

- 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.Алаторцева<sup>1</sup>, А.В.Сидоров<sup>1</sup>, Л.Н.Нестеренко<sup>1</sup>, Л.Н.Лухверчик<sup>1</sup>,  
В.В.Доценко<sup>1</sup>, И.И.Амиантова<sup>1</sup>, В.Ю.Кабаргина<sup>1</sup>, А.В.Милованова<sup>1</sup>,  
Д.С.Воробьев<sup>1</sup>, Ю.И.Аммур<sup>1</sup>, В.М.Блинов<sup>1</sup>, А.З.Нурматов<sup>3</sup>,  
З.Ш.Нурматов<sup>3</sup>, Д.А.Байытбекова<sup>3</sup>, О.Т.Касымов<sup>3</sup>,  
К.К.Кюрегян<sup>1,2</sup>, М.И.Михайлов<sup>1,2</sup>, С.В.Жаворонок<sup>4</sup>, В.В.Зверев<sup>1</sup>*

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

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия; <sup>3</sup>НПО «Профилактическая медицина», Бишкек, Кыргызская Республика; <sup>4</sup>Белорусский 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 реконвалесцентом 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

Ключевые слова: вирус гепатита E, ВГЕ 1 генотипа, ген orf2, капсидный белок, рекомбинантный антиген ORF2, ИФА, вестерн-блоттинг

G.I. Alatorseva<sup>1</sup>, A.V. Sidorov<sup>1</sup>, L.N. Nesterenko<sup>1</sup>, L.N. Luhverchik<sup>1</sup>, V.V. Dotsenko<sup>1</sup>, I.I. Amiantova<sup>1</sup>, V. Yu. Kabargina<sup>1</sup>, A.V. Milovanova<sup>1</sup>, D.S. Vorobev<sup>1</sup>, Yu. I. Ammur<sup>1</sup>, V.M. Blinov<sup>1</sup>, A.Z. Nurmatov<sup>3</sup>, Z.Sh. Nurmatov<sup>3</sup>, D.A. Baiyzbekova<sup>3</sup>, O.T. Kasymov<sup>3</sup>, K.K. Kyuregyan<sup>1,2</sup>, M.I. Mikhailov<sup>1,2</sup>, S.V. Zhavoronok<sup>4</sup>, V.V. Zverev<sup>1</sup>

## DESIGN OF HEPATITIS E VIRUS GENOTYPE 1 RECOMBINANT CAPSID PROTEIN: CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION, EVALUATION OF THE ANTIGENIC PROPERTIES

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

*Aim.* The development of the hepatitis E virus (HEV) genotype 1 recombinant capsid protein. *Materials and methods.* *Escherichia coli* strains, plasmid vectors, serological and clinical samples, ELISA reagent kits, molecular biological, bioinformatic, biotechnological, biochemical and serological methods. *Results.* Using HEV genotype 1 DNA copy of subgenomic virus RNA we made *E. coli* strains producing recombinant capsid protein, containing C-terminal fragment of ORF2 protein fused to *E. coli* beta-galactosidase. Recombinant protein ORF2 had been isolated from the inclusion bodies of the *E. coli* biomass and purified by size exclusion chromatography. By Western blotting it had been shown specific interaction of the recombinant polypeptide with anti-HEV IgG from pool of positive sera. Antigenic specificity of the recombinant polypeptide had been confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay with sera of hepatitis E patients and reference groups: healthy donors, patients with hepatitis A, B, C, infectious mononucleosis and cytomegalovirus infection, HIV-infected patients. *Conclusion.* HEV genotype 1 ORF2 recombinant antigen had been developed, and its possible use in diagnostic tests had been experimentally shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 72—80

Key words: hepatitis E virus, genotype 1 HEV, orf2 gene, capsid protein, recombinant ORF2 antigen, ELISA, Western blotting

## ВВЕДЕНИЕ

Осуществление эпидемиологического надзора за гепатитом E (ГЕ) невозможно без применения диагностических тестов для определения специфических серологических маркеров инфекции. Сложный антигенный состав, генетическая неоднородность ВГЕ и особенности эпидемиологии ГЕ в разных географических регионах требуют совершенствования методов серодиагностики.

Наибольшую диагностическую ценность имеет кодируемый геном orf2 капсидный белок ORF2 ВГЕ с молекулярной массой 72 kDa. Являясь основным структурным компонентом вирусной частицы, белок ORF2 ВГЕ содержит мажорные антигенные детерминанты вируса и отвечает за индукцию протективного гуморального иммунного ответа организма-хозяина. Иммунодоминантный домен в структуре белка ORF2, содержащий взаимодействующие со специфическими IgG и IgM эпитопы, локализован в C-концевом участке белка, по данным разных исследователей в области с 454 по 606 а.о. [12] или с 432 по 660 а.о. [13]. По результатам изучения мутантных форм ВГЕ этот домен включен в процесс связывания вируса с чувствительными клетками и содержит нейтрализующие эпитопы [18].

Трудности, связанные с выделением протяженных фрагментов геномной РНК из вирусосодержащего клинического материала и малоэффективным культивированием ВГЕ, объясняют использование многими авторами для разработок рекомбинантных антигенов синтетических аналогов фрагментов вирусного генома, содержащих теоретически рассчитанные нуклеотидные последовательности, кодирующие иммунодоминантные области диагностически значимых белков ВГЕ определенных генотипов [16]. Однако данная стратегия не всегда способствует получению белкового продукта, в полной мере обладающего свойствами природного антигена, поэтому в настоящей работе в качестве источника материала для клонирования нами были использованы клинические образцы от больного из эндемичного региона с лабораторно подтвержденным диагнозом ГЕ.

ВГЕ 1 генотипа, вызывающий у человека заболевание с тяжелыми клиническими проявлениями, циркулирует на территории стран с жарким климатом, включая государства Центральной Азии, расположенные на бывшей территории СССР. Применение антигенов ВГЕ 1 генотипа для создания диагностических тест-систем является актуальным в связи с существующей угрозой более широкого распространения данного генотипа вируса из-за увеличения международной трудовой миграции. В данной работе была поставлена задача получения не имеющего коммерческих аналогов рекомбинантного антигена, содержащего С-концевой фрагмент белка ORF2 циркулирующего на территории СНГ штамма ВГЕ 1 генотипа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Праймеры и пробы для ПЦР и секвенирования синтезировали в Институте биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова. Выделенную из фекальных экстрактов РНК использовали в реакции обратной транскрипции для получения ДНК-копии (кДНК) с применением обратной транскриптазы SuperScript III («Life Technologies», США) и dT18-праймеров. кДНК амплифицировали высокоточной ДНК-полимеразой «Phusion» («Finzymes», Финляндия) с использованием специфических праймеров. Реакции проводили на термоциклере «TProfessional Gradient» («Biometra», Германия).

ПЦР-продукты выделяли из агарозных гелей после электрофоретического разделения ампликонов, затем проводили еще один цикл ПЦР-амплификации с Taq-полимеразой, полученные ПЦР-продукты очищали на колонках Евроген 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-, lon::Tn10(TetR), endA1, malPpa::[ PR, C1857] (Mal-, λimm) thi, hsdR17) [2] лигазной смесью или рекомбинантными плазмидами выполняли по общепринятому методу [7].

Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов ДНК определяли проводили в Институте биоорганической химии. Для анализа и обработки нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайна праймеров использовали пакеты программ «Vector NTI», AS [14] и MEGA [10]. Потенциальные иммунодоминантные участки вирусных белков определяли по результатам расчета гидрофильных и гидрофобных профилей [11]. Анализ коротких пептидных гомологий между ВГЕ 1 генотипа и герпесвирусами человека 1 — 8 типов проводили, используя ранее описанные алгоритмы [9].

Получение биомасс культур клеток *E.coli* PLT90, трансформированных

векторной или рекомбинантными плазмидами, выделение и очистку рекомбинантных полипептидов проводили по ранее опубликованным методикам [4 — 6].

В работе использовали сыворотки крови и фекалии больных гепатитом Е из инфекционных больниц г. Ош (Киргизия) и сыворотки крови больных гепатитом Е, 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 ORF2 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 (см. предыдущую статью этих авторов в номере).

Результаты электрофореза документировали и анализировали на приборе «Gel Doc» (BioRad, США).

Вестерн-блоттинг и твердофазный непрямой иммуноферментный анализ проводили с помощью ранее описанных методик [4, 15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На матрице РНК ВГЕ, выделенной от больного с лабораторно подтвержденным диагнозом ГЕ из Киргизии, с использованием олиго-dT-праймеров получена ДНК-копия. С помощью специфических праймеров проведена ПЦР-амплификация с последующим А/Т клонированием и получением клонов *E.coli* ССО01 (XL-Blue), содержащих в составе рекомбинантной плазмиды фрагменты ДНК-копии бицистронной субгеномной РНК ВГЕ 1 генотипа размером 2,3 т.п.н. При сравнении нуклеотидных последовательностей полученных клонов с последовательностью соответствующего участка генома референсного штамма ВГЕ 1 генотипа (NCBI AB369689) обнаружено множество (более 60) точечных мутаций, что свидетельствует о высокой вариабельности генома ВГЕ и возможности существования более широкого спектра серовариантов вируса, чем это предполагалось ранее. Так, сравнительный анализ аминокислотных последовательностей полноразмерного *orf2* продукта клонированного фрагмента кДНК и референсного штамма ВГЕ выявил 8 аминокислотных замен, в том числе одну (Ile<sub>519</sub> на Thr<sub>519</sub>) в С-концевом участке, выбранном для получения рекомбинантного антигена. Соответствующий ему фрагмент гена *orf2*, кодирующий последовательность капсидного белка с 406 по 660 а.о., был выбран по результатам анализа литературных дан-

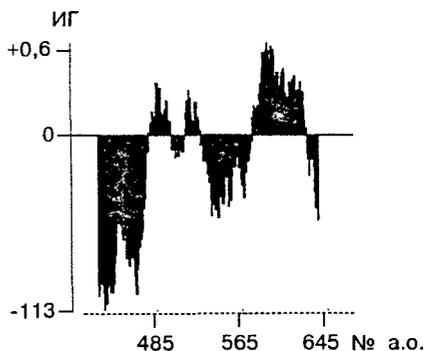


Рис. 1. Профиль гидрофильности/гидрофобности выбранного фрагмента белка ORF2, рассчитанный по индексу гидропатичности (ИГ).

ных и исследования профиля гидрофобности/гидрофильности капсидного белка, рассчитанного по индексу гидропатичности [11] (рис. 1).

Группой авторов установлена высокая перекрестная иммуореактивность используемых в диагностических тест-системах антигенов при выявлении IgM к ВГЕ и некоторым герпесвирусам (вирусу Эпштейна-Барр, цитомегаловирусу), что существенно осложняет интерпретацию результатов серодиагностики острого ГЕ [8]. Поэтому для исключения возможности перекрестных реакций антигенных детерминант рекомбинантного полипептида и белков герпесвирусов был проведен анализ коротких пептидных гомологий мотивов потенциальных линейных эпитопов между выбранным фрагментом капсидного белка ВГЕ 1 генотипа и белками герпесвирусов человека 1 — 8 типов. Поиск и множественное сравнение соответствующих мотивов по доступным в базах данных аминокислотным последовательностям показали отсутствие значимых гомологий.

Клонированный фрагмент ДНК использовали в качестве ДНК-матрицы для получения рекомбинантного антигена ORF2 ВГЕ 1 генотипа в системе экспрессии *E.coli*. Для этого были сконструированы праймеры, фланкирующие переклонированную последовательность и содержащие на 5'-концах сайты рестрикции: *Bam*HI (прямой праймер) и *Pst*I (обратный праймер), искомым фрагмент амплифицировали с помощью высокоточной полимеразы *Phusion* и клонировали в вектор *pEL5a* с последующей трансформацией клеток *E.coli* *PLT90* и селекцией клонов на устойчивость к ампициллину. Наличие вставки фрагмента ДНК-копии гена *orf2* в составе рекомбинантной плазмиды и рамки считывания белка, содержащего слитный с  $\beta$ -галактозидазой *E.coli* C-концевой фрагмент белка ORF2, подтверждали с помощью рестрикционного анализа (рис. 2) и последующего секвенирования.

Клоны штаммов-продуцентов культивировали в условиях термоиндукции синтеза рекомбинантного белка. По результатам контроля уровня синтеза целевого продукта в лизатах культур методами электрофореза и вестерн-блоттинга с пулом сывороток крови больных ГЕ отобрали клон с максимальной продукцией рекомбинантного белка.

Для получения рекомбинантного белка ORF2 и дальнейшего изучения его антигенных свойств была использована методика выделения рекомбинантных белков из биомассы бактерий *E.coli*, включающая разрушение клеток, отмывку телец включений, их солюбилизацию и последующую очистку с помощью эксклюзионной хроматографии. Результаты хроматографической очистки рекомбинантного белка ORF2 анализировали, изучая электрофоретический профиль белкового состава полученных фракций, а также оценивая специфическую активность фракций методом ИФА с пулом сывороток крови больных ГЕ и пулом отрицательных сывороток, полученных от здоровых доноров

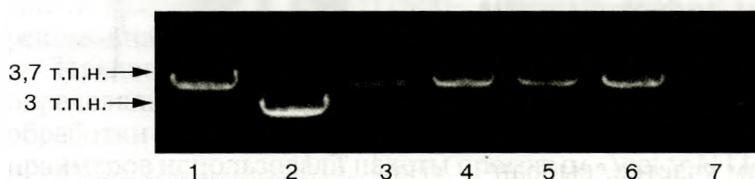


Рис. 2. Электрофорез в 0,8 % агарозном геле ДНК плазмид, обработанных рестриктазой *Bam*HI.

Представлены линейные формы плазмид, содержащих (дорожки №№ 1, 3, 4, 5, 6) и не содержащих (дорожки №№ 2, 7) вставку ДНК-копии гена *orf2* размером 0,75 т.п.н.

(рис. 3). В исследуемых пробах фракций оценивали весь спектр белков, концентрацию суммарного белка, а также количество целевого продукта относительно суммарного белка. При объединении фракций учи-

ывались образцы, содержащие наибольшее количество целевого белка и проявляющие наиболее выраженную антигенную специфичность при взаимодействии со специфическими и контрольными образцами сывороток. В результате был получен рекомбинантный белок, молекулярная масса которого, оцененная с помощью электрофореза, соответствовала величине (144,1 кДа), теоретически рассчитанной с помощью программы Vector-NTI.

Оценка антигенных свойств полученного рекомбинантного белка ORF2 была проведена с применением нескольких предварительно сформированных контрольных панелей образцов сывороток крови: от больных ГЕ и реконвалесцентов, здоровых доноров, больных гепатитами А, В, С, ВИЧ-инфицированных, больных инфекционным мононуклеозом (ИМ) и цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ). По результатам предварительного тестирования, проведенного с помощью коммерческих тест-систем, все отобранные образцы от пациентов с ГЕ и реконвалесцентов содержали IgG к ВГЕ, образцы из групп сравнения были отрицательными на антитела к ВГЕ и содержали соответствующие серологические маркеры возбудителей инфекционной патологии печени

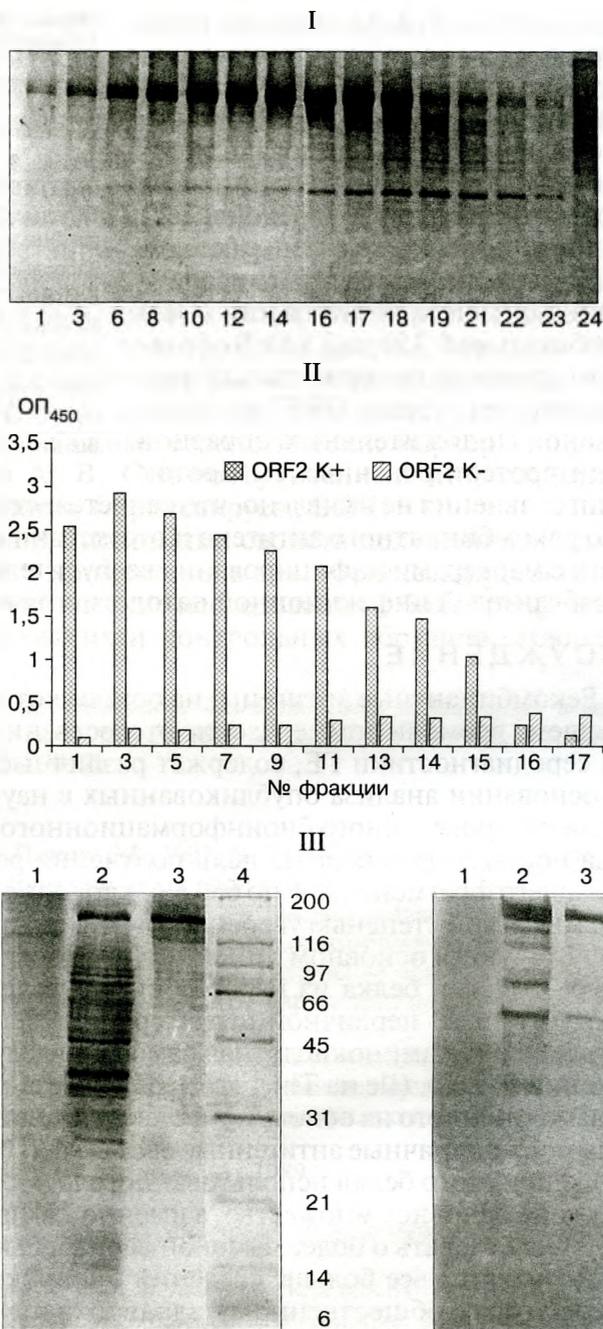


Рис. 3. Результаты тестирования фракций рекомбинантного белка методами электрофореза в SDS-полиакриламидном геле (I; дорожки: 1 — 23 — фракции после хроматографической очистки, 24 — растворенные тельца включения перед хроматографией) и иммуноферментного анализа (II) (ORF2 K+ пул сывороток крови больных ГЕ; ORF2 K- пул сывороток крови здоровых доноров); анализ (III; дорожки: 1 —  $\beta$ -галактозидаза *E.coli*, 2 — лизат биомассы штамма-продуцента рекомбинантного полипептида ORF2, 3 — рекомбинантный белок ORF2, 4 — маркеры мол. масс, kDa) очищенного рекомбинантного белка ВГЕ 1 генотипа с помощью электрофореза в SDS-полиакриламидном геле (III, слева) и вестерн-блоттинга (III, справа) с пулом сывороток больных ГЕ.

(HBsAg, IgG к HBsAg, вирусам гепатитов А и С, вирусу Эпштейна-Барр, цитомегаловирусу, ВИЧ-1). Взаимодействие образцов с рекомбинантным белком ORF2 исследовали методом ИФА в непрямом формате. Все пробы от больных ГЕ и реконвалесцентов при взаимодействии с белком ORF2 были положительными, и величина оптической плотности (ОП) колебалась от 0,350 до 2,820. В образцах от здоровых доноров специфических антител к белку ORF2 не обнаружено. Положительных образцов среди протестированных сывороток

групп сравнения не выявлено, что свидетельствует о специфичности полученного рекомбинантного антигена и отсутствии перекрестной иммунореактивности с маркерами инфицирования возбудителями других вирусных гепатитов и возбудителей инфекционной патологии печени иной этиологии (табл.).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные антигены, на основе которых созданы имеющиеся к настоящему времени коммерческие отечественные и зарубежные тест-системы для серодиагностики ГЕ, содержат различные фрагменты белка ORF2 ВГЕ. На основании анализа опубликованных в научной литературе данных и результатов проведенного биоинформационного исследования в данной работе была поставлена и решена цель получения рекомбинантного антигена, содержащего фрагмент с 406 по 660 а.о. капсидного белка ORF2 ВГЕ 1 генотипа. С достаточной степенью уверенности можно предположить, что в его составе присутствуют в основном линейные эпитопы, поскольку применяемая процедура очистки белка из нерастворимых телец включений содержит этапы денатурации. В первичной структуре полученного рекомбинантного белка выявлена одна аминокислотная замена в иммунодоминантном домене в положении 519 а.о. (Ile на Thr), которая свидетельствует об уникальности антигена, полученного на основе природного изолята вируса и может влиять на его штаммоспецифичные антигенные свойства. В N-концевом фрагменте (1 — 290 а.о.) капсидного белка использованного для клонирования штамма было обнаружено основное множество, а именно 7 аминокислотных замен, что может свидетельствовать о более высокой вариабельности этого участка белка.

Появляется все больше сведений о широком спектре хозяев ВГЕ, создающем угрозу общественному здравоохранению в глобальном масштабе. Результаты экспериментов по исследованию взаимодействия рекомбинантных антигенов ВГЕ 1 и 3 генотипов с гомологичными и гетерологичными специфическими антителами показали, что эпитопы С-концевого иммунодоминантного домена отвечают за генотип-специфичную иммунореактивность антигена ORF2 [13]. С другой стороны, в экспериментах по подробному картированию эпитопов в составе С-концевого участка ORF2 показано наличие двух линейных В-клеточных эпитопов в области 411 — 415 а.о. и 427 — 430 а.о. общих для штаммов ВГЕ различных генотипов, хозяевами которых являются птицы, свиньи или человек [17]. Полученный в настоящей работе рекомбинантный белок обладает антигенной специфичностью ВГЕ 1 гено-

Оценка антигенной специфичности рекомбинантного антигена ORF2 ВГЕ методом ИФА

| Исследуемая группа           | Количество исследованных образцов | Средняя величина оптической плотности при $\lambda=450$ нм, ОП <sub>сред.</sub> (M $\pm$ m) |
|------------------------------|-----------------------------------|---|
| Больные ГЕ и реконвалесценты | 50                                | 1,105 $\pm$ 0,113   |
| Здоровые доноры              | 120                               | 0,072 $\pm$ 0,009   |
| Больные ГА                   | 15                                | 0,115 $\pm$ 0,013   |
| Больные ГВ                   | 18                                | 0,072 $\pm$ 0,009   |
| Больные ГС                   | 15                                | 0,057 $\pm$ 0,008   |
| ВИЧ-инфицированные           | 20                                | 0,069 $\pm$ 0,012   |
| Больные ИМ                   | 15                                | 0,106 $\pm$ 0,027   |
| Больные ЦМВИ                 | 15                                | 0,072 $\pm$ 0,009   |

типа — источника антропоноза, тем не менее, наличие в его структуре общих для разных генотипов вируса эпитопов обеспечивает возможность применения не только в медицинской практике, но также в ветеринарии и, с большой долей вероятности, для изучения циркуляции вируса среди широкого спектра его природных резервуаров.

В научной литературе имеются сообщения о перекрестной иммунореактивности при выявлении антител к ВГЕ и некоторым герпесвирусам (ВЭБ, ЦМВ), осложняющей интерпретацию результатов серодиагностики ГЕ [8]. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей полученного белка и белков герпесвирусов не выявил гомологий, что теоретически свидетельствует об отсутствии идентичных эпитопов в их составе. Методом ИФА показано взаимодействие полученного рекомбинантного полипептида с сыворотками крови больных ГЕ и реконвалесцентов и отсутствие кросс-реактивности с образцами, содержащими серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и возбудителями инфекционной патологии печени другой этиологии (герпесвирусы, ВИЧ).

Для более глубокого изучения антигенных свойств полученного белка и подтверждения возможности его применения в диагностических тестах планируются дальнейшие иммунологические исследования с более репрезентативными выборками специфических и контрольных образцов сывороток крови людей и животных.

*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 рEL5а, 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., Гринев А.А., Амиантова И.И. и др. Получение рекомбинантных полипептидов, содержащих антигенные детерминанты вируса гепатита Е. Вопросы вирусологии. 1998, 43 (6): 266-269.
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. Практическая химия белка. М., 1989.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
8. Huams 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.
9. 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.
10. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics. 2004, 5: 150-163.
11. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 1983, 157 (1): 105-132.
12. Li S.W., Zhang J., He Z.Q. et al. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid. J. Biol. Chem. 2005, 280 (5): 3400-3406.

13. Osterman A. et al. Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes. *Virology J.* 2012, 9: 28-32.
14. 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.
15. 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.
16. Ulanova T.I., Obriadina A.P., Talekar G. et al. A new artificial antigen of the hepatitis E virus. *J. Immunoassay Immunochem.* 2009, 30 (1): 18-39.
17. Xinjie Wang, Qin Zhao, Lu Dang et al. Characterization of two novel linear B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (HEV) that are common to avian, swine, and human HEVs. *J. Virol.* 2015, 4, 89 (10): 5491-501.
18. Yamashita T., Mori Y., Miyazaki N. et al. Matsuura biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009, 106 (31): 12986-12991.

*Поступила 26.07.17*

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*О.В.Рыбальченко<sup>1,2</sup>, О.Г.Орлова<sup>1,2</sup>, Л.Б.Захарова<sup>1</sup>, О.Н.Вишневская<sup>1,2</sup>, А.Г.Марков<sup>1</sup>*

## **ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ И ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ НА ПЛОТНЫЕ КОНТАКТЫ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫС**

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, <sup>2</sup>ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

*Цель.* Исследование влияния пробиотических бактерий *Lactobacillus plantarum* 8PA3 и *Escherichia coli* M17 и липополисахаридов на ультраструктуру плотных контактов энтероцитов слизистых оболочек тощей кишки крыс. *Материалы и методы.* В работе применяли липополисахарид *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, Германия) и пробиотические бактерии *L. plantarum* 8PA3 и *E. coli* M17. Исследование выполняли на крысах самцах линии Wistar. Сравнительный анализ ультратонкого строения энтероцитов и плотных контактов проводили при последовательной инкубации тощей кишки крыс с пробиотическими бактериями *L. plantarum* 8PA3 и *E. coli* M17, липополисахаридами и комплексом указанных бактерий с липополисахаридами. *Результаты.* Воздействие *L. plantarum* 8PA3 на слизистую оболочку тощей кишки крыс по ряду признаков оказалось сходным с действием *E. coli* M17, что проявлялось в сохранении интактной структуры межклеточного пространства и плотных контактов. При этом обнаруженные в цитоплазме энтероцитов полые сферические включения с фрагментами бактерий, окруженных мембранами, свидетельствовали о возможности проникновения пробиотических бактерий через слизистую оболочку тощей кишки трансцеллюлярным путем. При одновременном воздействии на энтероциты тощей кишки комплекса из пробиотических бактерий с липополисахаридами деструктивных изменений в структуре плотных контактов не отмечали, однако в значительном числе случаев бактериальные клетки обнаруживались в межклеточном пространстве рядом с бокаловидными клетками. *Заключение.* Выявлен сходный характер воздействия грамположительных бактерий *L. plantarum* 8PA3 и грамотрицательных бактерий *E. coli* M17 и их комплексов с липополисахаридами на плотные контакты эпителиоцитов тощей кишки. На основании морфологического анализа высказано предположение о возможном влиянии липополисахаридов на участие пробиотических бактерий в парацеллюлярном транспорте, однако в отсутствие липополисахаридов пробиотические бактерии, возможно, проникали через слизистую оболочку тощей кишки крыс трансцеллюлярным путем.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 80—87