

Sequence, high level expression and purification of a recombinant 21 kDa protein of *Cowdria ruminantium* from *Escherichia coli* *

A.F. Barbet ¹T.C. McGuire ²S.M. Mahan ³

BARBET (A.F.), MCGUIRE (T.C.), MAHAN (S.M.). Séquence, expression élevée et purification d'une protéine recombinante de 21 kDa de *Cowdria ruminantium*, à partir d' *Escherichia coli*. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1993, **46** (1-2) : 165

Un des buts de notre projet est de fournir une source commode, économique et pure de protéine pour être testée dans des réactions diagnostiques et dans des vaccins contre la cowdriose. L'insertion d'ADN dans *E. coli* recombinante de la colonie F5.2, exprimant une protéine immunodominante de *Cowdria ruminantium*, a été séquencée. L'ADN était riche en A et T (74 p. 100), et hybridait avec tous les isolats de *C. ruminantium* testés et non pas avec de l'ADN bovin ou d'*Anaplasma marginale*. Il contient deux long cadres ouverts de lecture (COL) de 627 et 831 paires de bases. Les COL étaient plus riches en G et C, comparés à la composition globale en bases et les deux COL codaient potentiellement pour des protéines contenant un peptide N-terminal. Des expériences de délétion suivies par des tests d'expression suggéraient que le COL de 627 paires de bases codait pour la protéine immunodominante de *C. ruminantium* reconnue par des sérums d'animaux infectés. Le COL pour ce polypeptide mature a été amplifié par réaction en chaîne de la polymérase et inséré dans un vecteur d'expression élevée où il fut exprimé comme protéine de fusion. Le peptide de fusion attaché, de 9 acides aminés, a permis une purification rapide de la protéine recombinante de *C. ruminantium*.

BARBET (A.F.), MCGUIRE (T.C.), MAHAN (S.M.). Sequence, high level expression and purification of a recombinant 21 kDa protein of *Cowdria ruminantium* from *Escherichia coli*. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1993, **46** (1-2) : 165

One goal of our project is to provide a convenient, inexpensive and pure source of protein for testing in diagnostic assays and vaccines against heartwater. The DNA insert from recombinant *E. coli* colony F5.2, expressing an immunodominant *Cowdria ruminantium* protein, was sequenced. The DNA was AT rich (74 %), hybridized to all isolates of *C. ruminantium* tested and not to bovine or *Anaplasma marginale* DNA, and contained two long open reading frames (ORFs) of 627 and 831 base pairs. The ORFs were of enriched GC content compared to the overall base composition and both ORFs potentially encoded proteins containing an N-terminal signal peptide. Deletion experiments followed by expression assays suggested that the 627 bp ORF encoded the immunodominant *C. ruminantium* protein recognized by infection sera. The ORF for this mature polypeptide was amplified using the polymerase chain reaction and inserted into a high level expression vector where it was expressed as a fusion protein. The attached 9 amino acid fusion peptide enabled rapid purification of the recombinant *C. ruminantium* protein.

BARBET (A.F.), MCGUIRE (T.C.), MAHAN (S.M.). Secuencia, expresión de alto nivel y purificación de una proteína recombinante de 21 kDa de *Cowdria ruminantium* a partir de *Escherichia coli*. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1993, **46** (1-2) : 165

El objetivo de nuestro proyecto es el de proveer una fuente proteica conveniente, barata y pura, para ser utilizada en vacunas y ensayos diagnósticos de *Cowdria ruminantium*. Se llevó a cabo una secuencia de ADN de inserción, proveniente de una colonia de *E. coli* F5.2 recombinante, con expresión de una proteína immunodominante de *Cowdria ruminantium*. Este ADN era rico en AT (74 p. 100), híbrido para todos los aislamientos de *C. ruminantium* que se probaron, pero no para ADN bovin o de *Anaplasma marginale* y era portador de dos marcos de lectura prolongada (ORFs) de dos pares de base de 627 y 831. Los ORFs fueron enriquecidos con GC (en comparación con la composición de base general) y ambos codificaron potencialmente proteínas portadoras de un péptido de señal N-terminal. Los experimentos de supresión, seguidos de ensayos de expresión, sugieren que el ORF de 627 codifica la proteína immunodominante de *C. ruminantium* reconocida en los sueros infectados. Se amplificó el ORF de este polipéptido maduro y se unió a un vector de expresión de alto nivel, en el cual se expresó como una proteína de fusión. El péptido de fusión, resultado de la unión de 9 amino ácidos, permitió una rápida purificación de la proteína recombinante de *C. ruminantium*.

1. Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, University of Florida, POBox 110880 Gainesville, Etats-Unis.

2. Washington State University, Etats-Unis.

3. Heartwater Research Project, UF/USAID/SADCC, POBox 1801 Causeway, Harare, Zimbabwe.

* Seuls les résumés de cette communication sont publiés dans ce volume.