



УДК 578.224:578.833.2

Получение рекомбинантного белка NS1 вируса клещевого энцефалита

И. Г. Кондратов¹, И. С. Соловаров¹, Н. Н. Деникина¹, О. Г. Лопатовская²,
И. К. Байков³, А. Л. Матвеев³, Н. В. Тикунова³, Г. Н. Леонова⁴, С. И. Беликов¹

¹ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

² Иркутский государственный университет, Иркутск

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

⁴ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

СО РАМН им. Сомова, Владивосток

E-mail: kondratovig@mail.ru

Аннотация. Получен рекомбинантный белок NS1 вируса клещевого энцефалита высоковирулентного штамма Софьин в бактериальной системе экспрессии *E.coli* B834 – рЕТ22b. Отработаны методики очистки и рефолдинга полученного белка. Структура белка подтверждена методом пептидного фингерпринта, его иммунохимическая активность показана методами иммуно-ферментного анализа и дот-блота с моноклональными антителами. Обсуждаются преимущества ранней диагностики клещевого энцефалита на основе белка NS1 и перспективы его применения для создания вакцин.

Ключевые слова: флавивирусы, клещевой энцефалит, неструктурный белок NS1, рефолдинг, ранняя диагностика клещевого энцефалита.

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) – одна из самых распространённых и опасных природно-очаговых инфекций лесной зоны Евразийского континента [4; 5]. Вирус клещевого энцефалита (КЭ) является первым представителем рода *Flavivirus*, открытым в 1937 г. известным русским вирусологом Л. А. Зильбером с сотрудниками на территории Дальнего Востока [5; 6]. Этот вирус вызывает инфекционное заболевание, характеризующееся лихорадкой, общей интоксикацией и поражением центральной нервной системы [1; 16; 21]. Основными переносчиками вируса КЭ являются клещи рода *Ixodes*, широко распространённые в умеренной зоне смешанных хвойно-широколиственных лесов Северного полушария [2; 3]. Ежегодно в России регистрируется более 10 тысяч случаев нападений клещей, содержащих вирус КЭ, и до 20–30 случаев заболевания КЭ на 100 тыс. населения. Несмотря на столь неутешительную статистику, проблема ранней диагностики и терапии вирусных инфекций до настоящего времени не решена.

Существует ряд подходов к диагностике флавивирусных инфекций, основанных на выделении вируса или геномной РНК, а также обнаружения антител или антигенов. Однако

для выделения вируса или обнаружения геномных РНК (метод ПЦР) необходима специализированная лаборатория и хорошо обученный персонал. Существенно проще метод иммуноферментного анализа (ELISA), поэтому подход, основанный на обнаружении неструктурного NS1 антигена, вызывает большой интерес для ранней диагностики флавивирусной инфекции. Важность NS1 флавивирусов как биомаркеров обусловлена тем, что эти антигены могут быть обнаружены до образования антител [8; 12; 14]. NS1 антиген обнаруживается в крови в первый день после инфицирования даже при отрицательных результатах ОТ-ПЦР-анализа и в присутствии IgM антител [7], что позволяет рекомендовать этот метод для ранней диагностики инфекции.

Диагностические антигены, используемые в иммуноферментном анализе, можно получить либо из мозга инфицированных вирусом лабораторных животных, либо из культуры клеток, очищая ацетоном с градиентом сахарозы. Применяемые методы являются трудоёмким и небезопасными, а полученные в результате образцы антигена могут различаться по качеству и чистоте [15]. Обнаружение антигена NS1 представляет собой новый подход для диагностики острой флавивирусной инфекции, а разработка оптимального способа получения ан-

тигена (белка) NS1 вируса КЭ в настоящее время является актуальной задачей.

Цель настоящей работы заключается в разработке методов получения, очистки и рефолдинга рекомбинантного белка NS1 вируса клещевого энцефалита.

Материалы и методы

В работе использовали штамм Софьин вируса КЭ. Культуру клеток СПЭВ (клетки почки эмбриона свиньи) заражали суспензией вируса КЭ в титре 5 lg в 1 мл среды RPMI. Клетки культивировали в среде RPMI с добавлением 10%-ной сыворотки эмбриона коровы в течение 3 суток.

Суммарную РНК из клеток выделяли методом фенольной экстракции (Trizol LS, Invitrogen) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили по протоколу, прилагаемому к набору Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).

Аmplификацию фрагмента, соответствующую гену NS1, проводили с использованием праймеров NS1-For 5'-ggatgcatatggatgctggctgctgtggacacc и NS1-Rew 5'-ctctccctcgagtgccaccaccattgagcgaacaag с внутренними сайтами рестрикции NdeI и XhoI, соответственно. Полученные ампликоны лигировали в вектор pTZ57R (Thermo Scientific) и клонировали в штамме *E. coli* JM110.

Анализ рекомбинантных клонов осуществляли амплификацией с универсальными плазмидными праймерами M13 Rev (-27) 5'-ggaacagctatgaccatg-3 и M13 For (-41) 5'-ggttttccagctacgac-3. Клоны, содержащие искомый фрагмент, наращивали в 5 мл среды LB с 10 мкг/мл ампициллина и выделяли плазмидную ДНК Zymu Plasmid Miniprep Kit (ZymoResearch) согласно протоколу производителя. Плазмидную ДНК (10 мкг) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и XhoI (Thermo Scientific) и разделяли в 1,5%-ном агарозном геле. Целевой фрагмент ДНК выделяли набором Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch).

Плазмидный вектор pET22b обрабатывали рестриктазами NdeI и XhoI (Thermo Scientific) в присутствии FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific) и после инактивации ферментов (10 мин при 85 °С) использовали без дополнительной очистки. Лигирование осуществляли при соотношении 4:1 (вставка/вектор) с использованием T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) согласно протоколу произ-

водителя. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* JM110.

Селекцию рекомбинантных клонов осуществляли амплификацией с олигонуклеотидными праймерами NS1-For и T7-Rew, анализируя размер и ориентацию вставки. Клоны с вставкой нужного размера выращивали в 5 мл среды LB с 10 мкг/мл ампициллина и выделяли плазмидную ДНК Zymu Plasmid Miniprep Kit (ZymoResearch) согласно протоколу производителя. Секвенирование рекомбинантных конструкций проводили согласно протоколу производителя с использованием BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Для экспрессии белка NS1 клетки *E. coli* B834(DE3) трансформировали рекомбинантной плазмидой pET22-NS1. Индукцию проводили в 50 мл среды LB с 10 мкг/мл карбенициллина добавлением IPTG до конечной концентрации 0,1 мМ. После инкубации клеток в течение 2 ч при 37 °С клетки собирали центрифугированием при 10 000 об./мин в течение 15 мин. Клетки ресуспендировали в 1xPBS буфере, добавляли лизоцим до концентрации 1 мкг/мл и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Разрушали клетки ультразвуком и осаждали тельца включения центрифугированием при 10 000 об./мин в течение 30 мин. Тельца включения растворяли в 6 М гуанидин-хлориде в 1X PBS буфере, центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 30 мин, добавляли к осветлённому лизату имидазол до конечной концентрации 25 мМ. Рекомбинантный белок очищали в денатурирующих условиях на колонке Bio-Scale Mini IMAC Cartridge (BioRad) согласно протоколу производителя. Электрофоретический и масс-спектрометрический анализ рекомбинантного белка осуществляли по общепринятым методикам.

Рефолдинг белка осуществляли путём диализа против 4 М мочевины в 1X PBS буфере с конечной концентрацией DTT 0,1 мМ. Затем белок разводили в 100 раз 1X PBS буфером и инкубировали при 4 °С в течение 18 ч. После центрифугирования раствора белка при 15 000 об./мин в течение 1 ч растворимую часть белка подвергали очистке и концентрированию в нативных условиях на никель-хелатной агарозе Bio-Scale Mini IMAC Cartridge (BioRad) согласно протоколу производителя. Дот-блот анализ рекомбинантного белка осуществляли с использованием моноклональных антител МК-3, полученных к нативному белку NS1 вируса КЭ. Визуализировали мембраны с использованием конъюгата goat anti-mouse IgG (Fab specific)–

Alkaline Phosphatase согласно рекомендациям производителя.

Результаты и обсуждение

Флавивирусы имеют геном в виде одноцепочечной РНК положительной полярности длиной около 11 000 нуклеотидов, кодирующий полипротеин, который посттрансляционно расщепляется вирусными и клеточными протеазами на 3 структурных (капсидный С, мембранный М и оболочечный белок Е) и 7 неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) [17]. При этом NS1 гликопротеин в составе полипротеина расположен в просвете эндоплазматической сети и отщепляется от мембраны клеточной сигнализацией, после чего белок NS1 становится единственным вирусным белком, секретируемым из клетки. Таким образом, заболевание может быть диагностировано даже на ранней стадии инфицирования путём обнаружения антигена NS1, циркулирующего в крови [7], либо обнаружения IgM к белку NS1 в острой фазе заболевания, когда обычный иммуноферментный анализ неэффективен [11].

Кроме того, высокая иммуногенность белков NS1 флавивирусов представляет значительный интерес не только в качестве антигена для диагностических методов [9; 13], но и в качестве компонента субъединичных вакцин [18; 19]. В настоящее время идёт активная разработка ДНК-вакцин, кодирующих белок NS1 флавивирусов. При этом в модельных экспериментах на мышах NS1-вакцины обеспечивают 100%-ную защиту от вируса [10; 22].

Выделение белка из культуры клеток, заражённых вирусом КЭ, является небезопасной и кропотливой работой, что делает этот подход непригодным для обычного крупного производства. Хотя метод бактериальной экспрессии является относительно простым и лёгким для получения рекомбинантного белка, он также не является идеальным. Большинство попыток экспрессировать белки NS1 различных флавивирусов в *E. coli* или дрожжах привели к получению нерастворимого белка. Как правило, нерастворимые белковые агрегаты являются биологически менее активными и, кроме того, процесс получения активного белка занимает больше времени, так как необходимо оптимизировать рефолдинг белка [20].

Для преодоления этих недостатков, связанных с продукцией нерастворимых белков в *E. coli*, нами была предпринята попытка экспрессии и отработки метода рефолдинга рекомбинантного NS1. Основные препятствия, связанные с экспрессией гетерологичных белков в *E. coli*, были преодолены выбором оптимального вектора, который обеспечивает высокий уровень наработки растворимых рекомбинантных белков. Использование плазмидного вектора pET22b позволило получить рекомбинантный белок, содержащий 6XHis теги на С-конце, что значительно снижает потери целевого продукта за счёт возможности аффинной очистки и концентрации на никелевой агарозе, способной к специфичному хелатообразованию с полигистидиновыми фрагментами белка.

После растворения телец включения рекомбинантный белок был очищен методом аффинной хроматографии, рефолдирован методом диализа в денатурирующих условиях с последующим разведением и сконцентрирован (рис. 1).

Дот-блот анализ антигенных свойств полученного рефолдированного белка выявил его сродство к моноклональным антителам на нативный белок NS1 вируса КЭ (рис. 2).

Таким образом, разработанные методы экспрессии и рефолдинга позволяют получить рекомбинантный белок NS1, сохраняющий свои антигенные свойства, и могут быть использованы в качестве базовых для дальнейшей оптимизации с целью повышения выхода целевого продукта.

Заключение

Полученный рекомбинантный белок NS1 может быть использован в качестве диагностического антигена. Оптимизированные методы экспрессии и очистки, разработанные в настоящем исследовании, подходят для недорогого и массового производства белка NS1 не только для диагностических целей, но и для разработки вакцин против вируса КЭ. Подобного рода подходы могут быть использованы в производстве других важных вирусных белков для исследовательских и диагностических целей.

Работа выполнена при финансовой поддержке междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 141.

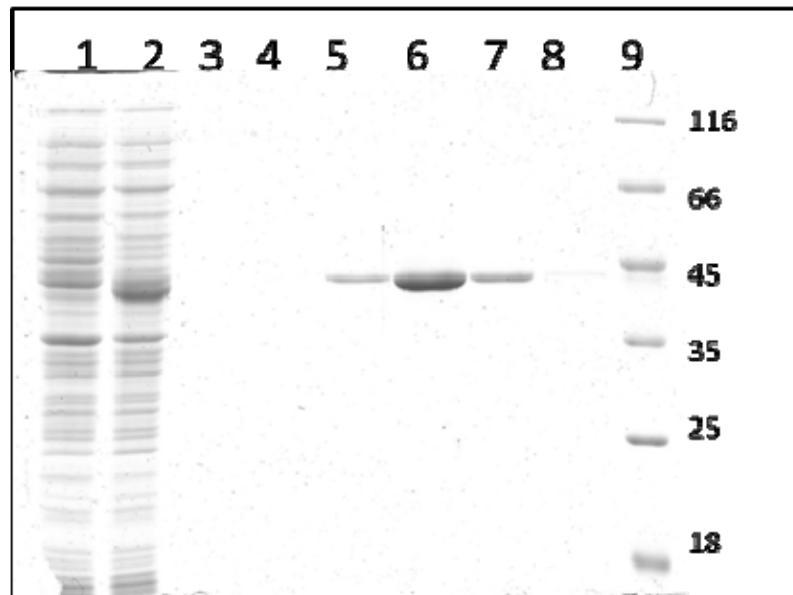


Рис. 1. Результаты анализа индукции, очистки и рефолдинга рекомбинантного белка NS1 вируса КЭ: 1 – неиндуцированная культура; 2 – 0,1 мМ IPTG культура, индуцированная 2 часа; 3–6 – фракции первичной очистки; 7, 8 – фракции после рефолдинга; 9 – маркер молекулярного веса, кДа

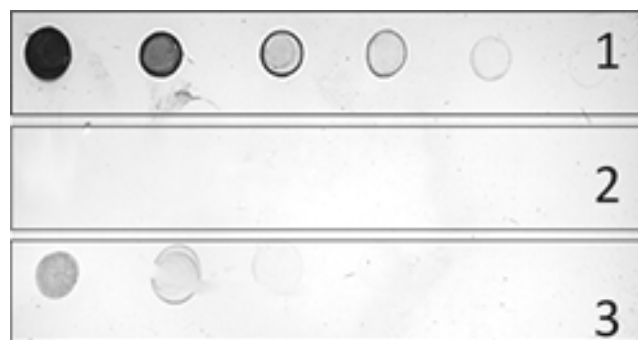


Рис. 2. Результаты дот-блот анализа: 1 – положительный контроль (десятикратные разведения нативного вирусного белка NS1); 2 – отрицательный контроль (десятикратные разведения нативного вирусного белка E); 3 – десятикратные разведения рефолдированного рекомбинантного белка NS1

Литература

1. Аитов К. А. Современные аспекты клиники клещевого энцефалита / К. А. Аитов [и др.] // *Вопр. вирусологии.* – 2007. – № 5. – С. 33–37.
2. Алексеев А. Н. Современное состояние знаний о переносчиках клещевого энцефалита / А. Н. Алексеев // *Вопр. вирусологии.* – 2007. – № 5. – С. 21–26.
3. Балашов Ю. С. Иксодовые клещи – паразиты и переносчики инфекций / Ю. С. Балашов. – СПб. : Наука, 1998. – 287 с.
4. Гниель Д. Ситуация по клещевому энцефалиту в мире. Вирус – возбудитель – заболевание и профилактика / Д. Гниель, М. Броекер // *Клещевой энцефалит (к 65-летию открытия).* – Владивосток, 2002. – С. 180–186.
5. Клещевой энцефалит в Восточной Сибири / В. И. Злобин [и др.]. – Иркутск : РИО ВСНЦ СО РАМН, 2002. – 184 с.
6. Погодина В. В. 70-летие открытия клещевого энцефалита. Путь к достоверной истории / В. В. Погодина // *Вопр. вирусологии.* – 2007. – № 5. – С. 5–8.
7. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients / P. R. Young [et al.] / *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38. – P. 1053–1057.
8. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections / S. Alcon [et al.] / *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 40. – P. 376–381.
9. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses / V. T. Hang [et al.] / *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2009. – Vol. 3, N 1. – e360.
10. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences

on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice / S. M. Costa [et al.] / *Virology*. – 2007. – Vol. 358. – P. 413–423.

11. Evaluation and use of NS1 IgM antibody detection for acute dengue virus diagnosis: report from an outbreak investigation / S. G. Sankar [et al.] / *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18, № 1. – P. E8–E10.

12. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum / P. Dussart [et al.] / *Clin. Vaccine Immunol.* – 2006. – Vol. 13. – P. 1185–1189.

13. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection / W. Chaiyaratana [et al.] / *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 1. – P. 83–84.

14. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue in Venezuela / A. H. Ramirez [et al.] / *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 65. – P. 247–253.

15. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen / J. L. Huang [et al.] / *J. Med. Virol.* – 2001. – Vol. 65. – P. 553–560.

16. Kaiser R. Tick-Borne Encephalitis / R. Kaiser // *Infect. Dis. Clin. N. Am.* – 2008. – Vol. 22, N 3. – P. 561–575.

17. Lindenbach B. D. Molecular biology of flaviviruses / B. D. Lindenbach, C. M. Rice / *Adv. Virus Res.* – 2003. – Vol. 59. – P. 23–61.

18. Schlesinger J. J. Protection of mice dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus nonstructural glycoprotein NS1 / J. J. Schlesinger, M. W. Brandriss, E. E. Walsh / *J. Gen. Virol.* – 1987. – Vol. 68. – P. 853–857.

19. Schlesinger J. J. The Fc portion of antibody yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against encephalitis in mice / J. J. Schlesinger, M. Foltzer, S. Chapman / *Virology*. – 1993. – Vol. 192. – P. 132–141.

20. Sørensen H. P. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* / H. P. Sørensen, K. K. Mortensen / *Microbial Cell Factories*. – 2005. – Vol. 4. – P. 1–8.

21. Tick-borne encephalitis / T. S. Gritsun [et al.] // *Antiviral Res.* – 2003. – Vol. 57. – P. 129–146.

22. Timofeev A. V. Genetic vaccination of mice with plasmids encoding the NS1 non-structural protein from tick-borne encephalitis virus and dengue 2 virus / A. V. Timofeev, V. M. Butenko, J. R. Stephenson / *Virus Genes*. – 2004. – Vol. 28, N 1. – P. 85–97.

Obtaining the recombinant protein NS1 of tick-borne encephalitis virus

I. G. Kondratov¹, I. S. Solovarov¹, N. N. Denikina¹, O. G. Lopatovskaya², I. K. Baykov³, A. L. Matveev³, N. V. Tikunova³, G. N. Leonova⁴, S. I. Belikov¹

¹ *Limnological Institute SB RAS, Irkutsk*

² *Irkutsk State University, Irkutsk*

³ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

⁴ *Institute of Epidemiology and Microbiology SB RAMS, Vladivostok*

Abstract. Recombinant protein NS1 of highly-virulent strain Sofjin in bacterial expression system *E. coli* B834–pET22b are obtained. Optimization methods of purification and refolding are performed. Recombinant protein structure was confirmed by MS identification of tryptic peptide mapping. Using ELISA and dot-blot analysis with monoclonal antibodies immunochemical activity of recombinant protein are shown. NS1 protein-based advantage of early diagnostics tick-borne encephalitis virus infection and perspectives use in vaccine development are discussed.

Key words: flavivirus, tick-borne encephalitis virus, non-structural protein NS1, refolding, early diagnostics tick-borne encephalitis virus infection.

Кондратов Илья Геннадьевич
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952) 42–84–22
E-mail: kondratovig@mail.ru

Kondratov Ilya Gennadyevich
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph.D. in Biology, senior research scientist

phone: (3952)42–84–22
E-mail: igkondratov@mail.ru

Соловаров Иннокентий Сергеевич
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
научный сотрудник
тел. (3952) 42–84–22
E-mail: keschass@mail.ru

Solovarov Innokentiy Sergeevich
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
research scientist
phone: (3952)42–84–22
E-mail: keschass@mail.ru

Деникина Наталья Николаевна
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952) 42-84-22
E-mail: denikina@lin.irk.ru

Denikina Nataliya Nikolaevna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph.D. in Biology, senior research scientist

phone: (3952)42-84-22
E-mail: denikina@lin.irk.ru

Лопатовская Ольга Геннадьевна
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
кандидат биологических наук, доцент
тел. (3952)24-18-70, факс (3952) 24-05-59
E-mail: lopatovs@gmail.com

Lopatovskaya Olga Gennadyevna
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
Ph. D. in Biology, ass. prof
phone: (3952) 24-18-70, fax: (3952) 24-05-59
E-mail: lopatovs@gmail.com

Байков Иван Константинович
Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8
инженер-исследователь
тел. (383)363-51-57
E-mail: ivan_baykov@mail.ru

Baykov Ivan Konstantinovich
Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine SB RAS
8 Lavrentyev Av., Novosibirsk, 630090
research engineer
phone: (383) 363-51-57
E-mail: ivan_baykov@mail.ru

Матвеев Андрей Леонидович
Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8
инженер
тел. (383)363-51-57
E-mail: guterus@gmail.com

Matveev Andrey Leonidovich
Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine SB RAS
8 Lavrentyev Av., Novosibirsk, 630090
engineer
phone: (383) 363-51-57
E-mail: guterus@gmail.com

Тикунова Нина Викторовна
Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8
доктор биологических наук, доцент,
зав. лабораторией
тел. (383)363-51-57
E-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Tikunova Nina Viktorovna
Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine SB RAS
8 Lavrentyev Av., Novosibirsk, 630090
D. Sc. of Biology, ass. prof., Head of laboratory
phone: (383) 363-51-57
E-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Леонова Галина Николаевна
Научно-исследовательский Институт
эпидемиологии и микробиологии СО РАМН
им. Г. П. Сомова
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1
Доктор медицинских наук, профессор
зав. лабораторией
тел. (4232) 44-07-12
E-mail: galinaleon41@gmail.com

Leonova Galina Nikolaevna
Institute of Epidemiology and Microbiology
SB RAMS
1 Selskaya St., Vladivostok, 690087
D. Sc. of Medicine, Prof.,
Head of Laboratory
phone: (4232) 44-07-12
E-mail: galinaleon41@gmail.com

Беликов Сергей Иванович
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией
тел. (3952) 42-84-22, факс (3952)42-54-05
E-mail: sergeibelikov47@gmail.com

Belikov Sergey Ivanovich
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
D. Sc. of Biology, Prof., Head of laboratory
phone: (3952)42-84-22, fax: (3952) 42-54-05
E-mail: sergeibelikov47@gmail.com