



Получение и очистка рекомбинантных белков VP2 и VP3 вируса *Alongshan* группы *Jingmenvirus* и оценка их иммунохимических свойств

Бондаренко Е.В.[✉], Ермолаева Е.А., Холодилов И.С., Литов А.Г.

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия

Аннотация

Введение. Вирус *Alongshan* — представитель неклассифицированной группы *Jingmenvirus* (*Flaviviridae*), обнаружен в клещах *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus* и различных видах комаров в России, Китае, Финляндии и Франции. В отличие от классических ортофлавивирусов, геном вируса *Alongshan* представлен 4 сегментами РНК положительной полярности. Первый и третий сегменты генома кодируют белки, гомологичные белкам репликативной машинерии ортофлавивирусов, остальные сегменты кодируют предположительно структурные белки, не имеющие известных гомологов: сегмент 2 — VP1a (белок оболочки), VP1b и NuORF; сегмент 4 — VP2 (капсидный) и VP3 (мембранный). Описаны случаи заболевания людей, связанные с вирусом *Alongshan*.

Цель работы — разработка системы экспрессии и очистки рекомбинантных белков VP2 и гидрофильного участка VP3 для проверки их антигенных свойств.

Материалы и методы. Для получения гипериммунных сывороток мышей и рекомбинантных белков в бактериальной системе экспрессии был использован штамм Miass527 вируса *Alongshan*. Произведены биоинформатический анализ последовательностей, кодирующих целевые белки, генно-инженерное клонирование. Для контроля результатов осуществлены иммуноблоттинг и иммуноферментный анализ.

Результаты. Рекомбинантные белки вируса *Alongshan* использованы в лабораторной диагностической тест-системе для определения наличия антител к вирусу. Полученный рекомбинантный белок VP2 способен выявлять антитела во всех исследованных сыворотках инфицированных мышей, а также антитела в сыворотках людей как в вестерн-блоттинге, так и в иммуноферментном анализе. При этом антитела к рекомбинантному участку белка VP3 в противовирусных иммунных сыворотках выявлялись нерегулярно.

Заключение. Выявление антител к вирусу *Alongshan* у пациентов подтверждает необходимость дальнейшего исследования данной группы вирусов.

Ключевые слова: группа *Jingmenvirus*, вирус *Alongshan*, диагностика, рекомбинантные белки

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен этическим комитетом Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита) (протокол № 200923-1 от 20.09.2023).

Источник финансирования. Финансирование работы осуществлялось по государственному заданию FNZG-2024-0001 и государственному заданию FNZG-2024-0008.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Бондаренко Е.В., Ермолаева Е.А., Холодилов И.С., Литов А.Г. Получение и очистка рекомбинантных белков VP2 и VP3 вируса *Alongshan* группы *Jingmenvirus* и оценка их иммунохимических свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2):213–222.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-612>

EDN: <https://www.elibrary.ru/ONPICA>

Production and purification of recombinant proteins VP2 and VP3 of the *Alongshan* virus of the *Jingmenvirus* group and evaluation of their immunochemical properties

Ekaterina V. Bondarenko[✉], Elena A. Ermolaeva, Ivan S. Kholodilov, Aleksander G. Litov

Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products
of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia

Abstract

Introduction. *Alongshan* virus is a representative of the unclassified group of *Jingmenviruses* (*Flaviviridae*), which is detected in *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus* ticks and various mosquito species in Russia, China, Finland and France. Unlike traditional orthoflaviviruses, the *Alongshan* virus genome is represented by 4 positive-sense RNA segments. The first and third segments of the genome encode proteins homologous to proteins of the replicative machinery of orthoflaviviruses, the remaining segments encode putative structural proteins that have no known homologues: segment 2 — VP1a (envelope protein), VP1b and NuORF; segment 4 — VP2 (capsid) and VP3 (membrane). Human cases of *Alongshan* virus-associated disease have been described.

The aim of this study is to develop a system for expression and purification of recombinant VP2 and hydrophilic site VP3 proteins to test their antigenic properties.

Materials and methods. Miass527 strain of *Alongshan* virus was used to produce hyperimmune mouse sera and recombinant proteins in a bacterial expression system. Bioinformatic analysis of sequences encoding target proteins and genetically engineered cloning were carried out in this study. Western blotting and enzyme immunoassay (ELISA) were performed to control the results.

Results. Recombinant proteins of *Alongshan* virus have been used in a laboratory diagnostic test system to determine the presence of antibodies to the virus. The obtained recombinant VP2 protein is able to detect antibodies in all tested sera of infected mice, as well as antibodies in human sera both in Western blotting and in enzyme immunoassay. At the same time, antibodies to the recombinant region of VP3 protein were detected irregularly in antiviral immune sera.

Conclusion. The detection of antibodies to *Alongshan* virus in patients confirms the necessity for further investigation of this group of viruses.

Keywords: *Jingmenvirus* group, *Alongshan* virus, diagnostics, recombinant proteins

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (protocol No. 200923-1, September 20, 2023).

Funding source. The work was funded under the state assignment FNZG-2024-0001 and the state assignment FNZG-2024-0008.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Bondarenko E.V., Ermolaeva E.A., Kholodilov I.S., Litov A.G. Production and purification of recombinant proteins VP2 and VP3 of the *Alongshan* virus of the *Jingmenvirus* group and evaluation of their immunochemical properties. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):213–222.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-612>
EDN: <https://www.elibrary.ru/ONPICA>

Введение

Представители рода *Orthoflavivirus* (семейство *Flaviviridae*) инфицируют позвоночных и беспозвоночных животных. К этому роду принадлежат такие важные патогены человека, как вирус денге, вирус жёлтой лихорадки, вирус Западного Нила, вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), вирус японского энцефалита и др. Недавно была охарактеризована новая группа вирусов, названная *Jingmenvirus* [1]. В отличие от классических ортофлавивирусов, *Jingmenvirus* имеют сегментированный РНК геном [2]. Первый и третий сегменты генома *Jingmenvirus* кодируют белки, гомологичные хеликазе и РНК-зависимой РНК-полимеразе ортофлавивирусов [3, 4]. Второй и четвертый сегменты кодируют уникальные белки: белки оболочки VP1a и VP1b, предположительно капсидный белок VP2 и мембранный белок VP3.

Группа *Jingmenvirus* включает в себя такие вирусы, как *Jingmen tick virus*, *Alongshan virus* (ALSV),

Yanggou tick virus и *Takachi virus* [1, 5, 6]. Они имеют широкое географическое распространение и детектируются в кровососущих членистоногих (в особенности в клещах) и млекопитающих, в том числе найдены в сыворотках людей [3, 7–13]. Вирусы ALSV и *Jingmen tick*, по-видимому, могут вызывать острую инфекцию у людей, сопровождающуюся лихорадкой [1, 14–16]. ALSV был впервые обнаружен и выделен из крови больного с лихорадочным заболеванием в Китае [17]. Позднее ALSV был выявлен методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) у других больных: было обследовано 86 человек с высокой температурой, головной болью и присасыванием клещей в анамнезе в период с мая по июль 2017 г. [17]. Также вирус был детектирован в клещах *Ixodes persulcatus* и различных видах комаров (*Anopheles yatsushiroensis*, *Aedes vexans*, *Culex pipiens pallens* и *Culex tritaeniorhynchus*) в Китае.

В России в клещах вирус был обнаружен на территориях Калининградской, Челябинской, Улья-

новской областей и в республиках Алтай, Татарстан, Карелия и Тыва [5, 18–20]. В связи с описанными случаями заболевания людей важной задачей являются эпидемиологические исследования представителей группы Jingmenvirus.

На данный момент не известно, к какому из белков вырабатываются антитела при инфекции, вызванной Jingmenvirus. Для определения ALSV-специфических антител у овец и крупного рогатого скота в Китае методом иммуноферментного анализа (ИФА) авторами был успешно использован рекомбинантный белок VP2 [17]. ALSV-специфические антитела были обнаружены у 9,2% (22/240) обследованных овец и 4,6% (11/240) обследованного крупного рогатого скота. В 2019 г. финскими учёными были использованы конструкции, кодирующие белки оболочки ALSV VP1a, VP1b, VP2 и VP3, трансфицированные в клетки млекопитающих Vero E6. Эти клетки были использованы для выявления антител в сыворотках 900 пациентов методом иммунофлуоресценции [21].

Цель работы — получение рекомбинантных белков ALSV и использование их в лабораторной диагностической тест-системе для определения наличия антител к вирусу.

Материалы и методы

Вирусы и клетки

Для получения рекомбинантных белков был использован штамм Miass527 ALSV, изолированный из клещей *I. persulcatus*, собранных в 2014 г. в г. Миасс Челябинской области (код доступа NCBI: MN648770–MN648773) [1]. Рекомбинантный белок sE ВКЭ был любезно предоставлен В.С. Барышниковой [22].

Для клонирования были использованы клетки *Escherichia coli*, штамм TOP10 («Promega»), для экспрессии рекомбинантных белков — штаммы JM109 и BL21 («Promega»).

Получение гипериммунных сывороток крови

Для получения гипериммунных сывороток в работе использовали беспородных мышей ICR (Научный центр биотехнологии), которых иммунизировали под кожу ALSV (штамм Miass527) с адьювантом Фрейнда («BD») 3 раза (1 раз в неделю), через 10 дней после последней инъекции тотально забирали кровь (декапитация). Полученные сыворотки от 3 мышей к ALSV использовали в иммуноблоттинге и ИФА. Сыворотка от 1 мыши к ВКЭ (штамм КЭ-328) была любезно предоставлена В.С. Барышниковой [22]. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку неиммунизированной мыши.

Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Федерального научного центра исследо-

ваний и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита) (протокол № 200923-1 от 20.09.2023).

Сыворотки условно здорового населения

Сыворотки условно здоровых людей, имеющих антитела к ВКЭ, из Москвы и Московской области были любезно предоставлены Центром гигиены и эпидемиологии в Московской области.

Биоинформатический анализ

Для определения сигнальных пептидов, гидрофильных и гидрофобных участков белков использовали программу «SignalP 4.1 Server»¹, для определения массы белков — программы DNA to Protein на сайте Zbio.net.

Клонирование генов белков VP2 и VP3 вируса Alongshan (штамм Miass527)

Обратную транскрипцию проводили с использованием обратной транскриптазы «Invitrogen SuperScript III» («Thermo Fisher Scientific»).

ПЦР проводили с помощью амплификатора «Veriti 96 Well Thermal Cycler» («Applied Biosystems»), используя полимеразу Platinum Super Fi II («Thermo Fisher Scientific»).

Состав смеси для ПЦР: буфер SuperFi 10 мкл, нуклеотиды 2,5 мМ 1 мкл, праймеры по 1 мкл, полимеразу Platinum SuperFi II 1 мкл, кДНК 2 мкл, вода 32 мкл. Общий объём 50 мкл.

Программа ПЦР для полимеразы Platinum Super Fi II:

- 98°C 30 с;
- 98°C 10 с;
- 60°C 10 с;
- 72°C 30 с/30 циклов;
- 72°C 5 мин.

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции:

- *Bam*HI и *Hind*III («Thermo Fisher Scientific») для плазмиды pQE32 («Qiagen») и ампликонов VP2 и VP3;
- *Bam*HI и *Xho*I («Thermo Fisher Scientific») для плазмиды pet28a+ (коллекция плазмид ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН) и ампликона VP2.

После рестрикции полученные векторы и вставки наносили на 1% агарозный гель («Пан-Эко») на основе 1xTBE буфера: 0,09 М Трис («ДиаМ»), 0,09 М H₃BO₃ («Пушинские лаборатории»), 2 мМ EDTA («ДиаМ») и очищали с помощью центрифужных колонок («Qiagen»).

Концентрацию ДНК измеряли по оптической плотности на приборе «NanoDrop One» («Thermo

¹ SignalP 4.1 Server».

URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>

Fisher Scientific»). Реакцию лигирования проводили с помощью лигазы T4 DNA («Thermo Fisher Scientific»). Вектор и вставку брали в соотношении 5 : 1.

Клетки *E. coli* TOP10 трансформировали полученными лигазными смесями методом теплового шока и растили в среде LB (табл. 1) при 37°C. Наличие вставки проверяли методом ПЦР с праймерами для клонирования. С помощью метода секвенирования по Сэнгеру подтверждали наличие тэга 6 гистидинов, старт и стоп кодонов, отсутствие несинонимических замен. Секвенирование проводили с помощью набора «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» («Thermo Fisher Scientific») на приборе «Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer» («Waltham»).

Трансформация и культивирование клеток *E. coli* при экспрессии

При трансформации для экспрессии белков использовали штаммы: для плазмиды pQE32 — штамм JM109, для pet28a+ — штамм BL21. Для культивирования клеток использовали среды: LB, SOB и TB (табл. 1).

Затем отбирали одну колонию клеток с чашки Петри и растили её в 5 мл среды с добавлением антибиотика 100 нг/мл (ампициллин — для pQE32, канамицин — для pet28a+) в течение 18 ч. Далее клеточную суспензию переносили в 250 мл среды с ампициллином 100 нг/мл или канамицином 50 нг/мл. При достижении клеточной массы оптической плотности 0,5–0,8 при длине волны 600 нм ($9,6 \times 10^9$ клеток/мл) добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ; «Helicon»). Инкубировали клетки при различной температуре и времени при перемешивании. Далее клеточную массу осаждали центрифугированием при 1700g, 4°C в течение 30 мин, полученный осадок промывали 50 мл фосфатно-солевого буфера (PBS; «Sigma-Aldrich»).

Таблица 1. Состав сред для индукции экспрессии целевого белка в клетках *E. coli* JM109 и BL21

Среда	Ингредиенты	Концентрация, г/л
LB	Триптон («ДиаМ»)	10
	Дрожжевой экстракт («Sigma-Aldrich»)	5
	NaCl («Fluka»)	10
SOB	Триптон	20
	Дрожжевой экстракт	5
	NaCl	0,585
	KCl («Fluka»)	0,185
TB	Триптон	12
	Дрожжевой экстракт	24
	Глицерин 99% («Sigma-Aldrich»)	20*

Примечание. *Концентрация глицерина указана в мл/л.

Условия, при которых проводили экспрессию рекомбинантных белков, если не указано иного: время инкубации клеток — 12 ч в среде LB при 37°C и концентрации ИПТГ 0,5 мМ.

Разрушение клеток ультразвуком

Клеточную массу переосаждали в 20 мл лизирующего буфера (HEPES 100 мМ («ДиаМ»), NaCl 0,15 М, pH 8,5) и обрабатывали ультразвуком (прибор «Soniprep 150», «MSE») следующим образом: 3 раза по 1 мин импульсом 7 мс на льду. Далее клетки центрифугировали (7800g, 4°C, 30 мин), осадок ресуспендировали в 20 мл лизирующего буфера с 8 М мочевиной (для выхода белка в растворимую фракцию) и обрабатывали ультразвуком 1 раз 30 с, после чего центрифугировали (7800g, 4°C, 30 мин).

Выделение и очистка рекомбинантных белков

Очистку рекомбинантных белков проводили методом аффинной хроматографии с помощью готового набора для выделения Ni-NTA Fast Start («Qiagen»).

Смену буфера на PBS и концентрирование проводили с помощью центрифужных ультрафильтров «Amicon Ultra-15» 10 кДа («Merck»).

Полученные рекомбинантные белки разделяли электрофорезом в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях (ПААГ-SDS). Для определения концентрации целевых белков использовали калибровочный график, построенный по известным концентрациям BSA («Genesystool»). Далее концентрацию целевого белка измеряли с помощью прибора «GBox» («Syngene») в программе «GeneTools» («Syngene»).

Получение отрицательного контроля (Mock)

Для получения отрицательного контроля (Mock) были проведены те же манипуляции с плазмидами pQE-32 и pet28a+ без вставки, что и с конструкциями со вставкой: трансформация, культивирование соответствующих бактериальных клеток, экспрессия, выделение и очистка. Далее контроль использовали для визуализации в ПААГ, иммуноблоттинге и ИФА.

Иммуноблоттинг

Полученные рекомбинантные белки разделяли электрофорезом в 15% ПААГ-SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad»). Мембрану инкубировали с 5% обезжиренным коровьим молоком («Best Value») в трис-солевом буфере (TBS: 25 мМ Tris, 0,15 М NaCl, pH 8,3) в течение 1 ч.

Затем мембрану инкубировали с целевой сывороткой 1 ч: мыши, человека или к гистидиновому тэгу. Далее промывали мембрану TBS с 0,05% Твин-20

(TBS-T) и инкубировали с меченными пероксидазой хрена (HRP) антителами против IgG мыши или человека соответственно («Abcam») в течение 1 ч. В случае использования HRP-меченных антител к гистициновому тэгу («Abcam») инкубирование со вторичными мечеными антителами не требуется.

Перед проявлением мембрану снова промывали TBS-T, затем проявляли с использованием набора «ECL» («Bio-Rad») в гель-документирующей системе «Genesys» («Genesys»).

Иммуоферментный анализ

В лунку 96-луночного планшета вносили 80 нг белка, разведённого в PBS, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали PBS, инкубировали с 4% обезжиренным коровьим молоком («Best Value») в PBS в течение 1 ч, затем с сыворотками мышей в PBS с 0,05% Твин-20 1 ч. Планшет промывали, инкубировали с HRP-конъюгированными антителами против мышиного IgG («Abcam») соответственно в течение 1 ч, после чего промывали и вносили субстрат TMB («Sigma-Aldrich»), через 30 мин реакцию останавливали 2 М серной кислотой («Ленреактив»). Результаты детектировали при длине волны 450 нм на спектрофотометре («Thermo Fisher Scientific»).

Результаты

Выбор и получение мишеней для клонирования

В нашей работы был выбран предположительно капсидный белок VP2, т. к. китайскими учёными уже были обнаружены антитела у крупного рогатого скота к данному белку [13], а также мембранный белок VP3, который был клонирован впервые в нашей работе. Белки кодируются в 4-м сегменте генома ALSV.

Для белка VP2 была определена последовательность сигнального пептида (19 ак), гидрофобных участков он не имеет — для клонирования был выбран участок без сигнального пептида 243 ак, т. к. он мог затруднить последующее выделение белка. Белок VP3 содержит 9 трансмембранных гидрофобных доменов — для клонирования были выбраны гидрофильные участки 1–89 и 244–389 ак

(рис. 1). Предположительные размеры белков: VP2 — 25 кДа, а гидрофильные участки белка VP3-1 и VP3-2 — 10 и 18 кДа соответственно.

Далее на основании нуклеотидных последовательностей белка VP2 и гидрофильных участков белка VP3 были подобраны праймеры (табл. 2) и получены соответствующие ПЦР-продукты (рис. 2).

Получение векторных конструкций

Конструкция со вставкой участка 244–389 ак белка VP3 на основе вектора pQE-32 оказалась удачной (рис. 3, 4). Однако с другими вставками на

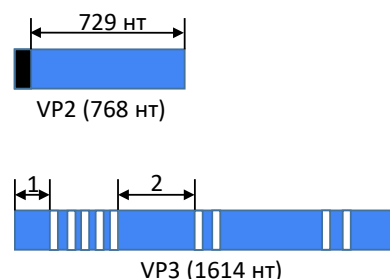


Рис. 1. Схематическое изображение целевых участков VP2 и VP3 для клонирования.

Черный фрагмент — сигнальный пептид белка VP2, белые — трансмембранные домены белка VP3. 1 — участок белка VP3 1–267 ак, 2 — участок белка VP3 244–389 ак.

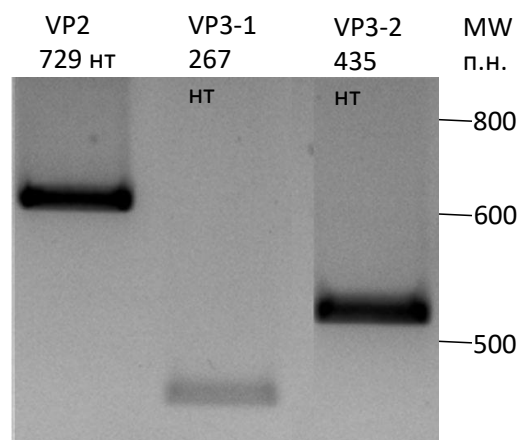


Рис. 2. Электрофоретический анализ ампликонов целевых участков гена белков VP2 и VP3.

MW — маркер длины ДНК. VP2 — участок, кодирующий 1–89 ак; VP3 — участок, кодирующий 244–389 ак VP3.

Таблица 2. Праймеры для клонирования белка VP2 и гидрофильного участка белка VP3

Праймер	Последовательность, 5'→3'	Участок генома на основе последовательности вируса Alongshan (GenBank #MN648773.2)
VP2-28s	GAGCTAGGATCCAAGCCAAACGGAGCCCCAGAT	168–188
VP2-28as	GAGCTACTCGAGCTACTGAAAAACCTGGTAGTTG	857–872
VP3s 244–389	GAGCTAGGATCCGACAAGGATCAAGCCTACCTC	1576–1597
VP3as 244–389	TAGCTCAAGCTTCCATTGGGTGTAGACCAGGT	1998–2017
МiVP3s 1–89	GCTAGGATCCGTGCGACCCCAACTACCAGGT	848–868
МiVP3as 1–89	TAGCTCAAGCTT TCTCTCCTCCAGTCGCC	1095–1114

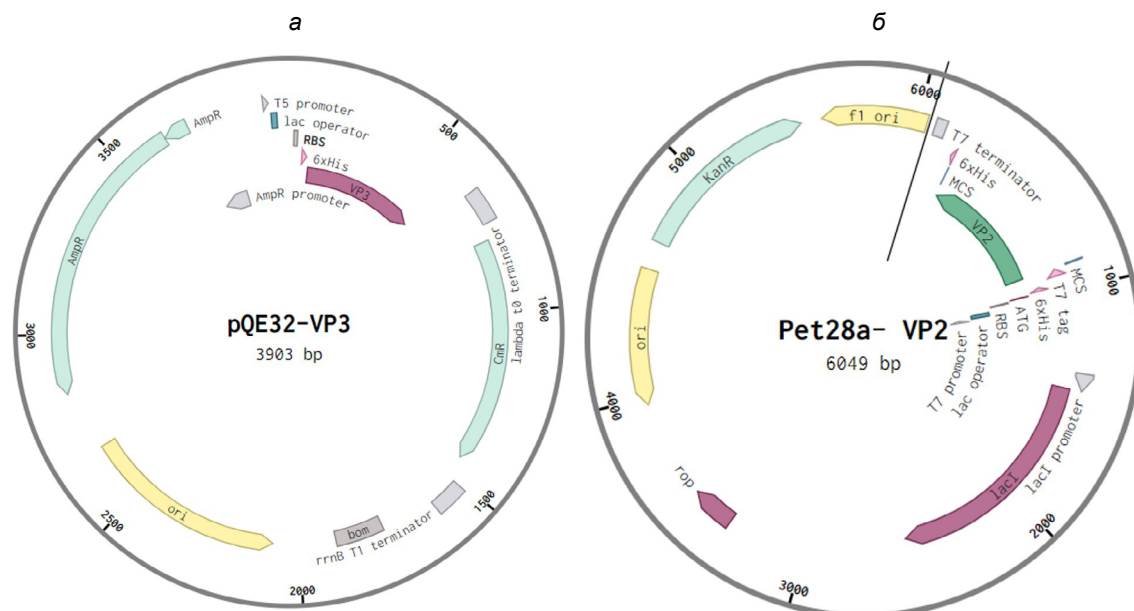


Рис. 3. Генно-инженерные конструкции, с которыми была показана экспрессия.

а — конструкция плазмиды pQE-32 и участка белка VP3; б — конструкция плазмиды pet28a и участка белка VP2.

AmpR — ген устойчивости к ампициллину; *lac operator* — лактозный оператор; bp — нуклеотиды; *KanR* — ген устойчивости к канамицину; RBS — сайт посадки рибосомы; 6xHis — сайт 6 гистидинов; MCS — сайты рестрикции.

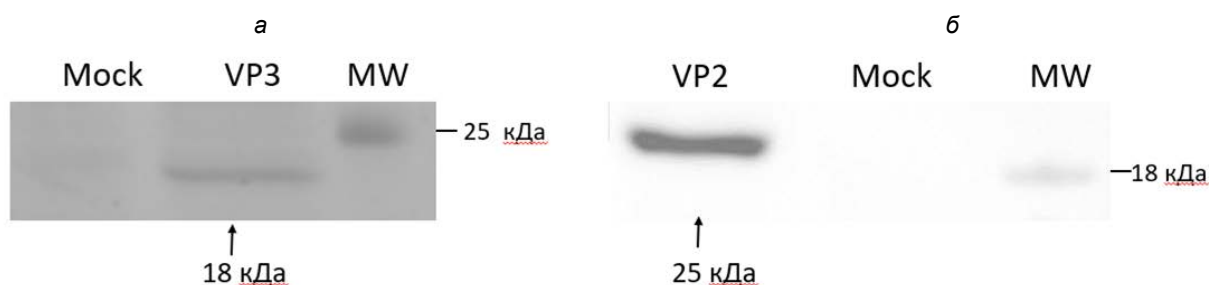


Рис. 4. Результаты иммуноблотинга рекомбинантных белков VP3 (а) и VP2 (б) с антителами к гистидину.

основе вектора pQE-32 экспрессия рекомбинантных белков либо не происходила (в случае вставки VP2), либо приводила к гибели бактериальных клеток на 3 ч культивирования (в случае вставки участка 1–267 ак белка VP3), что говорит о возможной токсичности белка для данных бактериальных клеток. В связи с этим нами было принято решение собрать новую генно-инженерную конструкцию плазмиды pET28a+ со вставкой белка VP2 (рис. 3).

Успешность экспрессии белков в конструкциях pQE-32-244-389 и pet28a-VP2 была подтверждена с использованием антител к гистидиновой метке. Оба рекомбинантных белка показали положительные результаты в вестерн-блоте (рис. 4). Культивирование клеток проходило при условиях: среда LB, 37°C, концентрация ИПТГ 0,5 mM, 12 ч.

Оптимизация условий экспрессии рекомбинантных белков

Для повышения выхода белков был предпринят ряд экспериментов. Оптимизировали следующие параметры: среду культивирования клеток,

длительность инкубации с ИПТГ, концентрацию ИПТГ и температуру роста клеток. На **рис. 5** показано, что наибольшая концентрация целевого белка VP3 достигается при добавлении 0,5 mM ИПТГ при росте бактерий 12 ч при 37°C. Использование различных сред LB, SOB и TB не влияло на экспрессию рекомбинантного участка белка VP3 (рис. 5, в).

В связи с этим нами были определены рабочие условия экспрессии целевого белка — культивирование клеток в течение 12 ч с концентрацией индуктора лактозного оператора 0,5 mM при 37°C в среде LB.

Изменения условий среды, концентрации ИПТГ и температуры не повлияли на экспрессию рекомбинантного белка VP2 в клетках *E. coli*, штамм BL21 (**рис. 6**), но при увеличении времени роста клеток бактерий экспрессия увеличивалась.

Поскольку среда для бактерий, температура их роста и концентрация ИПТГ не повлияли на экспрессию рекомбинантного белка VP2, нами были выбраны рабочие условия экспрессии: культивирование клеток в течение 12 ч при 37°C с концентрацией индуктора лактозного оператора 0,5 mM в среде LB.

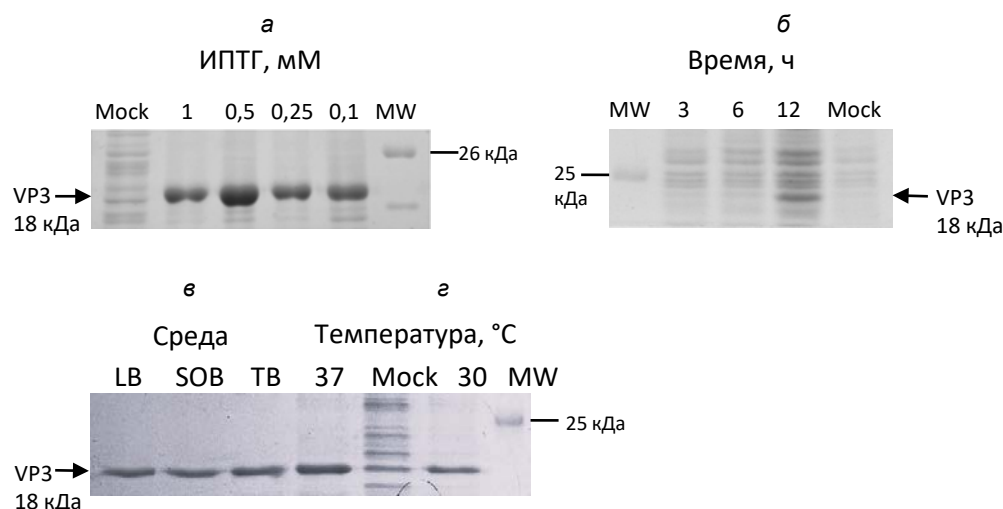


Рис. 5. Электрофоретический анализ рекомбинантного участка белка VP3 244–389 ак в ПААГ при различных концентрациях ИПТГ (а), времени (б), среде (в) и температуре (г) экспрессии для целевого белка.

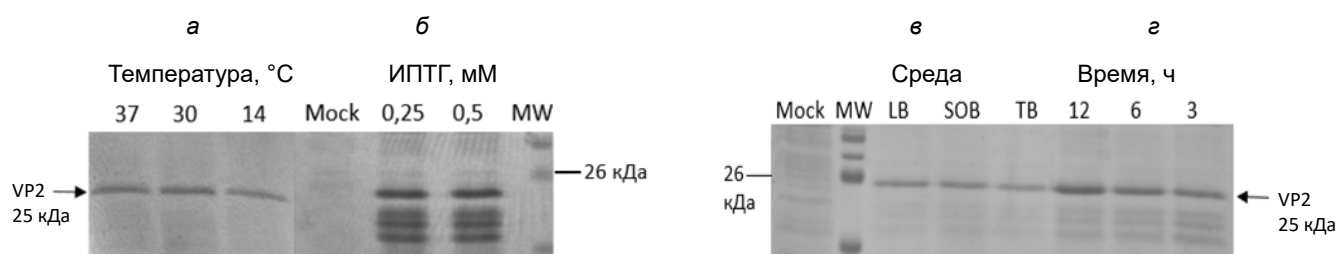


Рис. 6. Электрофоретический анализ рекомбинантного участка белка VP2 в ПААГ при различных температуре (а), концентрации ИПТГ (б), среде (в) и времени (г) экспрессии для целевого белка.

Выделение рекомбинантных белков

Одним из важных этапов для дальнейшего выделения белков является определение их растворимости. Для рекомбинантного участка белка VP3 было определено, что он находится в растворимой фракции без мочевины (**рис. 7**). Целевой белок VP2 находится в нерастворимой фракции (с 8 М мочевиной), что могло затруднить его дальнейшее получение и очистку. При этом добавление ингибиторов сериновых протеаз, которое может повлиять на растворимость белка, не дало результатов — для выделения рекомбинантного белка VP2 необходимо добавление мочевины.

Далее рекомбинантные белки очищали на гравитационной колонке методом аффинной хроматографии (**рис. 8**). После обессоливания и концентрирования на центрифужных фильтрах измеряли концентрацию белков по методу Брэдфорда: для рекомбинантного участка белка VP3 она составила 70 мкг/мл, для белка VP2 — 120 мкг/мл (при экспрессии белков в 250 мл среды с клеточной массой).

С помощью вестерн-блота и использования гипериммунных мышинных сывороток к ALSV была показана способность рекомбинантного белка VP2 взаимодействовать с противовирусными антителами. Были проверены 3 гипериммунные мышинные сыворотки — белок VP2 взаимодей-

ствовал со всеми, в то время как рекомбинантный участок белка VP3 был выявлен только с одной. В качестве примера на **рис. 9** приведён иммуноблот рекомбинантных белков VP2 и VP3 с гипериммунной мышинной сывороткой. В качестве отрицательной сыворотки в вестерн-блоте была использована сыворотка неиммунизированной мыши.

Для доказательства специфичности рекомбинантного белка VP2 в вестерн-блоте также использовали мышинные сыворотки к ВКЭ (**рис. 10**). В качестве положительного контроля служил рекомбинантный белок ВКЭ sE [22]. Полученный нами белок VP2 не связывался с антителами к ВКЭ.

Результаты вестерн-блот-анализа были подтверждены в ИФА с мышинной гипериммунной сывороткой к ALSV (**рис. 11**). Для определения рабочей концентрации рекомбинантных белков в ИФА были проверены разные концентрации белка (20, 40, 80 и 120 нг/лунку) и разведение сыворотки (1 : 180 и 1 : 360). Оптимальной оказалась концентрация белка 80 нг/лунку. В качестве отрицательного контроля использовалась сыворотка неиммунизированной мыши. Для дополнительного подтверждения результатов мышинная гипериммунная сыворотка к ALSV также была проверена в ИФА, где в качестве подложки использовалась плазмида, с которой были произведены все те же манипуляции, что и с

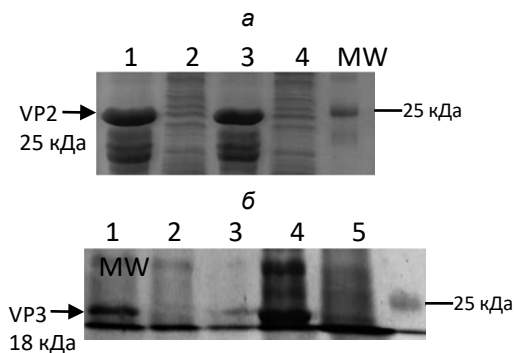


Рис. 7. Определение фракций целевых белков VP2 (а) и VP3 (б) в ПААГ.

а — лизат клеток после сонификации в лизирующем буфере: 1 — с 8 М мочевиной; 2 — без добавок; 3 — с 8 М мочевиной и ингибиторами сериновых протеаз; 4 — с ингибиторами сериновых протеаз. б — клеточный лизат после 12 ч культивирования (1), Mock (2), лизат клеток до добавления ИПТГ (3), лизат клеток после сонификации в лизирующем буфере (4), фракция осадка с 8 М мочевиной (5).

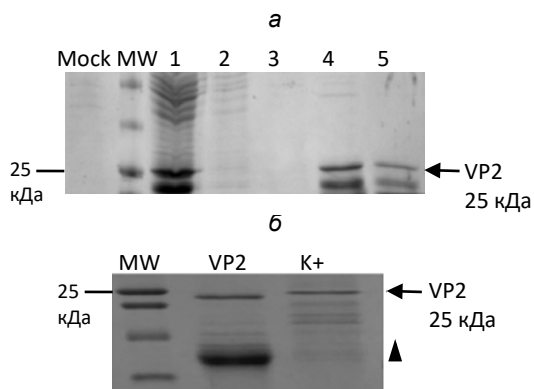


Рис. 8. Выделение целевого белка VP2 в ПААГ с помощью набора «Qiagen Ni-NTA Fast Start» (а) и обессоливание с помощью амиконов (б).

а: 1 — белок VP2 в лизирующем буфере с 8 М мочевиной; 2 — фракция проска; 3 — фракция промывки колонки wash-буфером; 4 — элюат, содержащий целевой белок; 5 — элюат, содержащий продукты деградации белка. б — рекомбинантный белок VP2 и продукты его деградации (обозначение: треугольник); K+ — положительный контроль.

плазмидой со вставкой и рекомбинантным белком при выделении (Mock).

Положительные результаты ИФА и вестерн-блот позволяют использовать белок VP2 для детекции антител против ALSV в сыворотках.

Анализ сывороток условно здоровых людей

С помощью полученных нами рекомбинантных белков были проверены 30 сывороток условно здоровых людей из Москвы и Московской области, имеющих антитела к ВКЭ. При анализе методом ИФА использовали образцы целевого белка в концентрации 80 нг/лунку, в качестве отрицательного контроля в подложке был использован Mock (имел ту же концентрацию по общему белку), а в качестве отрицательной сыворотки — сыворотка условно здорового человека, не имевшего антитела к ВКЭ.

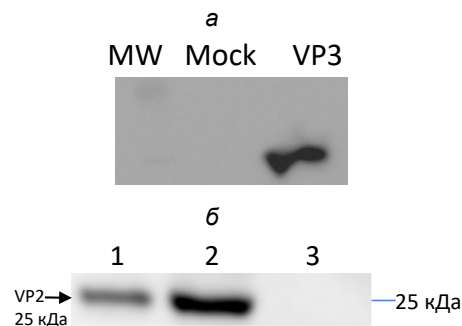


Рис. 9. Результаты иммуноблотинга целевого белка с сывороткой мыши, иммунизированной вирусом Alongshan (штамм Miass527).

а — экспрессия рекомбинантного белка VP3; б — лизат клеток после экспрессии рекомбинантного белка VP2 (1), выделенного и обессоленного рекомбинантного белка VP2 (2), Mock (3). Для детекции использовали HRP-меченные антитела против IgG мыши («Abcam»).

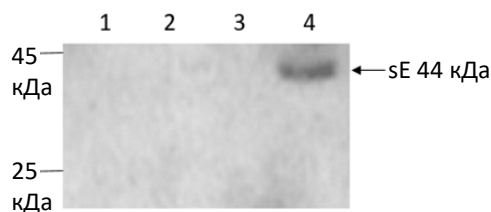


Рис. 10. Результаты иммуноблотинга целевого белка мышинной гипериммунной сыворотки к ВКЭ (штамм КЭ-328).

Для детекции использованы HRP-меченные антитела против IgG мыши («Abcam»). 1 — выделенный и обессоленный рекомбинантный белок VP2; 2 — Mock; 3 — лизат клеток СПЭВ без вируса ВКЭ; 4 — рекомбинантный белок sE размером 44 кДа [22].

Таким образом, была выявлена 1 сыворотка, содержащая антитела к белку VP2 ALSV. К рекомбинантному участку 244–389 ак белка VP3-антител не обнаружено.

Для подтверждения результатов ИФА нами был проведён вестерн-блот положительной в ИФА сыворотки пациента (рис. 12).

Обсуждение

Ранее белок VP2 уже был получен китайскими учёными с помощью вектора pET30a, который экспрессировали при 15°C в клетках BL21 (DE3) *E. coli* [17]. В нашей работе было показано, что белок VP2 успешно экспрессируется с использованием плазмиды плазмиды pet28a(+), также была опробована низкая температура культивирования клеток, но это не повлияло на уровень экспрессии рекомбинантного белка. Эффективное выделение рекомбинантного белка VP2 проходит при добавлении 8 М мочевины. При этом было показано, что впервые полученный нами рекомбинантный участок белка VP3 (вектор pQE-32) является растворимым. Выход целевого продукта выше с вектором pet28a(+), чем с pQE-32, при этом полученных

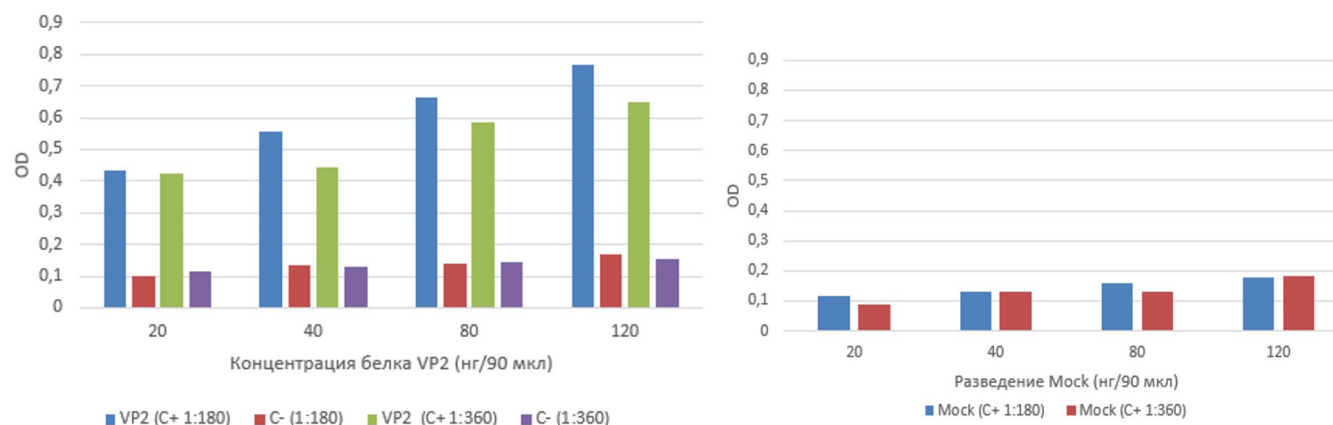


Рис. 11. Анализ мышинной гипериммунной сыворотки к вирусу Alongshan Miass527 с рекомбинантным белком VP2 (а) и Mock (б).

Лунки 96-луночного планшета сенсibilizировали раствором белка VP2; в анализе использована гипериммунная мышинная сыворотка к вирусу Alongshan (C+) и сыворотка неиммунизированной мыши (C-) с указанными на рисунке разведениями. Для детекции использованы HRP-меченные антитела против IgG мыши («Abcam»).

концентраций обоих белков достаточно для многократного проведения ИФА.

С помощью рекомбинантного белка VP2 были выявлены антитела у крупного рогатого скота в Китае [17]. В нашей работе мы подтвердили, что белок VP2 обладает антигенными свойствами в иммуноблоте и ИФА. Впервые нами было показано, что полученный нами рекомбинантный пептид VP2 ALSV штамм Miass527 не имеет антигенных перекрестов с ВКЭ в вестерн-блоте. Показано, что при иммунизации мышей живым ALSV более регулярно синтезируются антитела к рекомбинантному белку VP2 и менее регулярно — к рекомбинантному участку белка VP3. Возможно, это связано с различным спектром антител в полученных мышинных сыворотках — белок VP2 взаимодействует с большим спектром антител, выработанных на разных этапах инфекции. Также в ИФА были обнаружены антитела у условно здорового человека с укусом клеща в анамнезе к рекомбинантному пептиду VP2, а к рекомбинантному пептиду VP3 антител в сыворотках людей не обнаружено.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Wang Z.D., Wang B., Wei F., et al. A new segmented virus associated with human febrile illness in China. *N. Engl. J. Med.* 2019;380(22):2116–25. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805068>
- Ackermann M., Padmanabhan R. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J. Biol. Chem.* 2001;276(43):39926–37. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M104248200>
- Webster C.L., Waldron F.M., Robertson S., et al. The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 2015;13(7):e1002210. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002210>
- Qin X.C., Shi M., Tian J.H., et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(18):6744–9. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>



Рис. 12. Результаты иммуноблотинга целевого белка с сывороткой условно здорового человека.

Для детекции использовали HRP-меченные антитела против IgG человека («Abcam»).

- Kholodilov I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses.* 2020;12(4):362. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12040362>
- Kholodilov I.S., Belova O.A., Ivannikova A.Y., et al. Distribution and characterisation of tick-borne flavi-, flavi-like, and phenuiviruses in the Chelyabinsk region of Russia. *Viruses.* 2022;14(12):2699. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14122699>
- Maruyama S.R., Castro-Jorge L.A., Ribeiro J.M., et al. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014;109(1):38–50. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-0276130166>
- Vandegrift K.J., Kapoor A. The ecology of new constituents of the tick virome and their relevance to public health. *Viruses.* 2019;11(6):529. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11060529>
- Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. *Cell Host Microbe.* 2016;20(3):357–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>
- Kobayashi D., Kuwata R., Kimura T., et al. Detection of jingmenviruses in Japan with evidence of vertical transmission in ticks. *Viruses.* 2021;13(12):2547. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13122547>
- Temmam S., Bigot T., Chrétien D., et al. Insights into the host range, genetic diversity, and geographical distribution of jingmenviruses. *mSphere.* 2019;4(6):e00645–19. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00645-19>
- Dinçer E., Hacıoğlu S., Kar S., et al. Survey and characterization of Jingmen tick virus variants. *Viruses.* 2019;11(11):1071. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11111071>
- Pascoal J.O., Siqueira S.M., Maia R.D.C., et al. Detection and molecular characterization of Mogiana tick virus (MGTV) in *Rhipicephalus microplus* collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*

- 2019;10(1):162–5.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.10.002>
14. Терновой В.А., Гладышева А.В., Семенцова А.О. и др. Обнаружение РНК нового многокомпонентного вируса у больных Крымской-Конго геморрагической лихорадкой на юге России. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2020;75(2):129–34. Ternovoi V.A., Gladysheva A.V., Sementsova A.O., et al. Detection of the RNA for new multicomponent virus in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Russia. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2020;75(2):129–34.
DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn1192>
EDN: <https://elibrary.ru/jfodao>
 15. Taniguchi S. Detection of Jingmen tick virus in human patient specimens: emergence of a new tick-borne human disease? *EBioMedicine*. 2019;43:18–9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.034>
 16. Jia N., Liu H.B., Ni X.B., et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: a retrospective study. *EBioMedicine*. 2019;43:317–24.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.004>
 17. Wang Z.D., Wang W., Wang N.N., et al. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China. *Parasit. Vectors*. 2019;12(1):450.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3707-1>
 18. Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Курушина В.Ю. и др. Встречаемость и генетическое разнообразие вируса Алонгшан (*Flaviviridae*), выявленного в клещах на юге Вос- точной Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2024;69(2):151–61. Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Kurushina V.Yu., et al. Prevalence and genetic diversity of the Alongshan virus (*Flaviviridae*) circulating in ticks in the south of Eastern Siberia. *Problems of Virology*. 2024;69(2):151–61.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-223>
EDN: <https://elibrary.ru/jwvfoc>
 19. Morozkin E.S., Makenov M.T., Zhurenkova O.B., et al. Integrated *Jingmenvirus* polymerase gene in *Ixodes ricinus* genome. *Viruses*. 2022;14(9):1908.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v14091908>
 20. Kholodilov I.S., Belova O.A., Morozkin E.S., et al. Geographical and tick-dependent distribution of flavi-like Alongshan and Yanggou tick viruses in Russia. *Viruses*. 2021;13(3):458.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v13030458>
 21. Kuivanen S., Levanov L., Kareinen L., et al. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in *Ixodes ricinus* ticks, south-eastern Finland, 2019. *Euro. Surveill.* 2019;24(27):1900394.
DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.27.1900394>
 22. Барышников В.С., Турченко Ю.В., Шишова А.А. и др. Рекомбинантный гликопротеин Е вируса клещевого энцефалита для создания дифференцирующей тест-системы. *Биотехнология*. 2022;38(6):73–83. Baryshnikova V.S., Turchenko Yu.V., Shishova A.A., et al. Recombinant glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus for a developing differentiated test system. *Biotechnologiya*. 2022;38(6):73–83.
DOI: <https://doi.org/10.56304/S0234275822060023>
EDN: <https://elibrary.ru/hzxfvy>

Информация об авторах

Бондаренко Екатерина Владимировна — м. н. с. лаб. биохимии ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, bondarenko_ev@chumakovs.su, katebondlie@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5972-0761>

Ермолаева Елена Александровна — м. н. с. лаб. биохимии ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, le.ermolaeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0406-0604>

Холодильов Иван Сергеевич — канд. мед. наук, в. н. с. лаб. биологии арбовирусов ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, ivan-kholodilov@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3764-7081>

Литов Александр Геннадьевич — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. биологии арбовирусов ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, novosti-wxo@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6086-3655>

Участие авторов: Бондаренко Е.В., Ермолаева Е.А. — визуализация, написание и подготовка рукописи; Холодильов И.С., Литов А.Г. — руководство и научное редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 23.01.2025;
принята к публикации 27.03.2025;
опубликована 28.04.2025

Information about the authors

Ekaterina V. Bondarenko — junior researcher, Laboratory of biochemistry, M.P. Chumakov Federal Research Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute), Moscow, Russia, bondarenko_ev@chumakovs.su, katebondlie@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5972-0761>

Elena A. Ermolaeva — junior researcher, Laboratory of biochemistry, M.P. Chumakov Federal Research Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute), Moscow, Russia, le.ermolaeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0406-0604>

Ivan S. Kholodilov — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of arboviruses biology, M.P. Chumakov Federal Research Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute), Moscow, Russia, ivan-kholodilov@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3764-7081>

Alexander G. Litov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of arboviruses biology, M.P. Chumakov Federal Research Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute), Moscow, Russia, novosti-wxo@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6086-3655>

Authors' contribution: Bondarenko E.V., Ermolaeva E.A. — visualization, writing and preparation of manuscript; Kholodilov I.S., Litov A.G. — management and scientific editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 23.01.2025;
accepted for publication 27.03.2025;
published 28.04.2025