УДК 577.218

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОИЗВОДНОГО ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА GC ХАНТАВИРУСОВ В КЛЕТКАХ E. COLI

Смирнова М.С.

ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН, Москва, e-mail: mbarbotko@yandex.ru

На основе данных пептидного эпитопного картирования предложен пептид НТ, моделирующий иммунодоминантную область поверхностного гликопротеина Gc хантавируса Добрава. Создан искусственный многофункциональный слитой ген в составе зеленый флуоресцентный белок – пептид НТ – легкая цепь ингибитора протеаз из клубней картофеля PKPI-B1, наработан и очищен его продукт, исследованы его антигенные свойства с целью использования в иммунодиагностике хантавирусной инфекции. Показана возможность продукции слитого антигена НК6 на основе пептида НТ с выходом до 70 мг/л. Показано наличие у больных ГЛПС специфических антител, реагирующих с пептидом НТ. При этом сигналы положительных сывороток больных в 2–2,5 раза превышают сигнал сывороток здоровых доноров в том же разведении.

Ключевые слова: антиген, хантавирус, Добрава, эпитоп, пептид, рекомбинант, ГЛПС, GFP

PRODUCTION OF A RECOMBINANT HANTAVIRUS ENVELOPE GC PROTEIN DERIVATIVE IN E. COLI

Smirnova M.S.

Federal State Budgetary Institution «Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides» of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, e-mail: mbarbotko@yandex.ru

HT peptide was derived from published peptide epitope mapping data with regard to model immune dominant region of Dobrava hantavirus envelope glycolprotein. An artificial multi-functional gene encoding green fluorescent protein – HT peptide – light chain of PKPI-B1 protease inhibitor from potato was engineered. The protein was produced, purified and tested as an antigen for specific anti-viral antibody discovery in HFRS patients. The yield of a fused HK6 derived from HT peptide attained 70 mg/l. Specific antibodies reacting with HT peptide were found in HFRS patient sera. The signal with the positive sera in indirect ELISA was 2–2,5-fold more than in the control healthy donor sera in the same dilution.

Keywords: antigen, hantavirus, Dobrava, epitope, peptide, recombinant, HFRS, GFP

В работе [4] методом эпитопного картирования с использованием синтетических пептидов в пределах белка Gc хантавируса Добрава выделена область, предположительно участвующая в формировании конформационно-зависимых эпитопов антител человека. Согласно данным работы [3], эта область находится на границе двух С-концевых доменов белка Gc, один из которых отвечает за димеризацию этого белка. С учётом данных обеих работ нами впервые предложена последовательность фрагмента белка Gc, не проявляющая токсичности по отношению к клеткам продуцента и пригодная для высокоэффективной экспрессии в *E. coli*. Этот пептид длиной 72 а.о. получил рабочее название НТ. **Целью работы** была разработка метода препаративного биосинитеза и очистки пептида НТ в виде трифункционального слитого производного и исследование его иммунохимических свойств.

Материалы и методы исследования

Получение экспрессионной конструкции. Для клонирования гена Gc использовался вирусный штамм Добрава Aa1854/Lipetsk из коллекции лаборатории геморрагических лихорадок ИПВЭ РАМН, в форме суммарной клеточной РНК, выделенной из инфицированных в культуре клеток Vero. На матрице к ДНК, полученной со случайной затравкой, проведен ПЦР с праймерами Li4 (GG AGATCTCTAGCGGGGGCGCCGGAGGAATT) и HT12 (GGACTAGTATCAAAGTCAATGTCCTT), продукт обработан рестриктазой BglII. На матрице плазмиды pQE-GFP проведена ПЦР с использованием праймеров ECFP1 (GGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA) и ECFP2 (GGAGATCTCTTGTACAGCTCGTCCAT GCC), продукт обработан рестриктазой BglII. Продукты рестрикции объединены и подвергнуты лигированию. На матрице продукта лигирования проведена ПЦР с праймерами ECFP1 и HT12. Продукт ПЦР очищен выделением из геля и подвергнут расщеплению рестриктазами BamHI и SpeI. Конструкция pQ-Kn1, представляющая собой ген PKPI-B1 (*S. tuberosum* сорт Истринский, номер доступа NCBI AY692479) на базе вектора pQE30, обработана рестриктазами SpeI и BamHI. Продукты реакции рестрикции объединены, подвергнуты лигированию и введены в клетки *E.* coli TG1 путем трансформации. Полученную промежуточную конструкцию расщепляли рестриктазой SpeI и лигировали с синтетическим ДНК-дуплексом, полученным путем смешения заранее фосфорилированных олигонуклеотидов CTAGCGGGGGCGCCGGAGGAATT и CTAGTTCCGGCGCCCCCG с целью введения

линкерной последовательности на границе областей HT и легкой С-концевой цепи белкового ингибитора PKPI-B1.

Результаты исследования и их обсуждение

С целью повышения выхода пептида HT была получена конструкция, где этот пептид занимал центральное положение в составе трифункционального слитого белка. Такое положение является для него естественным, поскольку в составе полноразмерного белка Gc хантавируса Добрава последовательность пептида HT находится в его центральной части. При этом N-концевое положение слитого продукта занимал зеленый флуоресцентный белок GFP [5], центральное – пептид HT, а С-концевое – легкая цепь двуцепочечного белкового ингибитора Кунитца из клубней картофеля (PKPI-B1) [2].

При сборке обеих этих конструкций использован вектор pQE30, содержащий умеренно сильный промотор T5. Это решение было продиктовано стремлением улучшить условия формирования пространственной структуры продукта за счет снижения интенсивности его накопления. Помимо меньшей интенсивности трансляции вектор pQE30 отличается от pET23 наличием 6His-тага на N-конце кодируемого им рекомбинантного продукта [1]. Нельзя исключать, что этот элемент, обладающий высокой гидрофильностью, также может препятствовать агрегации белка в процессе формирования его пространственной структуры и этим способствовать его накоплению продукта в нативной конформации.

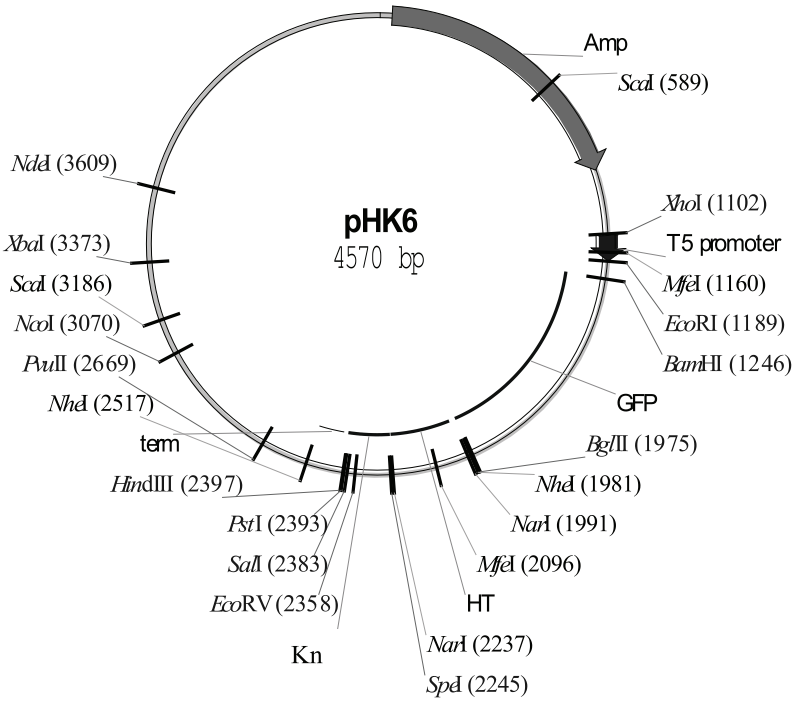

Рис. 1. Плазмидная конструкция pHK6: принципиальная схема

С той же целью на границы доменов GFP, HT и PKPI-B1 конструируемого трифункционального слитого белка были введены искусственные гибкие пептидные линкеры, обогащенные Gly, Ser и Ala, кодируемые синтетическими олигонуклеотидами. Кроме того, при конструировании новой плазмиды ген пептида HT был укорочен на 40 п.н. с 3'-конца, что, согласно данным статьи [3], не сказывается на иммунохимических свойствах белка, но позволяет сократить в нем число дисульфидных связей и гидрофобных участков, способствуя улучшению растворимости продукта, и ослабляя его негативное влияние на жизнеспособность клеток продуцента.

Полученная экспрессионная конструкция на базе вектора pQE30 получила обозначение pHK6 (рис. 1 и 2).

Экспрессия и анализ выхода белка. Конструкцию pHK6 вводили в клетки штамма *E. coli* TG1, отбирая ампициллин-устойчивые колонии. Полученный продуцент культивировали при 30°C в жидкой среде (0,5% дрожжевой экстракт, 1% пептон, 0,5% NaCl) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина в колбах Эрленмейера в течение 14–18 часов. Оценку выхода целевого про-

дукта осуществляли с помощью электрофоретического анализа суммарных белков рекомбинантного продуцента по Лэммли. Для этого из грубого клеточного лизата каждой культуры отбирали по 100 мкл. Лизат подвергали центрифугированию при 14000 G. в течение 15 мин и разделяли растворимую и нерастворимую клеточную фракции. Белки солюбилизировали в 30 мкл буфере Лэммли и анализировали состав белков с помощью денатурирующего SDS-электрофореза в 15% ПААГ (рис. 3). Проведенный анализ показал, что трифункциональный слитой белок на основе пептида НТ – продукт конструкции pHK6, как и свободный пептид НТ накапливается в нерастворимой клеточной фракции, с выходом около 40 мг/л культуры.

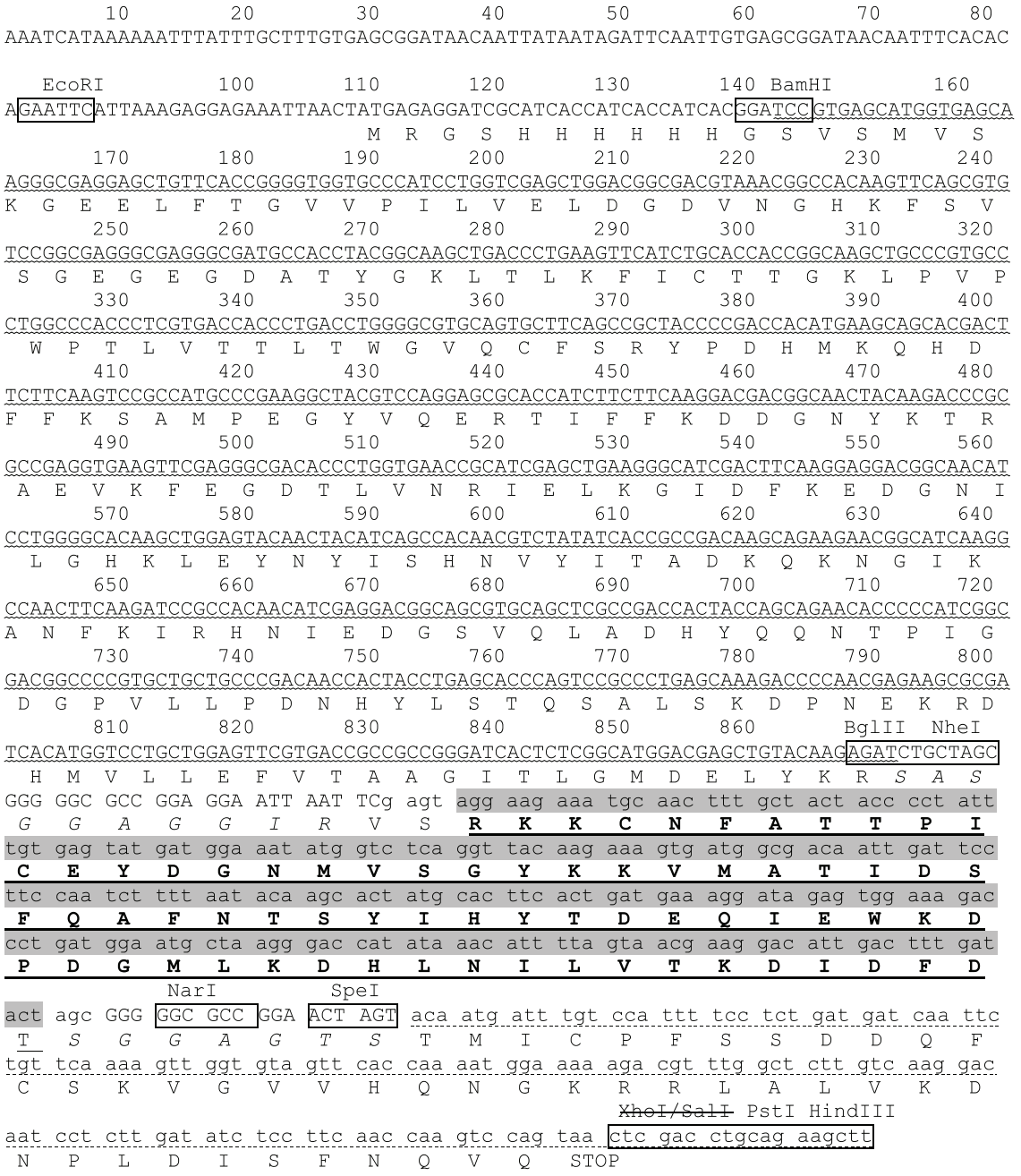

Рис. 2. Последовательность трифункционального слитого гена, кодирующего производное пептида НТ, в составе конструкции pHK6

Подготовка образцов к хроматографии. Грубый клеточный лизат культуры TG1(pHK6) подвергали центрифугированию при 8000 G. Осадок нерастворимой клеточной фракции трижды промывали: в 25 мл 4 М NaCl с добавлением 1% три-

тона, в 25 мл физиологического раствора с 1% тритоном и в 25 мл воды. Осадок суспендировали в 8 мл буфера (Трис-HCl, 10 мМ, pH = 8,6), содержащего 8 М мочевину и 0,1% bмеркаптоэтанол. Раствор кипятили на водяной бане в течение 10 минут и центрифугировали. Полученный осветленный супернатант наносили на гель-фильтрационную хроматографическую колонку с Sephadex G-25 fine со скоростью 5 мл/мин, используя жидкостную хроматографическую систему низкого давления «AKTA-Purifile» (GE Healthcare, США). Разделение проводили в буфере (Трис-HCl, 10 мМ, pH = 8,6), содержащем 4 М мочевины с целью удаления солей, избытка восстановителя и низкомолекулярных клеточных примесей. Солюбилизированный в денатурирующих условиях белок подвергали очистке с помощью анионообменной хроматографии.

Полученный после гель-фильтрации раствор денатурированного белка HK6 в объёме 15 мл наносили на анионообменную колонку Sepharose-Q (XL) (GE Healthcare, США, высота 24 см, объем 48 мл), уравновешенную буфером А. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl от 0 до 0,5 М в хроматографическом буфере В (Трис-HCl, 10 мМ, pH = 8,6, 4 М мочевина, 1 М NaCl) со скоростью 8 мл/мин. Собранные фракции анализировали с помощью денатурирующего SDS-электрофореза в 15% ПААГ. Полученные осадки после солюбилизации анализировали электрофорезом в денатурирующих условиях (рис. 4).

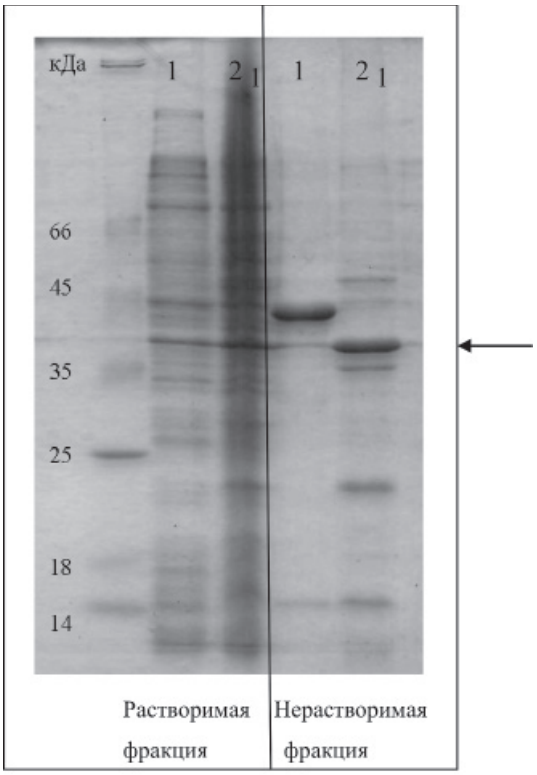

Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов экспрессии конструкции pHK6 в растворимой и нерастворимой фракции лизата клеток E. coli TG1, несущих: (1) вектор pQE30, (2) конструкцию pHK6. Белки разделены в денатурирующем 15% ПААГ и окрашены на общий белок Coomassie Blue R-250. Стрелкой указано расположение белка HK6 (расчетная масса 42 кДа)

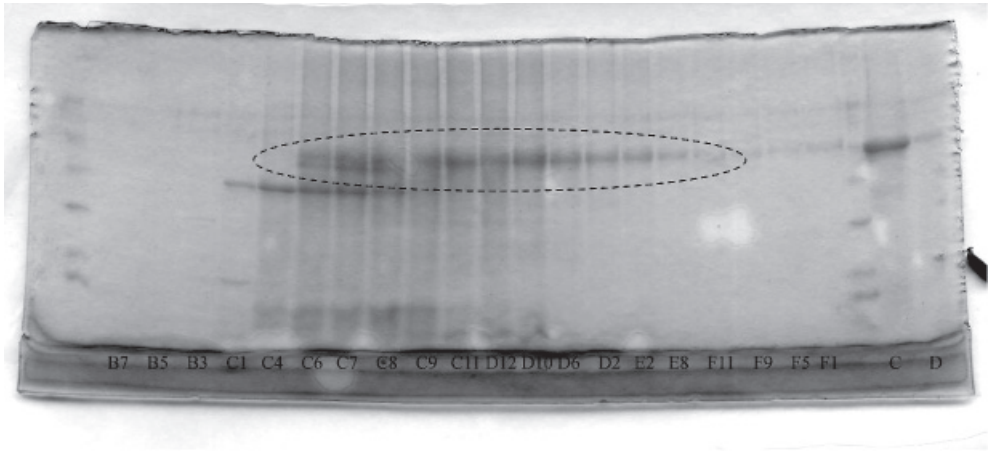

Рис. 4. Электрофоретический анализ фракций белка HK6 после ионообменной хроматографии в денатурирующих условиях. Белки разделены в денатурирующем 15% ПААГ и окрашены на общий белок Coomassie Blue R-250. Положение целевого белка массой 42 кДа обозначено пунктирным овалом. Для дальнейшей работы были отобраны фракции D6-F6. Материал фракций белка HK6, полученных в результате анионообменной хроматографии в денатурирующих условиях, был использован для проведения иммунохимических тестов (рис. 5)

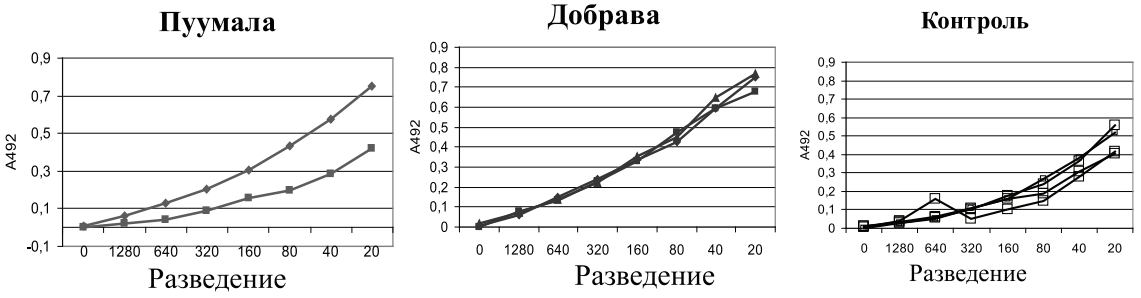

Рис. 5. Изучение антигенной активности белка НК6 методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. Подписи «Пуумала» и «Добрава» означают вид вируса, которым инфицирован донор сыворотки, «Контроль» – сыворотки здоровых доноров

Исследования антигенной активности белка НК6. В качестве формата проведения анализа был выбран вариант тИФА с непосредственной сорбцией рекомбинантного белка-антигена НК6 на поверхность иммунологического планшета. В эксперименте использовались хроматографически очищенный белок НК6 в денатурированной форме. В процессе сорбции белковый препарат, хранящийся в виде концентрированных растворов в присутствии 4 М мочевины, разводили в 20–50 раз карбонат-бикарбонатным буфером (КГБ), доводя концентрацию общего белка в растворе до 10 мкг/мл. Полученный раствор вносили в иммунологические планшеты на 1 сутки, после чего проводили блокирование неспецифического связывания на подложке. Далее проводилось серийное титрование анализируемой сыворотки больных ГЛПС (или здоровых доноров в группе сравнения). При этом с целью исследования специфичности реакции в выборки сравнения включали

a) больных ГЛПС, инфицированных вирусом Добрава;

b) больных ГЛПС, инфицированных вирусом Пуумала;

c) здоровых доноров.

В качестве контрольного образца использовали лунки планшета, в которые вместо разведенной сыворотки человека вносили буфер PBS («конъюгатный контроль»). В заключение все лунки планшета обрабатывали антивидовым конъюгатом против IgG человека, меченным пероксидазой, и субстратом TMB в присутствии пероксида водорода. Сигнал измеряли на планшетном сканере-спектрофотометре при l = 492 нм. Результаты определений представлены на рис. 5.

Заключение

Таким образом, в настоящей работе предложен способ получения хантавирусного антигена, кодируемого конструкцией рНК6. Результаты показывают высокую реакционную способность антител положительных сывороток в отношении него. При этом сигналы положительных сывороток больных в 2–2,5 раза превышают сигнал сывороток здоровых доноров в том же разведении, что позволяет достоверно диагностировать наличие в крови людей специфических антител против вирусов Добрава и Пуумала.

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 20013–2017 годы по теме № 240.

Список литературы/References

1. Campos J.A., Aledo J.C., Segura J.A., Alonso F.J., Gómez-Fabre P.M., Núñez de Castro I., Márquez J. Expression of recombinant human L-glutaminase in *Escherichia coli*: polyclonal antibodies production and immunological analysis of mouse tissues // Biochim. Biophys. Acta. 2003. 1648(1–2): 17–23

2. Cheong D.E., Choi J.H., Song J.J., Kim G.J. Construction of non-invasively constitutive expression vectors using a metagenome-derived promoter for soluble expression of proteins. – Bioprocess Biosyst Eng. 2013. Vol. 36, № 6, P. 667–676.

3. Hepojoki J., Strandin T., Vaheri A., Lankinen H. Interactions and oligomerization of hantavirus glycoproteins – J Virol. 2010. Vol. 84, P. 227–242.

4. Koch J., Liang M., Queitsch I., Kraus A.A., Bautz E.K. Human recombinant neutralizing antibodies against hantaan virus G2 protein. Virology. 2003. Vol. 308, № 1, P. 64–73.

5. Samarkina O.N., Popova A.G., Gvozdik E.Y., Chkalina A.V., Zvyagin I.V., Rylova Y.V., Rudenko N.V., Lusta K.A., Kelmanson I.V., Gorokhovatsky A.Y. and Vinokurov L.M. Universal and rapid method for purification of GFP-like proteins by the ethanol extraction. – Protein Expr. Purif. 2009. Vol. 65, № 1, P. 108–113.

Рецензенты:

Морозов И.А., д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе, ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова» Российской академии медицинских наук (ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН), г. Москва;

Ребриков Д.В., д.б.н., директор по науке, ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва.

Работа поступила в редакцию 19.07.2013.