

ЛИТЕРАТУРА

1. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения. *Acta Naturae*. 2009, 1: 32-50.
2. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габитов А.Г., Кирпичников М.П. Неприродные антитела и иммуноконъюгаты с заданными свойствами: оптимизация функций через направленное изменение структуры. *Успехи химии*. 2015, 84 (1): 1-26.
3. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М., Мир, 2000.
4. Imai S., Mukai Y., Nagano K. et al. Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29 (7): 1325-1330.
5. Kreitman R.J. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J.* 2006, 8 (3): 532-551.
6. Pai L.H., Wittes R., Setser A. et al. Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to *Pseudomonas* exotoxin. *Nat. Med.* 1996, 2: 350-353.
7. Redwan R.M. Animal-derived pharmaceutical proteins. *J. Immunoassay Immunochem.* 2009, 30 (3): 262-290.
8. Teicher B.A., Chari R.V. Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clin. Cancer. Res.* 2011, 17 (20): 6389-6397.
9. Witzig T.E. Radioimmunotherapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2006, 19: 655-668.

Поступила 10.07.17

Контактная информация: Оксанич А.С.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Г.И.Алаторцева¹, А.В.Сидоров¹, Л.Н.Нестеренко¹, Л.Н.Лухверчик¹,
М.В.Жукина¹, И.И.Амиантова¹, А.В.Милованова¹, Д.С.Воробьев¹,
Ю.И.Амур¹, М.И.Михайлов^{1,2}, К.К.Кюрегян^{1,2}, В.С.Кичатова^{1,2},
И.А.Потемкин^{1,2}, О.В.Исаева^{1,2}, Е.Ю.Малинникова^{1,2},
А.А.Карлсен^{1,2}, В.М.Блинов¹, З.Ш.Нурматов³, А.З.Нурматов³,
О.Т.Касымов³, С.В.Жаворонок⁴, В.В.Зверев¹*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ORF3 ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 1 ГЕНОТИПА С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ОПТИМИЗАЦИИ КОДОНОВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия; ³НПО «Профилактическая медицина», Бишкек, Кыргызская Республика; ⁴Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Цель. Получение рекомбинантного аналога полноразмерного белка ORF3 вируса гепатита Е (ВГЕ) 1 генотипа. **Материалы и методы.** Штаммы *Escherichia coli*, плазмидные векторы, серологический и клинический материал, иммуноферментные тест-системы. Молекулярно-биологические, биоинформационные, биотехнологические, биохимические и серологические методы. **Результаты.** Из препарата РНК ВГЕ 1 генотипа, выделенного от больного из Киргизии, получена рекомбинантная плазида, содержащая ДНК копию субгеномной вирусной РНК. С использованием данной плазмиды получены штаммы *E.coli* — продуценты рекомбинантного антигена ORF3 ВГЕ 1 генотипа в виде слитного с β-галактозидазой *E.coli* полипептида, содержащего полноразмерную копию белка ORF3. Для повышения уровня экспрессии рекомбинантного белка проведена оптимизация кодонов клонированного фрагмента кДНК. Рекомбинантный белок ORF3 выделен из телец-включений биомассы штамма-продуцента и очищен методом эксклюзионной хроматографии. Антигенная специфичность полученного полипептида подтверждена методами иммуноферментного анализа и вестерн-блоттинга со специфическими сыворотками. **Заключение.** Разработан рекомбинантный антиген ORF3 ВГЕ 1 генотипа и экспериментально показана возможность его применения в диагностических тестах.

Ключевые слова: вирус гепатита E, ВГЕ 1 генотипа, ген orf3, рекомбинантный антиген ORF3, ИФА, вестерн-блоттинг

G.I. Alatortseva¹, A.V. Sidorov¹, L.N. Nesterenko¹, L.N. Luhverchik¹,
M.V. Zhukina¹, I.I. Amiantova¹, A.V. Milovanova¹, D.S. Vorobev¹,
Yu. I. Ammur¹, M.I. Mikhailov^{1,2}, K.K. Kyuregyan^{1,2}, V.S. Kichatova^{1,2},
I.A. Potemkin^{1,2}, O.V. Isaeva^{1,2}, E. Yu. Malinnikova^{1,2},
A.A. Karlsen^{1,2}, V.M. Blinov¹, Z.Sh. Nurmatov³, A.Z. Nurmatov³,
O. T. Kasymov³, S.V. Zhavoronok⁴, V.V. Zverev¹

DESIGN OF HEPATITIS E VIRUS GENOTYPE 1 RECOMBINANT ORF3 PROTEIN BY CODON OPTIMIZATION METHOD

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia; ³Scientific Production Association «Preventive Medicine», Bishkek, Kyrgyz Republic; ⁴Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Aim. The development of the hepatitis E virus (HEV) genotype 1 full-size ORF3 recombinant polypeptide. *Materials and methods.* *Escherichia coli* strains, plasmid vectors, serological and clinical samples, ELISA reagent kits, molecular biological, bioinformatic, biotechnological, biochemical and serological methods. *Results.* HEV genotype 1 RNA had been isolated from clinical samples collected in Kyrgyzstan. DNA copy of subgenomic virus RNA had been cloned and used for further development of *E. coli* strains producing full-size recombinant protein ORF3 fused to *E. coli* beta-galactosidase. Codons optimization method was used in aim to increase expression level of recombinant protein. Recombinant protein ORF3 had been isolated from the inclusion bodies of the *E. coli* biomass and purified by size exclusion chromatography. Antigenic specificity of recombinant polypeptide had been confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting with the specific sera. *Conclusion.* HEV genotype 1 ORF3 recombinant antigen had been designed, and its applicability in diagnostic tests had been experimentally confirmed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 63—72

Key words: hepatitis E virus, genotype 1 HEV, orf3 gene, recombinant ORF3 antigen, ELISA, Western blotting

ВВЕДЕНИЕ

Основным лабораторным показателем инфицирования вирусом гепатита E (ВГЕ) является выявление в сыворотке крови больных специфических антител методом иммуноферментного анализа. Из-за трудностей, связанных с культивированием ВГЕ, известные к настоящему времени диагностические тест-системы основаны главным образом на использовании рекомбинантных антигенов.

Геном ВГЕ представляет собой одноцепочечную полиаденилированную РНК положительной полярности размером 7,3 тысяч нуклеотидных остатков (т.н.о.), содержит три открытых рамки считывания orf1, orf2 и orf3, а также недавно обнаруженную четвертую открытую рамку считывания orf4 [17], трансляция которой происходит через внутренний сайт связывания рибосом. В процессе репликации синтезируется кодирующая основные антигенно значимые белки ORF2 и ORF3 субгеномная бицистронная РНК размером 2,2 т.н.о. [9]. Одним из диагностически значимых антигенов является продукт

гена *orf3* — белок ORF3, или VP13, с молекулярной массой 13 kDa и протяженностью 113 — 114 аминокислотных остатков (а.о.). ORF3 — мультифункциональный регуляторный белок, отвечающий за уклонение вируса от иммунного ответа хозяина, регуляцию репликации вируса, сборку и созревание вирионов, выход вируса из инфицированной клетки [23]. Установлено, что в составе белка ORF3 имеется 3 антигенных домена в области 31 — 40 а.о., 63 — 76 а.о. и С-концевого участка, который содержит основные иммунодоминантные эпитопы [11, 21]. Известно также, что в положении 63 — 76 а.о. присутствует обогащенный пролином мотив «РХХР», содержащий линейные и поверхностно-ориентированные генотип-специфические антигенные сайты [22]. Диагностически важная особенность белка ORF3 — его способность взаимодействовать с сыворотками крови больных на поздних сроках острой фазы инфекции и в ранней фазе реконвалесценции [16].

Применение антигенов, в полной мере содержащих иммунодоминантные участки данного белка, представляется перспективным не только с точки зрения возможности выявления генотип-специфических антител, но и для определения давности инфицирования и стадии заболевания гепатитом E (ГЕ). Заболевание, вызываемое ВГЕ 1 генотипа, является строгим антропонозом и распространено на территории стран постсоветского пространства Центральной Азии. В данной работе была поставлена задача получения рекомбинантного аналога полноразмерного белка VP13 ВГЕ 1 генотипа штамма, циркулирующего в странах СНГ и имеющего эпидемиологическую значимость с точки зрения возможного завоза в Россию в связи с увеличением международной трудовой миграции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Праймеры и пробы для ПЦР и секвенирования синтезировали в Институте биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова. Получение фекальных экстрактов, выделение из них нуклеиновых кислот и подтверждение наличия РНК ВГЕ методом вложенной ПЦР проводили по ранее разработанным методикам [7].

ДНК-копию вирусной РНК (кДНК) получали на матрице очищенной из фекальных экстрактов РНК, содержащих РНК ВГЕ 1 генотипа, с использованием 18-членных олиго-dT-праймеров и обратной транскриптазы SuperScript III («Life Technologies», США). Вирусную кДНК амплифицировали с помощью высокоточной ДНК-полимеразы «Phusion» («Finnzymes», Финляндия) в соответствии с рекомендациями производителя. Реакции проводили на термоблокере «TProfessional Gradient» («Biometra», Германия).

ПЦР-продукты необходимого размера выделяли из агарозных гелей после электрофоретического разделения ампликонов, затем проводили еще один цикл ПЦР-амплификации с Taq-полимеразой, полученные ПЦР-продукты очищали на спин-колонках «Micro Bio-SpinBio-Gel P-30» («BioRad», США) и использовали в А/Т-клонировании. Лигирование полученных ДНК-вставок в плазмидные векторы pGEM-Teasy («Promega», США) и pEL5a [1] и трансформацию компетентных клеток *E.coli* CC001 генотипа XL-Blue (ООО «Евроген», Россия) и штамма *E.coli* PLT90 (F-, Ion::Tn10(TetR), endA1, malPpr::[PR, C1857](Mal-, λ imm) thi, hsdR17) [2] лигазной смесью осуществляли по общепринятому методу [6].

Определение нуклеотидной последовательности ДНК после очистки проводили в Институте биоорганической химии. Для анализа и обработки нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайна праймеров

использовали пакеты программ «Vector NTI», AS [19] и MEGA [14]. Потенциальные иммунодоминантные участки вирусных белков определяли по результатам расчета гидрофильных и гидрофобных профилей [15]. Анализ коротких пептидных гомологий между ВГЕ 1 генотипа и герпесвирусами человека 1 — 8 типов проводили, используя ранее описанные алгоритмы [13].

Получение биомасс культур клеток *E.coli* PLT90, трансформированных векторной или рекомбинантными плазмидами, выделение и очистку рекомбинантных полипептидов проводили по ранее опубликованным методикам [4, 5].

В работе использовали сыворотки крови и фекалии больных гепатитом из инфекционных больниц г. Ош (Киргизия) и сыворотки крови больных гепатитом, предоставленные БГМУ (Минск, Беларусь). Сыворотки крови условно здоровых лиц и контрольной группы (содержащие серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и инфекционных патологий печени иной этиологии: инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ-инфекция) были получены из МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского и Клинико-диагностического центра НИИВС им. И.И.Мечникова (Москва). В качестве положительного контрольного образца использовали рекомбинантный полипептид ORF3 ВГЕ штамма Бирма из коллекции Лаборатории клонирования вирусных геномов НИИВС им. И.И.Мечникова [3]. IgG к ВГЕ в образцах сывороток крови выявляли с помощью иммуноферментной тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы»). Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и возбудителями инфекционной патологии печени иной этиологии определяли с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HAV-G-РЕКОМБ», «ДС-ИФА-НВsAg-подтверждающий тест», «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ/АТ Скрин» (НПО «Диагностические системы»), «Вектогеп В-НВs-антиген-2», «Гепабест анти-НВс-IgG», «Бест анти-ВГС-авто», «Бест анти-ВГС-подтверждающий тест», «Бест анти-ВГС-подтверждающий тест», «ВектоЦМВ-IgG-авидность», «ВектоВЭБ-ЕА-IgG», «ВектоВЭБ-NA-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест»), «БЛОТ ВИЧ 1/2+0» (ЗАО БТК «Биосервис»). Иммуноферментный анализ выполняли в соответствии с инструкциями производителей соответствующих тест-систем.

Вестерн-блоттинг и твердофазный непрямой иммуноферментный анализ проводили с помощью ранее описанных методик [4, 20].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из образцов фекалий пациентов из Киргизии с клиническими признаками гепатита, содержащих РНК ВГЕ 1 генотипа, выделили тотальную РНК, которую использовали для получения кДНК в реакциях обратной транскрипции с применением олиго-dT-праймеров. Для клонирования фрагментов субгеномной РНК использовали 5 полученных образцов кДНК и 5 пар специфических праймеров, рассчитанных на основе последовательности генома вируса ВГЕ 1 генотипа (NCBI AV369689), выбранного в качестве консенсуса по данным биоинформационного анализа. С целью получения необходимого ПЦР-продукта отработали условия проведения реакции: состав буфера, концентрация реагентов, продолжительность элонгации, температура отжига матрицы. После оптимизации условия ПЦР были следующими: 40 сек. при +98°C, затем 30 циклов амплификации (денатурация в течение 5 сек при +98°C, отжиг матрицы в течение 20 сек при +67,5°C, синтез второй цепи в течение 2

мин при +72°C) и финальная элонгация 5 мин при +72°C. В результате были получены ПЦР-продукты размером от 2200 до 2300 п.н. в количестве, достаточном для клонирования в векторе pGEM-Teasy («Promega», США) (рис. 1).

При последующем А/Т-клонировании получили клоны *E. coli* ССО01 (XL-Blue), содержащие в составе рекомбинантной плазмиды pGEMeasy-HE1 фрагменты ДНК размером 2,3 т.п.н., соответствующие субгеномной РНК вируса, что было подтверждено секвенированием. Сравнительный анализ показал совпадение аминокислотной последовательности белка, кодируемого клонированным фрагментом ДНК, с белком ORF3 референсного штамма вируса за исключением одной аминокислотной замены (Ala₃₄ на Val₃₄).

Последовательность белка ORF3 дополнительно проанализировали с помощью исследования профиля его гидрофобности/гидрофильности, рассчитанного по индексу гидропатичности [15], где более высокие значения индекса соответствуют более гидрофобным участкам полипептидов. Провели анализ коротких пептидных гомологий

— мотивов потенциальных линейных эпитопов — между белком ORF3 ВГЕ 1 генотипа и белками семейства герпесвирусов человека 1 — 8 типов с использованием доступных в базах данных аминокислотных последовательностей. В аминокислотной последовательности полученного белка ORF3 не было обнаружено совпадений с последовательностями структурных белков герпесвирусов, за исключением фрагмента Gln₆₃-Pro₆₉, подобного участку ядерного белка EBNA-2 вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), однако большая часть этой последовательности находится вне экспериментально картированной иммунодоминантной области Ser₆₇-Gly₇₆ [4], совпадая лишь по трем аминокислотным остаткам Ser₆₇-Pro₆₉-Pro₆₉.

Фрагмент кДНК гена *orf3* из рекомбинантной плазмиды pGEMeasy-HE1 переклонировали в экспрессирующий вектор pEL5a с помощью ПЦР по сайтам рестрикции BamHI и PstI. Таким образом, были получены плазмиды, кодирующие полноразмерную копию белка ORF3 в виде слитного с β-галактозидазой *E. coli* полипептида. Наличие вставки и рамки считывания слитного белка подтверждали секвенированием. Белковый состав лизатов клонов рекомбинантного штамма-производителя *E. coli* PLT90 исследовали методами электрофореза в SDS-полиакриламидном геле и вестерн-блоттинга с пулом образцов сывороток крови, содержащих IgG к ВГЕ (рис. 2). В качестве положительного контрольного образца использовали ранее полученный [3] рекомбинантный белок, содержащий С-концевой фрагмент белка ORF3 ВГЕ 1 генотипа (штамм Бирма), в качестве контроля специфичности реакции — лизат биомассы штамма *E. coli* PLT90, трансформированного векторной плазмидой без вставки вирусоспецифической ДНК. Несмотря на специфическое

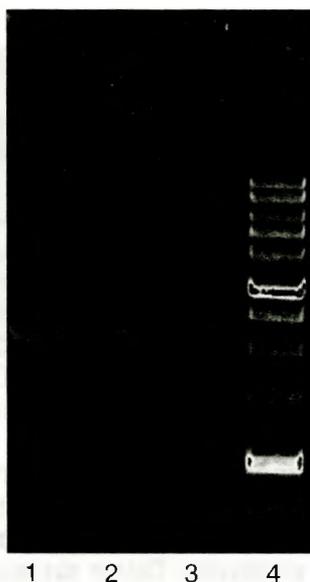


Рис. 1. Электрофорез ПЦР-продуктов в 0,8% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Дорожки: 1, 2 — ПЦР-продукты, 3 — отрицательный контроль (ПЦР без ДНК), 4 — маркеры молекулярных масс (сверху вниз: 10 000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 500 пар нуклеотидных остатков).

взаимодействие с положительными сыворотками в реакции вестерн-блоттинга, в лизате биомассы полученного штамма-продуцента рекомбинантный антиген присутствовал в недостаточном для препаративного выделения количестве.

Для увеличения продукции рекомбинантных белков в бактериальных системах экспрессии в настоящее время широко применяется метод оптимизации кодонов, в котором используется подход синонимичных (без изменения кодируемой аминокислоты) замен соответствующих триплетов [8]. С целью повышения уровня синтеза слитного белка в клонированном фрагменте гена *orf3* была проведена замена 51 триплета нуклеотидов на более часто встречающиеся в бактериях *E. coli* синонимичные кодоны. Фрагмент ДНК с оптимизированными кодонами *orf3s*, синтезированный в Институте биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, переклонировали в экспрессирующий вектор pEL5a по схеме, аналогичной примененной для клонирования фрагмента гена *orf3* дикого штамма вируса. Наличие вставки и рамки считывания слитного белка было подтверждено секвенированием.

Рекомбинантные клоны *E. coli*, полученные после проведения оптимизации кодонов, были вновь протестированы на способность синтезировать целевой белок. На рис. 2 представлены результаты электрофоретического анализа белкового состава лизатов биомасс рекомбинантных штаммов *E. coli* до и после оптимизации кодонов и результаты исследования методом вестерн-блоттинга взаимодействия рекомбинантного белка в составе лизатов с пулом сывороток больных ГЕ.

Степень очистки рекомбинантного антигена ORF3 и β -галактозидазы *E. coli* контролировалась на отдельных стадиях процесса выделения с помощью электрофореза в 10% SDS-полиакриламидном геле. Исследование фракций

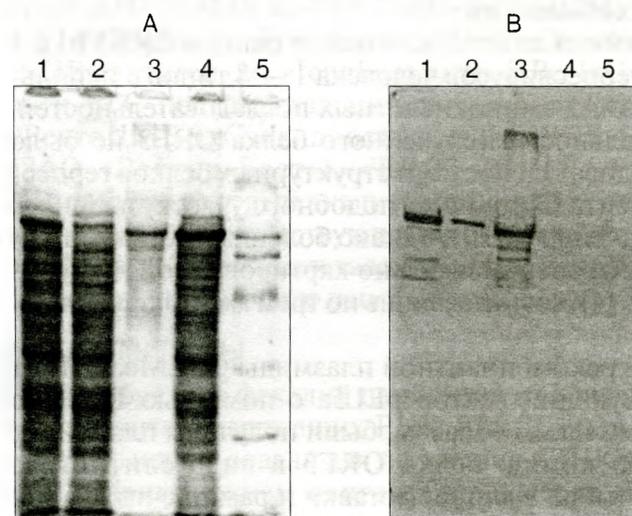


Рис. 2. Электрофорез в 10% SDS-полиакриламидном геле (А) и вестерн-блоттинг с пулом сывороток крови больных ГЕ (В).

1, 2 — лизаты культур клонов *E. coli* POP2136, экспрессирующих рекомбинантный полипептид ORF3 после (1) и до (2) оптимизации кодонов; 3 — ранее полученный рекомбинантный полипептид ORF3 ВГЕ штамма Бирма (92 — 123 а.о.); 4 — лизат клеток POP2136, трансформированных плазмидой pEX1 без вставки; 5 — маркеры молекулярных масс (193, 112, 64, 30, 26, 12,8, 6,5 кД).

белка после хроматографической очистки подтвердило отделение рекомбинантных полипептидов от основной массы примесных белков (рис. 3А). Тестирование антигенной активности полученных фракций белка методом ИФА показало снижение оптической плотности в лунках с иммобилизованным рекомбинантным белком ORF3 в реакциях с пулом положительных по ВГЕ сывороток и рост неспецифического сигнала с пулом отрицательных (донорских) сывороток в 11 — 13 фракциях (рис. 3В). Для дальнейшей работы использовали лучшие по показателям двух методов фракции.

Молекулярная масса полученного рекомбинантного белка, определенная по ре-

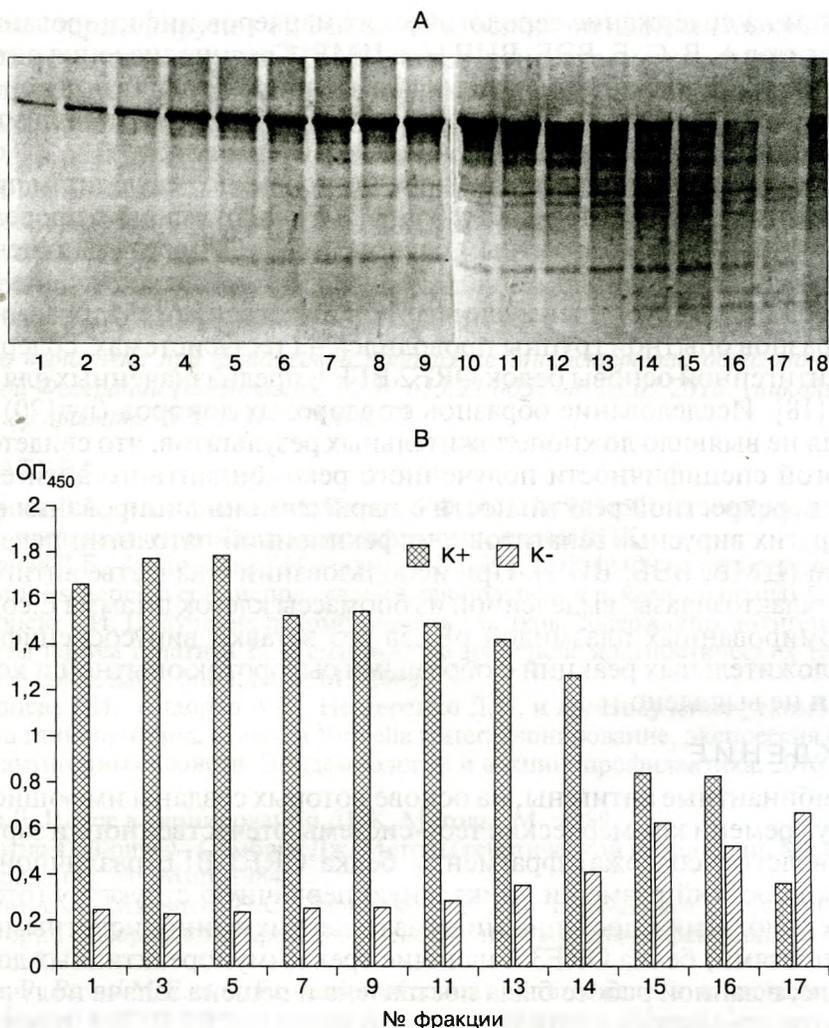


Рис. 3. Результаты тестирования методами электрофореза в SDS-полиакриламидном геле (А) и иммуноферментного анализа (В) фракций рекомбинантного белка ORF3 ВГЕ 1 генотипа после хроматографической очистки.

К+ пул сывороток крови больных ГЕ; К- пул сывороток крови здоровых доноров.

зультатам электрофоретического профиля лизатов штамма-продуцента и препаратов выделяемого из них целевого продукта, составила 128,5 кДа, что соответствует расчетной величине. Продуктивность штамма составила не менее 500 мкг рекомбинантного белка на 1 мл клеточной суспензии при плотности культуры 5×10^8 кл/мл, степень очистки белка по данным электрофореза — 95%.

Для оценки антигенной специфичности полученного рекомбинантного белка ORF3 ВГЕ 1 генотипа были сформированы контрольные панели образцов сывороток крови, протестированных с помощью коммерческих

Исследование рекомбинантного антигена ORF3 ВГЕ 1 генотипа методом ИФА

Серологические маркеры инфекционной патологии печени в обследуемых образцах сывороток	Количество исследованных образцов	Средняя величина оптической плотности при $\lambda=450$ нм, ОП _{сред} (M \pm m)
IgG к ВГЕ	50	0,334 \pm 0,02
IgG к ВГА	15	0,030 \pm 0,003
HBsAg, IgG к HBcAg	18	0,027 \pm 0,001
IgG к ВГС	15	0,027 \pm 0,002
IgG к ВИЧ-1	20	0,068 \pm 0,004
IgG к ВЭБ	15	0,052 \pm 0,004
IgG к ЦМВ	15	0,072 \pm 0,006

тест-систем на содержание серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов А, В, С, Е, ВЭБ, ВИЧ $1/2$ и ЦМВ. Средние значения оптической плотности в обследованных методом ИФА группах образцов при использовании в качестве антигена рекомбинантного белка ORF3, иммобилизованного в лунках полистироловых планшетов, представлены в табл.

84% обследованных образцов сывороток крови, по результатам предварительного тестирования содержащих IgG к ВГЕ, положительно прореагировали с полученным рекомбинантным белком ORF3. Относительно невысокую оптическую плотность (от 0,210 до 0,763 о.е./мл) можно объяснить тем, что белок ORF3 индуцирует преимущественно образование IgM и ранних IgG, а отбор образцов опытной группы проводился на тест-системах, содержащих в составе антигенной основы белок ORF2 ВГЕ и предназначенных для выявления IgG [18]. Исследование образцов от здоровых доноров (n=120) и групп сравнения не выявило ложноположительных результатов, что свидетельствует о строгой специфичности полученного рекомбинантного антигена и отсутствии перекрестной реактивности с маркерами инфицирования возбудителями других вирусных гепатитов и инфекционной патологии печени иной этиологии (ЦМВ, ВЭБ, ВИЧ). При использовании в качестве антигена препарата β -галактозидазы, выделенной из биомассы клеток штамма E.coli PLT90, трансформированных плазмидой pEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК, положительных реакций с образцами сывороток опытной и контрольных групп не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные антигены, на основе которых созданы имеющиеся к настоящему времени коммерческие тест-системы отечественного и зарубежного производства, содержат фрагменты белка ORF3 ВГЕ различной длины. Учитывая короткий размер и уникальную первичную структуру (отсутствие заметных гомологий с доступными в базах данных аминокислотными последовательностями) белка ORF3 и наличие трех иммунореактивных доменов в его составе, в данной работе была поставлена и решена задача получения рекомбинантного аналога полноразмерного белка ORF3 ВГЕ 1 генотипа. По результатам анализа профиля гидропатичности гидрофобный участок ORF3, а именно его N-концевая область, должен содержать основную часть антигенных детерминант, однако прогноз, сделанный с помощью данного метода, не совсем совпадает с результатами экспериментов по картированию эпитопов, согласно которым именно в С-концевой области данного белка локализован основной иммунодоминантный домен [21]. Несоответствие литературных данных и результатов биоинформационного анализа служит дополнительным аргументом в пользу важности и необходимости получения полноразмерного рекомбинантного антигена ORF3. Предполагаемая некоторыми авторами возможность конформационной «маскировки» эпитопов в составе рекомбинантных аналогов полноразмерного белка ORF3 [12] в данном случае не должна иметь места, поскольку применяемая процедура очистки белка из нерастворимых телец-включений содержит этапы денатурации. В первичной структуре полученного рекомбинантного белка выявлена одна аминокислотная замена, затрагивающая N-концевой иммунодоминантный домен, что может приводить к штаммоспецифичной вариабельности антигенных свойств ВГЕ и свидетельствовать об уникальности антигена, полученного на основе природного изолята вируса. Поскольку в научной литературе имеются сообщения о перекрестной иммунореактивности при выявлении антител к ВГЕ и

некоторым герпесвирусам (ВЭБ, ЦМВ), осложняющей интерпретацию результатов серодиагностики ГЕ [10], проведено сравнение аминокислотных последовательностей полученного белка и белков герпесвирусов, показавшее отсутствие протяженных гомологичных участков. Методами иммуноблоттинга и ИФА в реакциях с сыворотками крови больных ГЕ и групп сравнения, включающими образцы с маркерами инфицирования ЦМВ и ВЭБ, показана антигенная специфичность полученного рекомбинантного полипептида. Однако для более надежного обоснования возможности применения в диагностических тестах требуется дополнительное расширенное и более детальное исследование его иммунореактивных свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.613.21.0057 от 28.07.2016, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61316X0057).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ, 1992, № 2071501 на изобретение «Вектор рEL5a, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК».
2. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ, 1992, № 2043409 на изобретение «Штамм бактерий *Escherichia coli*, используемый для получения рекомбинантных белков».
3. Алаторцева Г.И. Получение рекомбинантных белков, содержащих антигенные детерминанты вируса гепатита E, и создание на их основе диагностических тест-систем: Автореф. дисс. канд. биол. наук. М., 2000.
4. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Получение рекомбинантного аналога гликопротеина е вируса *Varicella zoster*: клонирование, экспрессия и исследование антигенных свойств. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 15, 1 (86): 77-85.
5. Гловер Д. Новое в клонировании ДНК. Методы. М., 1989.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
7. Солонин С.А., Мальцева Н.С., Троценко О.Е. и др. Циркуляция вируса гепатита E на территории Хабаровского края. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2010, 16: 31-36.
8. Claudia P., Ravasi M.E. et al. Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. *Front. Microbiol.* 2014, 5: 2-8.
9. Graff J., Torian U. et al. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 2006, 80: 5919-5926.
10. Hyams C., Mabayoje D.A., Copping R. et al. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J. Med. Virol.* 2014, 86 (3): 478-483.
11. Khudyakov Y.E., Khudyakova N.S., Fields H.A. et al. Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology.* 1993, 194 (1): 89-96.
12. Khudyakov Y.E., Khudyakova N.S., Jue D.L. et al. Comparative characterization of antigenic epitopes in the immunodominant region of the protein encoded by open reading frame 3 in burmese and mexican strains of hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 1994, 75 (3): 641-646.
13. Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A. et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992, 89 (17): 8259-8263.
14. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings Bioinformatics.* 2004, 5: 150-163.
15. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1983, 157 (1): 105-132.
16. Ma H., Song X., Li Z. et al. Varying abilities of recombinant polypeptides from different regions of hepatitis E virus ORF2 and ORF3 to detect anti-HEV immunoglobulin M. *J. Med. Virol.* 2009, 81 (6): 1052-1061.
17. Nair V.P., Anang S., Subramani C. et al. Endoplasmic reticulum stress induced synthesis of a

- novel viral factor mediates efficient replication of genotype-1 hepatitis E. PLoS Pathol. 2016, 12 (4): e1005521.
18. Obriadina A., Meng J.H., Ulanova T. et al. A new enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus. J. Gastroenterol Hepatol. 2002, Suppl 3: 360-364.
 19. Resenchuk S.M., Blinov V.M. Alignment service: creation and processing of alignments of sequences of unlimited length. Comput. Appl. Biosci. (CABIOS). 1995, 11 (1): 7-11.
 20. Towbin H., Staehlin T., Gordon Y. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, 76 (9): 4350-4359.
 21. Yarbough P.O., Tam A.W., Fry K.E. et al. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. J. Virol. 1991, 65 (11): 5790-5797.
 22. Yonglin Yang, Shaoli Lin, Yuchen Nan et al. A linear surface epitope in a proline-rich region of ORF3 product of genotype 1 hepatitis E virus. Viruses. 2016, Aug 18;8 (8): pii: E227.
 23. Zhou Y., Zhao C., Tian Y. et al. Characteristics and functions of HEV proteins. Adv. Exp. Med. Biol. 2016, 948: 17-38.

Поступила 05.07.17

Контактная информация: Алаторцева Галина Ивановна, к.б.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-77-95

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Г.И.Алаторцева¹, А.В.Сидоров¹, Л.Н.Нестеренко¹, Л.Н.Лухверчик¹,
В.В.Доценко¹, И.И.Амиантова¹, В.Ю.Кабаргина¹, А.В.Милованова¹,
Д.С.Воробьев¹, Ю.И.Аммур¹, В.М.Блинов¹, А.З.Нурматов³,
З.Ш.Нурматов³, Д.А.Байытбекова³, О.Т.Касымов³,
К.К.Кюрегян^{1,2}, М.И.Михайлов^{1,2}, С.В.Жаворонок⁴, В.В.Зверев¹*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА КАПСИДНОГО БЕЛКА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 1 ГЕНОТИПА: КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА, ОЦЕНКА АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия; ³НПО «Профилактическая медицина», Бишкек, Кыргызская Республика; ⁴Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Цель. Разработка рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита Е (ВГЕ) 1 генотипа и исследование его антигенных свойств. *Материалы и методы.* Штаммы *Escherichia coli*, плазмидные векторы, серологический и клинический материал, иммуноферментные тест-системы. Молекулярно-биологические, биоинформационные, биотехнологические, биохимические и серологические методы. *Результаты.* С использованием рекомбинантной плазмиды, содержащей ДНК-копию субгеномной бицистронной РНК ВГЕ 1 генотипа, получен штамм *E.coli* — продуцент рекомбинантного антигена ORF2, содержащего С-концевой фрагмент капсидного белка ВГЕ в виде слитного с β-галактозидазой *E.coli* полипептида. Рекомбинантный белок выделен из телец включений биомассы штамма-продуцента и очищен методом эксклюзионной хроматографии. С помощью вестерн-блоттинга показано взаимодействие полученного полипептида с пулом сывороток крови больных гепатитом Е (ГЕ). Антигенная специфичность белка подтверждена методом иммуноферментного анализа с сыворотками крови больных ГЕ и реконвалесцентов и групп сравнения: здоровых доноров, больных гепатитами А, В, С, ВИЧ-инфицированных, больных инфекционным мононуклеозом и цитомегаловирусной инфекцией. *Заключение.* Разработан рекомбинантный антиген ORF2 ВГЕ 1 генотипа и экспериментально показана возможность его применения в диагностических тестах.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 72—80