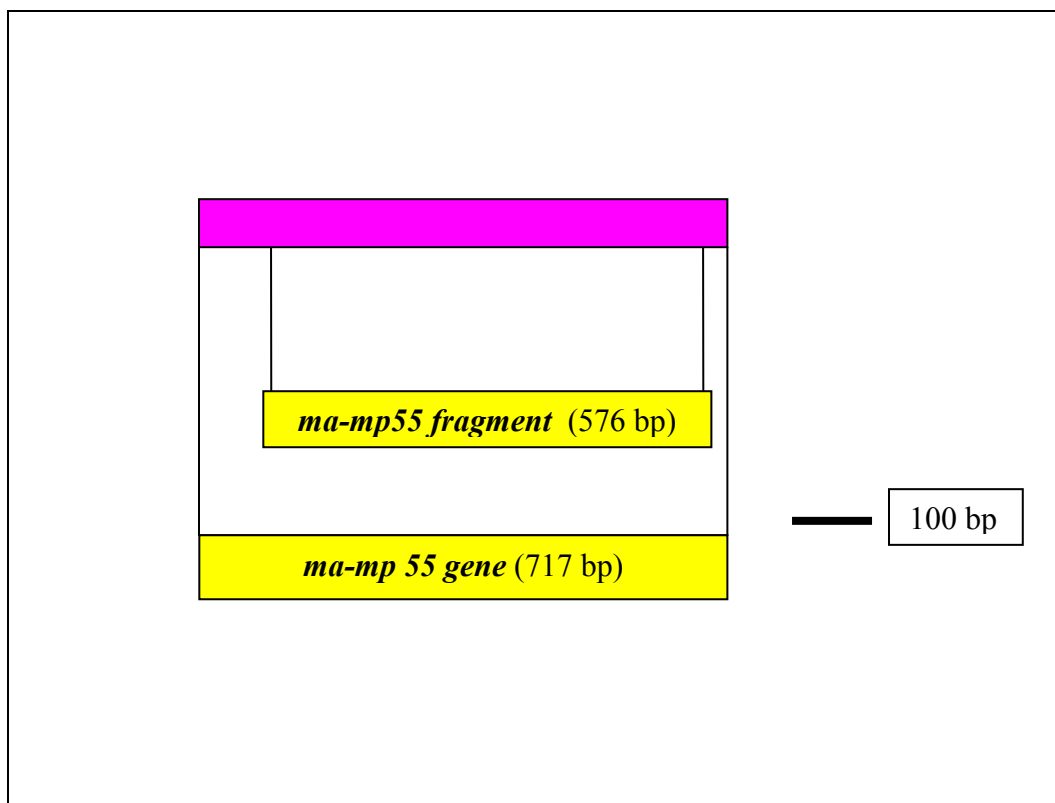


Figura 5- Rappresentazione schematica del gene della proteina P55 (717 bp) e del frammento da 576 bp utilizzato in questa ricerca.

Clonaggio ed espressione della P80 e P55 in cellule procariotiche mediante il vettore pQE-30 (Qiagen)

A partire dall'analisi delle sequenze nucleotidiche registrate in banca-dati abbiamo selezionato delle porzioni geniche prive di TGA. Il codone TGA (UGA negli mRNA) nei micoplasmi codifica per il triptofano mentre negli *E. coli* (microrganismi da noi utilizzati per produrre proteine ricombinanti) è un codon-stop (Yamao et al., 1985; Inamine et al.,1990) . L'Open Reading Frame (ORF) e la direzionalità dei geni è stata mantenuta utilizzando per la reazione di amplificazione primers modificati contenenti i siti di restrizione *HindIII* e *KpnI* non presenti nella sequenza originale. Una porzione da 1041 bp del gene della P80 e una da 576 bp del gene della P55 sono state clonate all'interno del vettore di espressione pQE-30 (Qiagen), modificando la sequenza iniziale e finale del gene in modo da inserire due siti di restrizione compatibili con il plasmide (i siti di restrizione inseriti sono stati *HindIII* e *KpnI*).

Gli amplificati da 1041 e 576 bp ottenuti sono stati prima purificati con il Kit CONCERT Gel Extraction System della GIBCO e poi digeriti con gli enzimi *HindIII* e *KpnI*.

Contemporaneamente si è digerito il plasmide con gli stessi enzimi. Dopo una valutazione quantitativa della “*ratio*” tra l’inserto e il vettore si è proceduto con l’aggiunta di un μl di T4-Ligase (Roche) a temperatura ambiente per 10 min.

Un’aliquota di 10 μl di trasformazione è stato inserita in *Escherichia coli* DH5 α competenti (Invitrogen), contenenti il plasmide modulatore a basso numero di copie denominato pREP4.

Le colonie positive sono state selezionate su piastre di Luria agar contenenti ampicillina (50 $\mu\text{g/ml}$) e kanamicina (12.5 $\mu\text{g/ml}$). Tra tutte le colonie positive sono state selezionate 4 colonie per ciascun frammento per le quali si è proceduto all'induzione.

Ogni colonia è stata fatta crescere per 18 ore (o/n) in Luria Broth (LB) contenente gli antibiotici ampicillina e kanamicina. Il giorno successivo si è proceduto al rilancio in 50 ml di brodo LB senza antibiotici fino alla fase logaritmica di crescita di 0.45 O.D.; stimata allo spettrofotometro alla lunghezza d’onda di 600 nm.

Raggiunta tale fase di crescita, sono state prese tre aliquote di 5 ml nelle quali si sono aggiunti 10 μl di IPTG 1M. Le colture sono state ulteriormente incubate a 37°C rispettivamente per 60', 120' e 180'.

Ultimata la fase di induzione, le colture batteriche sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min a 4°C e risospese in 314 µl di PBS pH 7.2.

Un' aliquota di 6 µl è stata fatta bollire per 5 min in loading buffer (2% SDS, 5% 2-β-mercaptoetanololo, 10% glicerolo, 62.5 mM Tris), fatta correre in un gel di polyacrilamide al 12 % ed infine analizzata mediante immunoblotting (Figura 6 mostra il clone 28 contenente un frammento genico della P80 mentre la Figura 7 mostra il clone 47 contenente un frammento genico della P55).

A

B

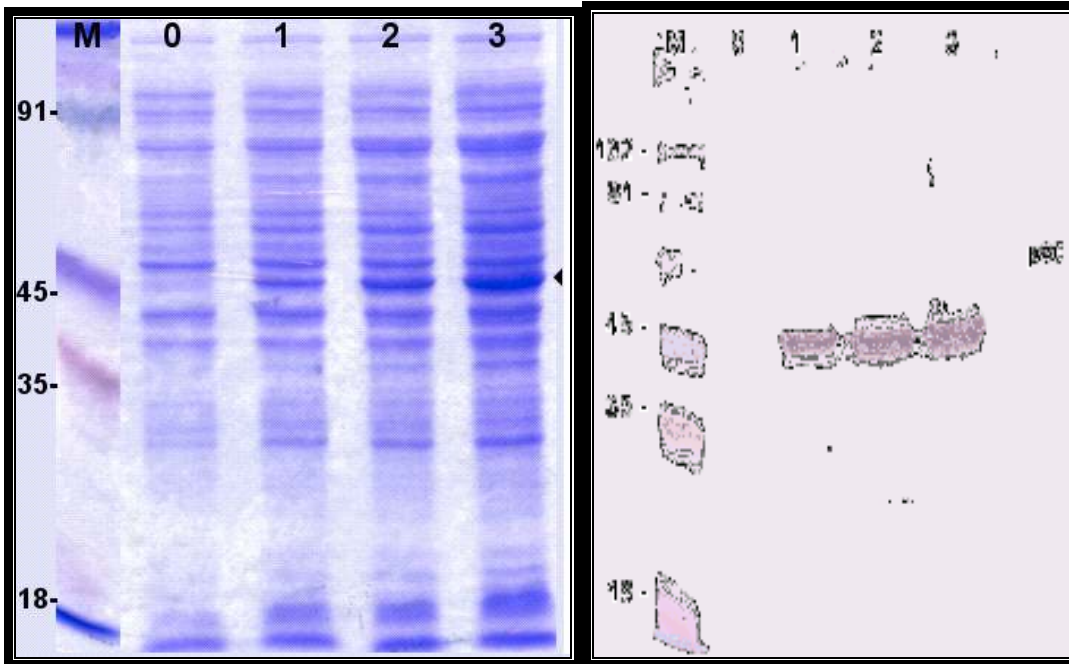


Figura 6-

Pannello A) SDS-PAGE al 12% del clone 28 contenente l'inserto da 1041 bp della P80, indotto con IPTG. M, marker caleidoscopico (Bio-Rad), (0), clone 28 non indotto, (1), clone 28 dopo 60 min d'induzione, (2), clone 28 dopo 120 min d'induzione, (3), clone 28 dopo 180 min d'induzione. La freccia indica la proteina di *Mycoplasma agalactiae* indotta.

Pannello B) Immunoblotting dei campioni descritti in Pannello A con il siero anti-P80 prodotto in agnello

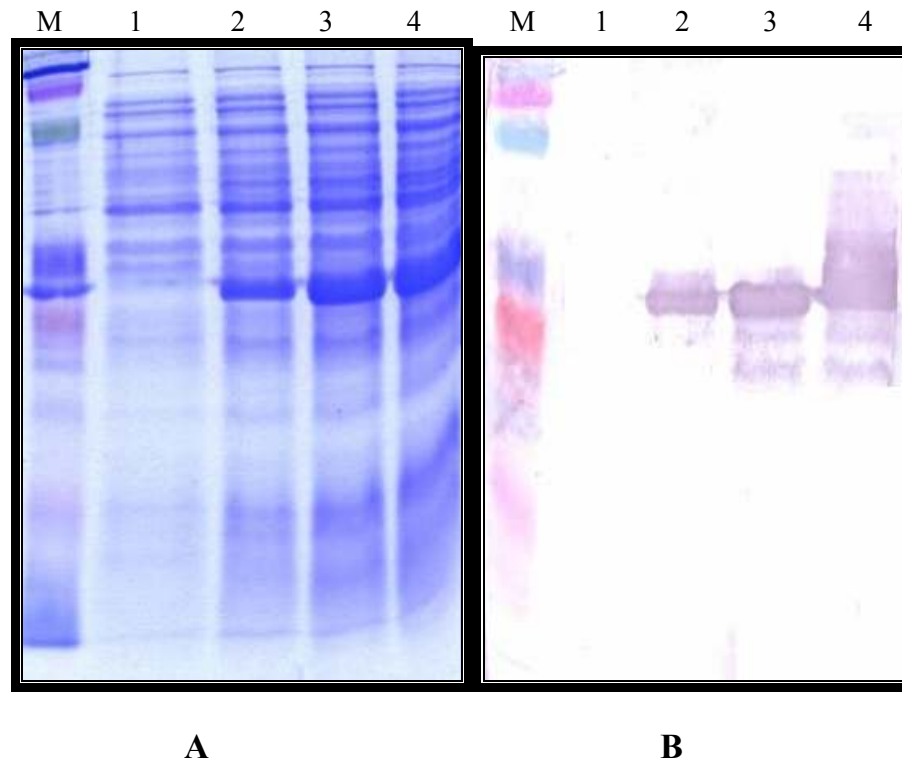


Figura 7-
 Pannello A) SDS-PAGE al 12% del clone 47 contenente l' inserto da 576 bp della P55, indotto con IPTG. M, marker caleidoscopico (Bio-Rad), (0), clone 47 non indotto, (1), clone 47 dopo 60 min d'induzione, (2), clone 47 dopo 120 min d'induzione, (3), clone 47 dopo 180 min d'induzione. Pannello B) Immunoblotting dei campioni descritti in Pannello A con il siero anti-P55 prodotto in agnello

Purificazione e identificazione delle proteine espresse

I cloni 28 e 47 (contenenti rispettivamente il frammento da 1041 bp e da 576 bp di *M. agalactiae*) sono stati messi a crescere in 100 ml di LB overnight (o/n) con 2mM di IPTG.

Le brodoculture sono state poi centrifugata a 5000 rpm per 15 min ed il pellet risospeso in 1ml di lysis buffer B (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl; pH 8.0). Questa soluzione è stata incubata per 1 h a temperatura ambiente in leggera agitazione. Subito dopo è stata centrifugata a 12.000 rpm e il surnatante è stato passato attraverso colonne di affinità al nickel (Ni-NTA Spin, Qiagen).

Le proteina di fusione con le 6 istidine così estratte, sono state poi saggate con i siero anti-P80 e anti-P55 prodotti in agnello. La concentrazione delle proteine ricombinanti è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica a 750 nm con l'utilizzo del Kit DC-protein assay della Bio-Rad.

M 1 2 3 4 5 6

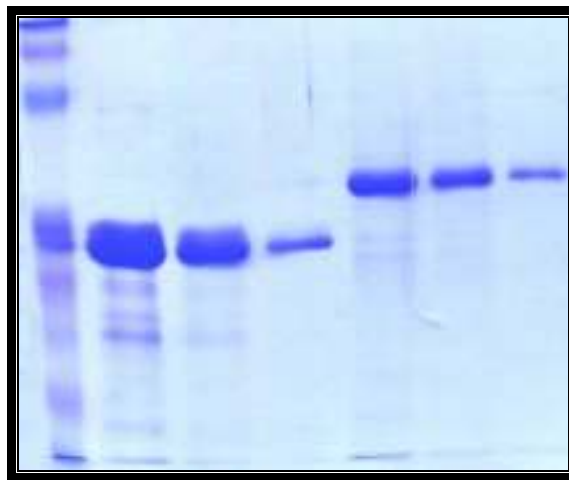


Figura 8-

Corsa elettroforetica su SDS-PAGE al 12% delle proteine ricombinanti concentrate corrispondenti al clone 47 (linee 1, 2 e 3) e al clone 28 (linee 4, 5 e 6). M, marker caleidoscopico.

Valutazione della caratteristiche antigeniche delle proteine ricombinanti

Otto pecore di razza *sarda* in lattazione (sei per la vaccinazione e due per i controlli) e di circa 4 anni d'età appartenenti al gregge della Clinica Ostetrica della Facoltà di Veterinaria di Sassari sono state messe a nostra disposizione per valutare la risposta anticorpale in seguito alla somministrazione di proteine ricombinanti. Prima di iniziare il protocollo vaccinale, le pecore sono state sottoposte a visita clinica preliminare per escludere patologie in atto o pregresse, soprattutto quelle a carico dell'apparato mammario.

Per escludere qualsiasi contatto con micoplasmi, abbiamo analizzato campioni di latte, provenienti dalle mammelle destra e sinistra di ciascuna pecora, e campioni di siero. I campioni di latte sono stati analizzati mediante PCR mentre i sieri mediante immunoblotting, come descritto prima.

Tre pecore sono state vaccinate con la proteina ricombinante derivata dal clone 28 e tre con quella derivata dal clone 47.

Il protocollo vaccinale utilizzato è stato il seguente:

- un inoculo sottocute di 50 μ g di ciascuna r-proteina diluita in acqua fino a 500 μ l e adiuvata con 500 μ l di Montanide ISA 50 (ISA = Incomplete Seppic Adjuvant)
- un secondo inoculo sottocute, a distanza di un mese, della stessa quantità di proteina adiuvata sempre con Montanide ISA 50
- un terzo inoculo sottocute, a distanza di un altro mese, sempre della stessa quantità di proteina adiuvata con Montanide ISA 50.

Durante ogni somministrazione sono stati prelevati 10 ml di sangue con e senza EDTA. Il siero è servito per analizzare l'andamento anticorpale durante la somministrazione, il sangue non coagulato doveva servire per l'analisi della risposta cellulo-mediata in Real-time PCR. Mentre è stato possibile seguire l'andamento anticorpale (Figura 9) non è stato possibile dotarsi di un apparecchio per la Real-time.

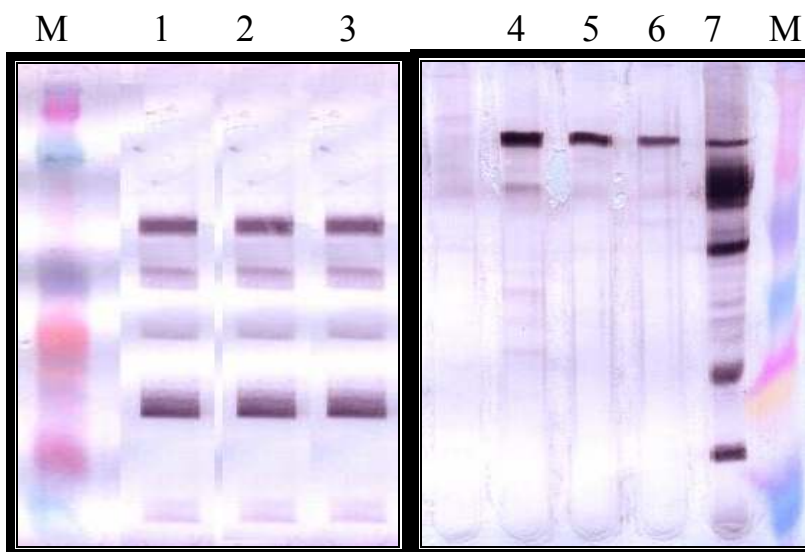


Fig. 9-

Immunoblotting con i sieri prelevati dalle pecore trattate dopo 15 dal terzo inoculo. Le proteine totali di *Mycoplasma agalactiae* sono state trasferite su nitrocellulosa e successivamente testate con i sieri provenienti dalle pecore inoculate con la proteina derivata dal clone 47 (linee 1, 2 e 3) e con la proteina derivata dal clone 28 (linee 4, 5 e 6) . Linea 7, corrisponde al pool di micoplasmici testati con un siero proveniente da una pecora infetta naturalmente; linea M, differenti markers caleidoscopici

RISULTATI

Durante la ricerca corrente sono state messe a punto una serie di tecniche atte a produrre proteine ricombinanti in vettori di espressione. In particolare sono state clonate, in Open Reading frame, 2 porzioni geniche sprovviste di codoni TGA codificanti per 2 proteine di membrana di *Mycoplasma agalactiae*. Sono state inoltre standardizzate le tecniche di purificazione e concentrazione delle proteine provviste di un *tag* di sei istidine.

Nel contempo sono state messe a punto anche le concentrazioni delle proteine ricombinanti e dell'adjuvante da somministrare alle pecore.

L'andamento anticorpale, nel gruppo di pecore vaccinate, è stato valutato con l'immunoblotting (la Figura 9 è riferita a 15 giorni dopo l'ultima somministrazione).

Purtroppo non è stato possibile effettuare la prova di challenge in quanto l'Istituto Zooprofilattico ancora non ha una struttura adatta allo scopo. La Facoltà di Veterinaria, inoltre, non ha potuto mettere a disposizione dei paddocks perché da alcuni anni ha avviato una radicale ristrutturazione degli edifici.

BIBLIOGRAFIA

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith A.A. and Struhl K. (Editors). 1992. Current Protocols in molecular Biology, Vol. I, Wiley Interscience , N.Y.

Contini A., Fadda M., Pittau M., Pintori G..1988. Epidemiologia retrospettiva della Agalassia contagiosa negli ovini in Sardegna 1980-1985. Agric Inform. 3-4.

Inamine MJ, Ho KC, Loechel S., Hu PC. 1990. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. J. Bacteriol. 172: 504-506

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Leori G., Tola S., Carta P., Rocca S., Schianchi G., Crobeddu S., Rolesu S. 1998. Contagious agalactia in Sardinia. In: Leori G., Santini F., Scanziani E., Frey J (eds). Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics. EUR 18018-COST:98-101.

Rodwell A.W., Whitcomb R.F.. 1983. Methods for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. Methods in mycoplasmaology Vol. I. Academic Press. N.Y.

Tola S., Rizzu P., Leori G.. 1994. A species-specific DNA probe for the detection of *Mycoplasma agalactiae*. Vet. Microbiol. 41: 355-361.

Tola S., Idini G., Manunta D., Galleri G., Angioi A., Rocchigiani AM., Leori G. 1996. Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 51: 77-84.

Tola S., Angioi A., Rocchigiani AM., Idini G., Manunta D., Galleri G., Leori G. 1997. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 54: 17-22.

Tola S., Manunata D., Cocco M., Turrini F., Rocchigiani AM., Idini G., Angioi A., Leori G. 1997. Characterization of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. FEMS Microbiol. Letters 154: 355-362.

Tola S., Idini G., Rocchigiani A.M., Rocca S., Manunta D., Leori G.. 2001. A physical map of the *Mycoplasma agalactiae* strain PG2 genome. Vet. Microbiol. 80: 121-130.

Tola S., Crobeddu S., Chessa G., Uzzau S., Idini G., Ibba B., Rocca S. 2001. Sequence, cloning, expression and characterization of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. FEMS Microbiol. Letters 202: 45-50.

Yamao F., Mutuo A., Kawanichi Y., Iwagami M., Azumi Y., Osawa S. 1985. UGA is read ad tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2306-2309.