

О признании достижений Института за последние годы свидетельствуют награды, премии и почетные звания сотрудников. Ордена: Орден Дружбы народов — Анджапаридзе О.Г., Орден Почета — Семенов Б.Ф., Орден Дружбы — Дедясова Р.Г., Международный почетный знак — орден «Бифуркационная игла» — присужден за активное участие в ликвидации оспы на земле (Анджапаридзе О.Г., Булк В.Ф., Маренникова С.С., Мальцева Н.Н., Шелухина Э.М.). Премии Совета Министров СССР: 1959 г. — за разработку и внедрение в практику полиомиелитной инактивированной вакцины (Анджапаридзе О.Г., Соловьев В.Д., Доссер Е.М. и др.), 1981 г. — за создание технологий рестриктирующих ферментов (Семенов Б.Ф., Цветкова Н.В., Жданова Л.Г., Грубер И.М., в составе авторского коллектива). Премии Правительства РФ: 1999 г. — «Разработка и организация производства новых высокоэффективных средств диагностики ВИЧ-инфекции и гепатитов А, В, С» (Зверев В.В., Гольцов В.А., Суханова Л.Л., в составе авторского коллектива); 2005 г. — «Разработка, научное обоснование и внедрение системы защиты населения РФ от новых биологических угроз» (Зверев В.В., Семенов Б.Ф., в составе авторского коллектива). Звания «Заслуженный деятель науки Российской Федерации» удостоены: Анджапаридзе О.Г., Семенов Б.Ф., Баснакьян И.А., Гендон Ю.З., Гервазиева В.Б., Егорова Н.Б., Костинов М.П., Маренникова С.С., Мацевич Г.Р.

Переходя 100-летний рубеж создания Института и сохраняя научные традиции, НИИВС им. И.И. Мечникова продолжает выполнять приоритетные фундаментальные и прикладные исследования, направленные на создание эффективных и безопасных иммунобиологических препаратов для профилактики, диагностики и иммунотерапии инфекционных и аллергических заболеваний.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Г.И.Алаторцева¹, А.В.Сидоров¹, Л.Н.Нестеренко¹, Л.Н.Лухверчик¹, В.В.Доценко¹, И.И.Амиантова¹, М.В.Жукина¹, В.Ю.Кабаргина¹, А.В.Милованова¹, Д.С.Воробьев¹, Ю.И.Аммур¹, М.И.Михайлов^{1,2}, К.К.Кюрегян^{1,2}, Е.Ю.Малинникова^{1,2}, С.В.Жаворонок³, В.М.Блинов¹, В.В.Зверев^{1,4}

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА КАПСИДА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е ТРЕТЬЕГО ГЕНОТИПА: КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА, ОЦЕНКА АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²Российская медицинская академия последипломого образования, Москва; ³Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь, ⁴Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Цель. Разработка рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита Е (ВГЕ) 3 генотипа и исследование его антигенных свойств. *Материалы и методы.* Штаммы E.coli, плазмидные векторы, серологический и клинический материал, иммуноферментные тест-системы. Молекулярно-биологические, биоинформационные, биотехнологические, биохимические и серологические методы. *Результаты.* С использованием вирусосодержащего материала от свиней из Белгородской области РФ получен рекомбинантный штамм E.coli — продуцент С-концевого фрагмента белка ORF2 в составе слитного с β-галактозидазой полипептида. Рекомбинантный белок выделен из телец-включений биомассы штамма-продуцента и очищен с помощью эксклюзионной хроматографии. Антигенная специфичность полученного рекомбинантного полипептида подтверждена в иммунохимических реакциях (ИФА, Вестерн-блоттинг) с образцами сывороток крови больных гепатитом Е и контрольных групп пациентов (здоровых доноров, больных гепатитами А, В, С, инфекционным мононуклеозом, цитомегаловирусной инфекцией и ВИЧ-инфицированных). *Заключение.* Разработан рекомбинантный антиген ORF2 ВГЕ 3 генотипа и показана возможность его применения в диагностических тестах.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 10—17

Ключевые слова: вирус гепатита Е 3 генотипа, ген *orf2*, капсидный белок, рекомбинантный антиген ORF2, иммуноферментный анализ, Вестерн-блоттинг

G.I. Alatorseva¹, A.V. Sidorov¹, L.N. Nesterenko¹, L.N. Luhverchik¹, V.V. Dotsenko¹, I.I. Amiantova¹, M.V. Zhukina¹, V.Yu. Kabargina¹, A.V. Milovanova¹, D.S. Vorobev¹, Yu.I. Ammur¹, M.I. Mikhailov^{1,2}, K.K. Kyuregyan^{1,2}, E.Yu. Malinnikova^{1,2}, S.V. Zhavoronok³, V.M. Blinov¹, V.V. Zverev^{1,4}

DEVELOPMENT OF HEPATITIS E 3 GENOTYPE RECOMBINANT PROTEIN CAPSID OF: CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION, EVALUATION OF THE ANTIGENIC PROPERTIES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow; ³Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus; ⁴Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. The development of the hepatitis E virus (HEV) genotype 3 recombinant capsid protein. *Materials and methods.* *E.coli* strains, plasmid vectors, serological and clinical samples, ELISA reagent kits, molecular biological, bioinformatic, biotechnological, biochemical and serological methods. *Results.* Using virus-containing material from pigs of Belgorod region (Russian Federation) we made *E.coli* strains producing recombinant capsid protein, containing C-terminal of viral ORF2 protein fragment fused to *E.coli* β -galactosidase. Recombinant protein ORF2 had been isolated from the bacterial inclusion bodies and purified by size exclusion chromatography. Antigenic specificity of the recombinant polypeptide was confirmed by ELISA and Western blotting with sera of hepatitis E patients and reference groups (healthy donors, patients with hepatitis A, B, C, infectious mononucleosis, cytomegalovirus infection and HIV-infected patients). *Conclusion.* HEV genotype 3 ORF2 recombinant antigen had been developed, and the possibility to use it in diagnostic tests had been experimentally shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 10–17

Key words: HEV genotype 3, orf2 gene, capsid protein, recombinant ORF3 antigen, ELISA, Western blot

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит Е (ГЕ) — острое вирусное инфекционное заболевание с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, реализуемым преимущественно водным путем, характеризуется острым течением и частым развитием тяжелых исходов (нередко летальных) у беременных. Источником инфекции являются больные с любой формой заболевания: как манифестной, так и субклинической безжелтушной. При бессимптомном течении ГЕ у домашних животных (свиней, крупного рогатого скота и др.) и птиц серологические и молекулярно-генетические маркеры ГЕ выявляются с частотой от 0,5 % до 70 %.

В РФ с 2013 г. регистрация случаев острого ГЕ включена в реестр официальной инфекционной заболеваемости страны. Однако в России, а также в странах Центрально-Азиатского региона бывшего СССР, где существуют стойкие очаги ГЕ, система серодиагностики ГЕ в широкую медицинскую практику не внедрена, что, вероятно, связано с отсутствием необходимых диагностических тест-систем, с одной стороны, и отсутствием эпидемиологической настороженности — с другой.

Лабораторное подтверждение ГЕ основывается на обнаружении РНК ВГЕ в фекалиях и/или сыворотке крови заболевших, а также выявлении IgM и/или нарастание титров IgG к ВГЕ в парных сыворотках крови в сочетании с клиническими и биохимическими проявлениями острого гепатита.

Тест-системы для выявления IgG и IgM к ВГЕ основаны на использовании рекомбинантных аналогов антигенов ВГЕ в методах непрямого и «ловушечного» ИФА. Наборы для определения IgG и IgM к ВГЕ широко различаются по показателям чувствительности (от 17 % до 100 %) и сходимости полученных с их применением результатов (от 49 % до 94 %) [7,11], что можно объяснить различиями в составе и структуре применяемых в них антигенов. Антигенные композиции всех имеющихся к настоящему времени тест-систем включают различные С-концевые фрагменты белка вирусного капсида (белка ORF2) ВГЕ, являющегося основным структурным компонентом вириона и мажорным антигеном вируса. Белок ORF2,

кодируемый геном *orf2*, содержит главные антигенные детерминанты вируса, отвечающие за индукцию протективного гуморального иммунного ответа организма-хозяина [9]. Полноразмерный капсидный белок ORF2 ВГЕ не используется в серологических тестах из-за высокой гидрофобности его отдельных участков и связанной с этим слабой растворимостью белка. В С-концевой области белка ORF2, по данным разных исследователей, в положении с 454 по 606 а.о. [10] или с 432 по 660 а.о. [12] локализованы основные иммунодоминантные домены, взаимодействующие со специфическими IgG и IgM у больных ГЕ и реконвалесцентов.

Фрагменты гена *orf2* были клонированы в различных векторных системах экспрессии, включая прокариоты, клетки насекомых и животных, трансгенные растения. Наряду с необходимостью получения рекомбинантных антигенов с наилучшими показателями диагностической эффективности важным является решение технологической задачи масштабирования производства целевого белка. Наиболее экономичным является использование прокариотических векторных систем экспрессии рекомбинантных антигенов в клетках *Escherichia coli*, к достоинствам которых относится дешевизна культивирования, простота выделения большого количества целевого продукта, непродолжительный производственный цикл. Однако существуют препятствия для достижения высоких показателей экспрессии белков в бактериальных клетках, связанные, например, с высоким содержанием GC-пар в клонируемом фрагменте ДНК. Одним из подходов к повышению продуктивности рекомбинантных штаммов *E.coli* является оптимизация кодирующей последовательности клонируемых фрагментов генома ВГЕ [13].

Заболевание у людей ассоциировано с четырьмя генотипами ВГЕ. На территории стран постсоветского пространства доминируют штаммы ВГЕ 1 и 3 генотипов: в Центральной Азии преобладает ВГЕ 1 генотипа, вызывающий заболевание исключительно у людей, ВГЕ 3 генотипа распространен повсеместно и является возбудителем антропозооноза. Примечательно, что с 3 генотипом ВГЕ связана спорадическая заболеваемость в низкоэндемичных регионах.

Белки ВГЕ разных генотипов антигенно различаются [6], что объясняет применение во многих диагностических тестах рекомбинантных антигенов, содержащих отдельные фрагменты белков ВГЕ разных генотипов или их комбинации [14]. Ранее мы сообщали о получении рекомбинантного антигена ORF2 ВГЕ 1 генотипа [2]. В настоящем исследовании была поставлена задача разработки рекомбинантного полипептида, содержащего антигенно значимый С-концевой фрагмент белка ORF2 ВГЕ 3 генотипа с использованием полученного в России вирусного изолята.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа и обработки нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайна праймеров использовали пакет программ VectorNTI ver.11.0. Полипептидные последовательности анализировали дополнительно, используя программу BLAST-Protein. Анализ коротких пептидных гомологий между белком ORF2 ВГЕ 3 генотипа и белками герпес-вирусов человека 1-8 типов проводили, используя ранее описанные алгоритмы [3]. Синтез фрагмента гена *orf2* ВГЕ 3 генотипа был выполнен компанией Евроген (Россия). Клонирование фрагментов ДНК в экспрессирующей векторной системе pEL5a [1] осуществляли по общепринятым методикам [5]. Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили методом Сэнгера в модификации капиллярного электрофореза в ЦКП ВНИИСБ «Биотехнология» на геномном анализаторе «ABI-3130-XL» («Applied Biosystems», США). Получение биомасс культур клеток *E.coli* PLT90, трансформированных векторной или рекомбинантными плазмидами, выделение и очистку рекомбинантных полипептидов проводили с помощью ранее опубликованных методик [4].

В работе использовали сыворотки крови больных ГЕ, предоставленные Белорусским государственным медицинским университетом (г. Минск). В качестве источника вирусной РНК использовали образцы фекалий свиней из свиноводческих хозяйств Белгородской обл. Сыворотки крови условно здоровых лиц и конт-

рольной 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. В качестве положительного контрольного образца в иммунохимических реакциях использовали ранее полученный рекомбинантный полипептид ORF2 ВГЕ 1 генотипа [1], в качестве отрицательного — β -галактозидазу *E.coli*, выделенную из клеток штамма *E.coli* PLT90, трансформированных векторной плазмидой pEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК. 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», Россия), «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-НА-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), «БЛОТ ВИЧ S+0» (ЗАО БТК «Биосервис», Россия).

Вестерн-блоттинг и твердофазный непрямой иммуноферментный анализ проводили с помощью ранее описанных методик [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

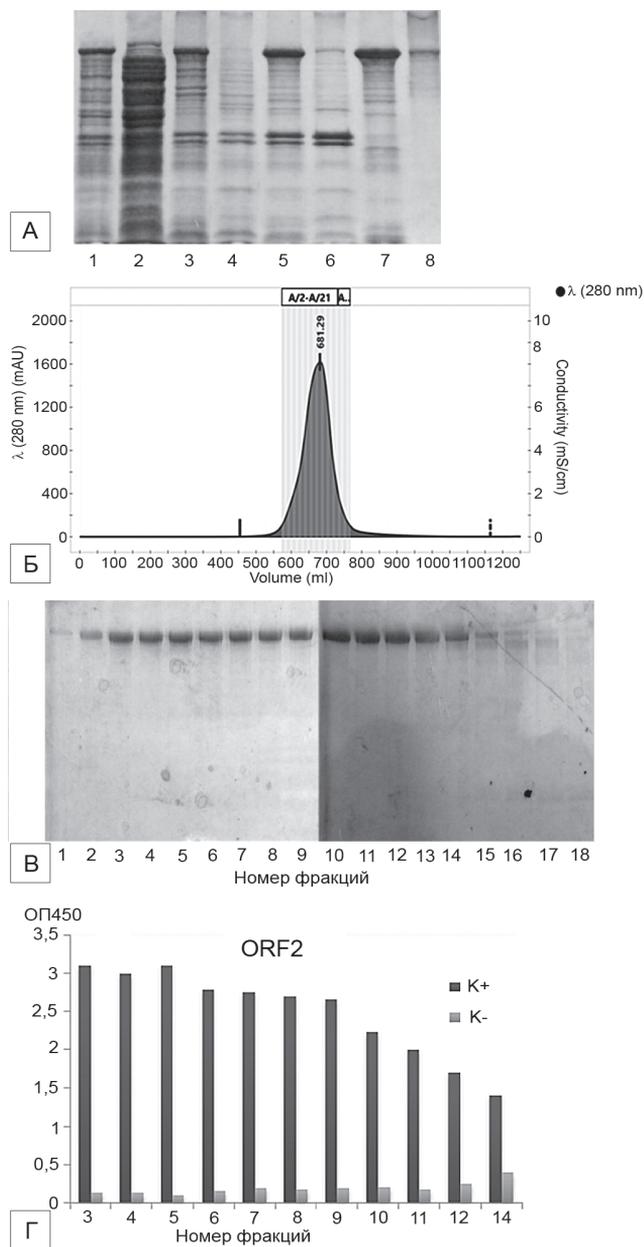
Предварительно проведенный биоинформационный анализ полипептидной последовательности диагностически значимого С-концевого участка белка ORF2 (406-660 а.о.) ВГЕ 3 генотипа показал довольно высокую степень гомологии полипептидных фрагментов разных изолятов вируса. Ранее был клонирован фрагмент генома ВГЕ 3 генотипа, кодирующий N-концевой участок белка ORF2 размером 72 а.о. (MRPRAVLLFFVLLPMLPAPPAGQPSGRRRGRRSGGWGSGFWGNRVNSQP FALPYIHPWNPFAANVISQSGA), где в качестве источника вирусоспецифической РНК использовали биоматериал от свиней хозяйств Белгородской обл. [2]. Кроме того, при генотипировании изолятов ВГЕ, выделенных от свиней из Белгородской области, ранее была определена последовательность размером 100 а.о. (Access numbers Genbank MG053288, MG053289, MG053290): PVNSYNTPTYPGALGLLDFA LELEFRNLTPGNTNTRVSRYTSTARHRLRRGADGTAELTTAATRFMKDLHFTG TNGVGEVGRGIALTLFNLADTLLGG. В результате проведенного анализа из базы данных нуклеотидных последовательностей NCBI были выбраны наиболее близкие по структуре в приведенных выше участках генома 12 изолятов ВГЕ 3 генотипа, и проведено множественное сравнение кодируемых ими аминокислотных последовательностей белка ORF2. Из них для участка 405-660 а.о. наиболее гомологичной оказалась последовательность HM055578 (Венгрия), которую использовали в качестве консенсуса. Дополнительный сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал высокую степень ее сходства с 102 имеющимися в базах данных белковыми последовательностями: для 7 из них совпадение составило 100 %, для 42 — 99 %, для 36 — 98 %, для 17 — 97 %. В частности, было показано полное совпадение консенсусной последовательности выбранного участка белка ORF2 HM055578 (Венгрия) с последовательностями EU723513.1 (Испания), KJ873911.1 (Германия), KT591532.1 (Франция), FJ653660.1 (Таиланд), LC055973.1 (Япония, Токио), AV850879.1 (Япония).

Для выбранного фрагмента ORF2 была рассчитана соответствующая ему нуклеотидная последовательность, оптимизированная для экспрессии в бактериальной системе *E.coli*. Фрагмент гена *orf2* с дополнительными фланкирующими сайтами рестриктазы *Bam*HI, синтез которого был выполнен компанией «Евроген», вставляли в плазмиду pEL5a по соответствующему сайту рестрикции. После лигирования, трансформации компетентных клеток *E.coli* PLT90, селекции на устойчивость к ампицил-

лину получали отдельные колонии бактерий, из которых выделяли плазмидную ДНК на колонках «Евроген» и проверяли наличие вставки в нужной ориентации с помощью рестрикционного анализа с последующим подтверждением секвенированием.

С целью выявления потенциально идентичных линейных эпитопов был проведен анализ гомологий коротких пептидов между белком ORF2 ВГЕ 3 генотипа и белками семейства герпесвирусов человека 1-8 типов. Для этой цели в доступных базах данных полипептидных последовательностей был проведен поиск соответствующих мотивов с их последующим множественным сравнением. Как ранее в случае с белком ORF2 1 генотипа [1], при анализе экспрессируемого фрагмента ORF2 3 генотипа было подтверждено отсутствие заметной гомологии с белками цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейн-Барр (ЭБВ) и других герпесвирусов.

Клоны штаммов-продуцентов рекомбинантного белка ORF2 ВГЕ 3 генотипа, полученные после трансформации компетентных клеток рекомбинантными плазмидами, отбирали, анализируя белковые профили лизатов их культур методами электрофореза и иммуноблоттинга с сыворотками крови больных ГЕ, содержащими специфические IgG. Степень очистки рекомбинантного антигена на отдельных стадиях процесса выделения телец включений из лизата клеток культуры рекомбинантного штамма *E.coli* контролировали с помощью электрофореза в 10 % SDS-полиакриламидном геле. Электрофоретический анализ фракций белка после хроматографической очистки подтвердил отделение рекомбинантного полипептида от основной массы примесных белков. Белковые фракции тестировали также методом ИФА в реакциях с пулом образцов сывороток крови, содержащих IgG к ВГЕ, и с пулом отрицательных сывороток (рис.). Фракции, содержащие наибольшее количество целевого белка и



Выделение и очистка белка ORF2 ВГЕ 3 генотипа: электрофорез в 10% SDS-полиакриламидном геле по стадиям выделения белка ORF2 из биомассы *E.coli* (1 — биомасса; 2, 4, 6 — супернатанты после последовательных отмывок; 3, 5, 7 — осадки фракции телец включений после последовательных отмывок; 8 — белок ORF2 ВГЕ 1 генотипа [1]) (А); хроматограмма очистки белка ORF2 ВГЕ 3 генотипа методом гель-фильтрации (Б); результаты тестирования фракций белка ORF2 после хроматографической очистки методом электрофореза (В) и методом ИФА (Г), К+ сыворотки крови больных ГЕ, К — сыворотки крови здоровых доноров.

наименьшее — примесей, а также показавшие наилучшую реактивность в ИФА с положительными сыворотками и минимальные неспецифические взаимодействия — с отрицательными, объединяли, полученный препарат белка дополнительно исследовали методом электрофореза. Молекулярная масса полученного рекомбинантного белка, определенная по результатам электрофоретического профиля лизатов штамма-продуцента и препаратов выделяемого из них целевого продукта, соответствовала расчетной величине (145 кДа). Продуктивность полученного рекомбинантного штамма составила не менее 3 мг рекомбинантного белка на 1 г биомассы. Степень очистки белка по результатам анализа данных электрофореза с помощью прибора GelDocTMEZImager (BioRad, США) составила 100 %.

Для оценки антигенной специфичности полученного рекомбинантного белка были сформированы контрольные панели образцов сывороток крови, протестированных с помощью коммерческих тест-систем на содержание серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов А, В, С, Е, ВЭБ, ЦМВ, ВИЧ-1, ВИЧ-2. В качестве антигена сравнения использовали ранее полученный рекомбинантный полипептид ORF2 ВГЕ 1 генотипа [1]. Средние значения оптической плотности (ОП) в обследованных методом ИФА группах образцов при использовании в качестве антигена рекомбинантных белков ORF2 ВГЕ 1 и 3 генотипа представлены в табл.

При взаимодействии с полученным белком ORF2 3 генотипа все 50 образцов (100%) от больных ГЕ и реконвалесцентов были позитивными с ОП от 0,254 до 1,897 о.е./мл. Все образцы, положительно прореагировавшие с рекомбинантным антигеном ORF2 3 генотипа, были выявлены как содержащие специфические IgG в реакциях с ранее полученным рекомбинантным антигеном ORF2 1 генотипа, наблюдаемое при этом несколько сниженное значение ОП_{сред} можно объяснить использованием серологического материала из региона с преимущественным распространением вируса 3 генотипа (Республика Беларусь). Результаты тестирования образцов контрольных групп (здоровые доноры, пациенты с вирусными гепатитами А, В и С, ВИЧ-инфицированные лица, больные инфекционным мононуклеозом, цитомегаловирусной инфекцией) показали отсутствие позитивных реакций с полученными рекомбинантными белками, что позволяет сделать заключение о их высокой антигенной специфичности. 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.

Сравнительный анализ результатов ИФА, полученных с использованием набора сравнения «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», показал полное совпадение: среди обследованных больных ГЕ и реконвалесцентов не выявлено ложноотрицательных образцов, среди обследованных здоровых доноров и контрольных групп — ложноположительных образцов.

Относительно более низкое значение ОП_{сред} (0,832±0,09) при исследовании положительных проб в референс-наборе можно объяснить отсутствием в составе его антигенной основы белков ВГЕ 3 генотипа [14] и использованием клинических образцов из региона (Республика Беларусь) с преимущественным распространением ВГЕ 3 генотипа.

Сложность выделения протяженных фрагментов геномной РНК из вирусосодержащего клинического материала

Оценка антигенной специфичности рекомбинантных антигенов ORF2 ВГЕ 1 и 3 генотипов методом ИФА

Исследуемая группа	Средняя величина оптической плотности при λ=450 нм, ОП _{сред} (M±m)			
	Количество образцов	ORF2 1 генотип	ORF2 3 генотип	Референс-набор «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (E-151), ОП _{сп.} = 0,195
Больные ГЕ и реконв.	50	1,105±0,113	1,217±0,03	0,832±0,09
Здоровые доноры	75	0,072±0,009	0,028±0,002	0,029±0,005
Больные ГА	20	0,115±0,013	0,074±0,05	0,038±0,006
Больные ГВ	20	0,072±0,009	0,031±0,002	0,027±0,004
Больные ГС	20	0,057±0,008	0,025±0,004	0,031±0,005
ВИЧ-инф.	20	0,069±0,012	0,086±0,004	0,046±0,008
Больные инф. мононук.	20	0,106±0,027	0,048±0,003	0,026±0,01
Больные ЦМВИ	20	0,072±0,009	0,021±0,001	0,034±0,007

объясняет выбор рядом авторов стратегия получения рекомбинантных антигенов с использованием теоретически рассчитанных синтетических аналогов фрагментов вирусного генома, кодирующих иммунодоминантные участки диагностически значимых антигенов ВГЕ [14]. Данный подход был успешно реализован и в нашем исследовании. На основании анализа научной литературы и результатов проведенного биоинформационного исследования была поставлена и решена цель получения рекомбинантного антигена, содержащего фрагмент с 406 по 660 а.о. капсидного белка ORF2 ВГЕ 3 генотипа. Принимая во внимание наличие этапов денатурации в применяемой методике очистки белка из нерастворимых телец включений, можно утверждать, что в его составе присутствуют преимущественно линейные эпитопы. Полученные нами результаты по анализу антигенной реактивности рекомбинантных белков ORF2 ВГЕ 1 и 3 генотипов, а также многолетний успешный опыт применения рекомбинантных антигенов для диагностики ГЕ согласуются с данными исследователей, показавших существенный вклад линейных эпитопов в организацию антигенной структуры капсидного белка ВГЕ. 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 [12]. 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 [15]. Полученный в настоящей работе рекомбинантный белок обладает антигенной специфичностью ВГЕ 3 генотипа — источника антропоозноза, что обеспечивает возможность применения не только в медицинской практике, но также в ветеринарии и, с большой вероятностью, 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]. Отсутствие гомологий у полученного нами белка и белков герпесвирусов свидетельствует об отсутствии идентичных эпитопов в их составе. Методом ИФА показано отсутствие кросс-реактивности полученного рекомбинантного полипептида с образцами, содержащими серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и возбудителями инфекционной патологии печени другой этиологии.

Для более глубокого изучения антигенных свойств полученного белка планируется проведение исследований на расширенных выборках 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. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И., Кабаргина В.Ю., Милованова А.В., Воробьев Д.С., Аммура Ю.И., Блинов В.М., Нурматов А.З., Нурматов З.Ш., Байызбекова Д.А., Касымов О.Т., Кюрегян К.К., Михайлов М.И., Жаворонок С.В., Зверев В.В. Получение рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита Е первого генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. Журн. микробиол. 2017, 6: 72-80.
2. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Милованова А.В., Аммура Ю.И., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Жаворонок С.В., Зверев В.В. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 3 генотипа и оценка его антигенных свойств. Журн. микробиол. 2018, 5:46-53.
3. Блинов В.М., Гейслер В., Краснов Г.С., Шаргунов А.В., Шурдов М.А., Зверев В.В. Клеточные аналоги вирусных белков. Журн. микробиол. 2014, 2:101-113.
4. Гловер Д. Новое в клонировании ДНК. Методы. М, 1989.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.

6. Behloul N., Wen J., Dai X. et al. Antigenic composition and immunoreactivity differences between HEV recombinant capsid proteins generated from different genotypes. *Infect. Genet. Evol.* 2015, 34: 211-20.
7. Drobeniuc J., Meng J., Reuter G. et al. Serological assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 51(3): e24-e27.
8. 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.
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. Li 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.
11. Mast E.E., Alter M.J., Holland P.V. et al. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology.* 1998, 27(3): 857-861.
12. Osterman A., Vizoso Pinto M.G., Haase R. et al. Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes. *Virology Journal.* 2012, 9: 28-32.
13. Reza Taherkhani, Manoochehr Makvandi, Fatemeh Farshadpour. Development of enzyme-linked immunosorbent assays using 2 truncated ORF2 proteins for detection of IgG antibodies against Hepatitis E Virus. *Ann. Lab. Med.* 2014, 34(2): 118-126.
14. Ulanova T.I., Obriadina AP, Talekar G. et al. A new artificial antigen of the hepatitis E virus. *J. Immuno-assay Immunochem.* 2009, 30(1): 18-39.
15. 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, 89(10): 5491-501.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

В.Г.Арзумян, Т.А.Артемяева, А.М.Иксанова

ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И НЕКОТОРЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Оценка активности цельной сыворотки человека и фракции ее антимикробных пептидов против клинически значимых дрожжей и сравнение этих показателей у разных видов млекопитающих. *Материалы и методы.* В исследовании использовали пуловые образцы человеческой, бычьей, кроличьей и мышьиной сыворотки; культуры дрожжей *Candida albicans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Massezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum*, *Saccharomyces cerevisiae*. Фракции антимикробных (поли)пептидов (АМП-фракции) получали путем фильтрации сывороток через молекулярные фильтры с диаметром пор 100 кДа. Активность сывороток и их АМП-фракций оценивали спектрофотометрическим методом. *Результаты.* Установлено, что активность цельных сывороток млекопитающих варьировала в пределах 73 — 89% независимо от рода дрожжей, тогда как активность АМП-фракций варьировала более значительно. Так, наименьшую чувствительность к АМП-фракциям сывороток проявляли дрожжи *M. furfur* (активность АМП-фракций 0÷13,5%) и *G. candidum* (0÷6,5%), а наибольшую — *R. mucilaginosa* (12,3÷56,4%), *S. albicans* (22,0÷32,9%) и *S. neoformans* (17,1÷29,9%). Активность АМП-фракций человеческой сыворотки значимо не коррелировала ни с одной из таковых у прочих млекопитающих ($r=0,459\div0,527$). Значимые корреляции имели место между этими показателями для кроличьей и бычьей сывороток ($r = 0,827$), а также для кроличьей и мышьиной ($r = 0,753$). *Заключение.* Различия в величинах активности АМП-фракций сывороток в отношении разных родов/видов дрожжей указывают на наличие специфичности, обусловленной различиями в структурной организации цитоплазматической мембраны клеток дрожжей, а также отличиями в составе АМП у разных млекопитающих.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 17—22

Ключевые слова: противогрибковая активность, сыворотка, антимикробные пептиды, дрожжи, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*