2. L'vov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M. Yu., Prilipov A.G., Kolobukhina L.V., Malyshev N.A. et al. Distribution of a new pandemic influenza virus A (H1N1)v in Russia. *Voprosy virusologii.* 2010; 54 (3): 4—9. (in Russian)
3. Qureshi A., MacLeod M., Hungerbühler K. Modeling aerosol suspension from soils and oceans as sources of micropollutants to air. *Chemosphere.* 2009; 77(4): 495—500.
4. Bac V.T., Hien P.D. Regional and local emissions in red river delta, Northern Vietnam. *Air Qual. Atmos. Health.* 2009; 2(3): 157—67.
5. Psillakis E., Cheng J., Hoffmann M.R., Colussi A.J. Enrichment factors of perfluoroalkyl oxoanions at the air/water interface. *J. Phys. Chem. A.* 2009; 113(31): 8826—9.
6. Fleming L.E., Bean J.A., Kirkpatrick B., Cheng Y.S., Pierce R., Naar J. et al. Exposure and effect assessment of aerosolized red tide toxins (brevetoxins) and asthma. *Environ. Health Perspect.* 2009; 117(7): 1095—100.
7. García-Flor N., Dachs J., Bayona J.M., Albaigés J. Surface waters are a source of polychlorinated biphenyls to the coastal atmosphere of the North-Western Mediterranean Sea. *Chemosphere.* 2009; 75(9): 1144—52.
8. Paytan A., Mackey K.R., Chen Y., Lima I.D., Doney S.C., Mahowald N. et al. Toxicity of atmospheric aerosols on marine phytoplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106(12): 4601—5.
9. Horemans B., Krata A., Buczynska A.J., Dirtu A.C., Van Meel K., Van Grieken R. et al. Major ionic species in size-segregated aerosols and associated gaseous pollutants at a coastal site on the Belgian North Sea. *J. Environ. Monit.* 2009; 11(3): 670—7.
10. Procedure for sampling the sea-surface microlayer. *Intergovernmental Oceanographic Commissions. Manuals and Guides.* Vol. 15. UNESCO; 1985.
11. Goncharuk V.V., Lapshin V.B., Chichaeva M.A., Matveeva I.S., Samsoni-Todorov A.O., Taranov V.V. et al. Heavy metals, aluminum, and arsenic in aerosols of the world ocean. *J. Water Chem. Technol.* 2012: 34(1): 1—10.
12. Kireev D.E., Akanina D.S., Grebennikova T.V., Zaberezhnyy A.D., Shchelkanov M.Yu., L'vov D.K. The development of test systems for the detection and typing of influenza A virus by polymerase chain reaction. *Voprosy virusologii.* 2007; 52(4): 7—22. (in Russian)
13. Potapova N.I., Grebennikova T.V., Zaberezhnyy A.D., Krasnova M.A., Skotnikova O.I., Aliper T.I. et al. Development of test-systems based on polymerase chain reaction (PCR) in real time for the differential diagnosis of Mycobacterium. *Vestnik Rossiyskogo Universiteta Druzhby Narodov.* 2004; 28(4): 300—8. (in Russian)
14. Desboeufs K.V., Sofikitis A., Losno R., Colin J.L., Ausset P. Dissolution and solubility of trace metals from natural and anthropogenic aerosol particulate matter. *Chemosphere.* 2005; 58(2): 195—203.
15. Deane G.B., Stokes M.D. Scale dependence of bubble creation mechanisms in breaking waves. *Nature.* 2002; 418(6900): 839—44.
16. Lesnikov E.V., Chichaeva M.A., Lapshin V.B., Grebennikova T.V., Syroeshkin A.V. Bioaerosols Atlantic Ocean and a method for monitoring an aerosol nanoscale dimensions. *Estestvennye i tekhnicheskie nauki.* 2010; (5): 349—55. (in Russian)
17. Goncharuk V.V., Samsoni-Todorov A.O., Taranov V.V., Lapshin V.B., Chichaeva M.A., Syroeshkin A.V. et al. The system of the efficient monitoring of air quality in maritime cities and health resort areas: Pollution of the nearwater layer of the atmosphere with sea aerosols. *J. Water Chem. Technol.* 2012; 34(2): 79—87.
18. Kimura K., Tomaru Y. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting the marine diatom Chaetoceros sp. strain SS628-11 isolated from western Japan. *PLoS One.* 2013; 8(12): e82013.
19. Mizuno C.M., Rodriguez-Valera F., Kimes N.E., Ghai R. Expanding the marine virosphere using metagenomics. *PLoS Genet.* 2013; 9(12): e1003987.
20. Martínez J.M., Swan B.K., Wilson W.H. Marine viruses, a genetic reservoir revealed by targeted viromics. *ISME J.* 2014; 8(5): 1079—88.

Поступила 29.09.16

Принята в печать 11.10.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.891:578.1].083.2

Кузнецова Т.В.[1,2], Смирнова М.С.[1], Леонович О.А.[1], Гордейчук И.В.[1], Бирюкова Ю.К.[1], Зылькова М.В.[1], Тыньо Я.Я.[1], Белякова А.В.[1], Шевелев А.Б.[1]

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА-АНТИГЕНА NS5A ВИРУСА ГЕПАТИТА С

[1]ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, г. Москва;
[2]National institute of Public Health development, 11619, Tallinn, Estonia

Задача создания универсальной платформы для получения доступных рекомбинантных продуцентов вирусных белков, обладающих иммуногенными свойствами, до настоящего времени не решена и по-прежнему актуальна. Высокая токсичность вирусных белков для клеток-хозяев, низкий уровень продукции, аномальный фолдинг целевых продуктов часто создают непреодолимые препятствия для конструирования продуцентов вирусных белков. В данной работе разработан новый метод конструирования и скрининга банков делеционных производных генов вирусных антигенов, обеспечивающий возможность создания их искусственных производных, адаптированных для экспрессии в клетках микробных продуцентов. В основе лежит метод ПЦР-амплификации фрагментов целевого гена с использованием системы вырожденных и адаптерных праймеров, позволяющий предотвратить самопроизвольное образование дуплексов (димеров) в отсутствие матричной ДНК. Для отбора делеционных производных, пригодных для экспрессии *in vivo*, полученные *in vitro* фрагменты клонированы в вектор прямой селекции pQL30, содержащий ген β-галактозидазы *E. coli* со встроенным полилинкером с мутацией смещения трансляционной рамки считывания. С использованием скринингового подхода на основе этого метода сконструирован искусственный вариант гена белка NS5A вируса гепатита С (ВГС), обладающий оптимальными биотехнологическими характеристиками. В работе использованы 27 образцов NS5A ВГС длиной 1670 п. н. Получен банк фрагментов исходного гена в форме смеси продуктов ПЦР. Отобрано 40 клонов с размером вставки от 50 до 700 п. н. путем клонирования фрагментов в вектор прямой селекции pQL30. Клоны протестированы на уровень β-галактозидазной активности и иммуногенные свойства. В результате отобран клон, продуцирующий растворимый белок массой около 114 кДа, накапливающийся с выходом до 0,3% от общего содержания белка в клетке и показавший положительную реакцию с антителами сыворотки крови больных, инфицированных ВГС генотипа 1b, но не с сыворотками здоровых доноров.

Для корреспонденции: Бирюкова Юлия Константиновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова», 142782, г. Москва. E-mail: kudykina_yuliya@mail.ru

PROBLEMS OF VIROLOGY. 2017; 62(1)
DOI http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2017-62-1-17-25

ORIGINAL RESEARCH

Ключевые слова: *вирус гепатита С; скрининг; банк; полимеразная цепная реакция; рэндом-праймер; антиген; продуцент; E. coli; NS5A.*

Для цитирования: Кузнецова Т.В., Смирнова М.С., Леонович О.А., Гордейчук И.В., Бирюкова Ю.К., Зылькова М.В., Тыньо Я.Я., Белякова А.В., Шевелев А.Б.Разработка нового метода получения белка-антигена NS5A вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(1): 17-25. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-17-25

Kuznetsova T.V.[1,2], Smirnova M.S.[1], Leonovich O.A.[1], Gordeichuk I.V.[1], Biriukova Iu.K.[1], Zylkova M.V.[1], Tyn'o Ya.Ya.[1], Belyakova A.V.[1], Shevelev A.B.[1]

A NEW METHOD OF PRODUCING NS5A ANTIGEN OF HEPATITIS C VIRUS

[1] Chumakov institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides, Moscow,142782, Russian Federation;
[2] National institute of Public Health Development, Tallinn, 11619, Estonia

A task of creating a universal platform for engineering affordable recombinant producers of viral proteins conserving immunogenicity has not been solved yet. High toxicity of the viral proteins for the host cells, low yield and abnormal folding of the products often present severe obstacles to obtaining producers of the viral proteins. In this work, we report a new method of engineering and screening of deletion libraries from the viral antigen genes. This method allows selection of artificial derivatives of these genes adapted for expression in microbial producer cells. The method involves PCR amplification of the gene fragments using a system of randomized and adapter primers, which allows the spontaneous formation of duplexes from the random primers in the absence of the template DNA to be prevented. For selecting variants capable of *in vivo* expression, the obtained PCR products are cloned to a special vector of a direct phenotypical selection pQL30. It contains E. coli β-galactosidase gene with an inserted polylinker producing a frame-shift mutation. Using this screening method, an artificial variant of hepatitis C (HCV) NS5a gene with optimal biotechnological properties was established. 27 clinical specimens of 1670 bp long HCV1b NS5a fragments were used as a source gene. A PCR bank of the deletion derivatives was produced. 40 LacZ-positive clones based on pQL30 vector with a 50-700 bp long insertion were selected. The LacZ activity of the cell lysates and the immunogenicity of the products were tested. As a result, a single clone encoding a soluble protein with Mr = 114 kDa was selected. Its yield reached 0.3% of the total cell protein. It was highly reactive with sera of HCV 1b infected patients but not with sera of the healthy donors.

K e y w o r d s: *hepatitis C virus; screening; library; PCR; random primer; antigen; producer; E. coli; NS5A.*

For citation: Kuznetsova T.V., Smirnova M.S., Leonovich O.A., Gordeichuk I.V., Biriukova Iu.K., Zylkova M.V., Tyn'o Ya.Ya., Belyakova A.V., Shevelev A.B. A new method of producing NS5A antigen of hepatitis C virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2017; 62(1): 17-25. (In Russ.).
DOI: http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2017-62-1-17-25

For correspondence: Iulia K. Biriukova, Ph.D., Researcher of the laboratory of biotechnology, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides, Moscow, 142782, Russian Federation. E-mail: kudykina_yuliya@mail.ru

Information about authors:
Kuznetsova T.V., http://orcid.org/0000-0003-4394-7651
Smirnova M.S., http://orcid.org/0000-0001-9457-2445
Leonovich O.A, http://orcid.org/0000-0002-7463-1505
Gordeichuk I.V., http://orcid.org/0000-0002-3369-3638
Biriukova Iu.K., http://orcid.org/0000-0002-5804-4001
Zylkova M.V., http://orcid.org/0000-0002-6699-1340
Tyn'o Ya.Ya., http://orcid.org/0000-0003-0041-6885
Belyakova A.V., http://orcid.org/0000-0003-4363-6394
Shevelev A.B., http://orcid.org/0000-0003-3564-7405

Acknowledgments. The study was supported within the framework of the Program for basic scientific research of the state academies of science for 2013-2017, Project No. 240 «Development of a new method for obtaining highly effective recombinant producers of virus antigens».
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 18 April 2016
Accepted 24 May 2016

Введение

Доступность очищенных вирусных антигенов до настоящего времени является одним из ключевых факторов, определяющих возможности целенаправленного исследования вирусных инфекций. Они незаменимы для экспериментальной иммунизации животных, при исследовании иммунного ответа на инфекцию у заболевших, разработке и испытаниях вакцин и диагностических систем. Получение очищенных вирусных антигенов с помощью рекомбинантных продуцентов имеет долгую историю и рассматривается в качестве традиционного инструмента многих вирусологических лабораторий. Однако высокая токсичность большинства структурных и неструктурных вирусных белков для любых клеток-хозяев в сочетании с генетически детерминированным механизмом вариабельности вирусов нередко создает непреодолимые препятствия для конструирования необходимых для исследований продуцентов вирусных белков.

Одним из способов решения этой задачи является расчленение целевого гена на фрагменты, оптимальные для экспрессии в бактериальных клетках, методом конструирования и скрининга банка делеционных производных.

Получение серийных делеций — актуальная задача на протяжении последних 20 лет. Делеционные производные используются при секвенировании протяженных участков ДНК, выявлении полиморфизма генов с целью исследования структурно-функциональной организации белков и повышения уровня их продукции в гетерологичных системах.

Предложен ряд методов создания серийных делеций с использованием экзонуклеазы III, нуклеазы Bal31, транспозонов и ДНКазы.

Исторически первым и в то же время популярным методом является применение экзонуклеазы III [1]. Существенные недостатки данного метода — односторонний характер делеций и большое количество исходной ДНК, необходимой для работы.

Использование нуклеазы Bal31 позволяет получить двусторонние симметричные делеции, но также требует значительное количество исходной ДНК.

Метод получения серийных делеций, основанный на транспозонном принципе [2], дает возможность полу-

чить банк с равномерной представленностью делеций. В качестве недостатков метода следует отметить нестабильность его работы и зависимость от реакций *in vivo*.

В литературе [3] также описан способ получения серийных делеций с помощью ПЦР в сочетании с удалением образующихся димеров случайных праймеров гельфильтрацией на колонке с носителем сефадекс. Этот метод лишен недостатков ранее описанных методик, но хроматографическая очистка ПЦР-продуктов затруднена и сопровождается высокой степенью контаминации получаемого банка.

В рамках настоящей работы преследовалась цель выработки оптимального подхода к решению проблемы конструирования рекомбинантных продуцентов вирусных белков на базе *E. coli* и других микроорганизмов. Успех в достижении этой цели зависит от возможности идентификации в составе вирусных белков-антигенов структурных доменов, полностью сохраняющих иммуногенность, но лишенных токсичности при продукции в гетерологичных системах. Получение рекомбинантного белка-антигена с высоким выходом возможно при условии расчленения природного белка на минимальные фрагменты цепи (домены), обладающие способностью к автономному фолдингу. В качестве подходов к вычленению таких доменов в структуре белка может использоваться как рациональный дизайн генов, основанный на идентификации доменов, аналогичных структурным элементам ранее охарактеризованных белков различного происхождения, так и метод скрининга, основанный на конструировании и анализе банков делеционных производных полноразмерных генов вирусных антигенов.

В настоящее время имеется много данных, подтверждающих физиологическую значимость полиморфизма неструктурных антигенов вируса гепатита С (ВГС) [4—7]. В первую очередь этот эффект связывают с участием неструктурных антигенов NS5A и NS5B в снижении чувствительности инфицированных клеток к интерферону α. Этот механизм может в значительной мере определять как течение инфекции ВГС в отсутствие терапии, так и результативность применения терапевтических средств на основе интерферонов и индукторов их синтеза.

В то же время практическая возможность идентификации генотипа ВГС по гену NS5A в ходе клинического обследования остается ограниченной. В первую очередь это обусловлено сложностью идентификации физиологически значимых полиморфизмов, определяющих устойчивость вируса к интерферону, на фоне нейтральных замен. Не исключено, что многие пространственно удаленные полиморфные позиции функционально связаны и не могут быть идентифицированы изолированно. Кроме того, существенную практическую трудность представляет наличие в геномной РНК ВГС развитой вторичной структуры, препятствующей проведению ПЦР-анализа. Это приводит к неодинаковой эффективности амплификации кДНК, соответствующей различным генотипам NS5A. В итоге происходят искажения статистических данных о представленности в выборках тех или иных генотипов.

Альтернативу ПЦР для проведения массовых статистических обследований пациентов представляет твердофазный иммуноферментный анализ (тИФА). Однако в настоящее время не существует коммерчески доступных наборов, позволяющих избирательно выявлять антительный ответ на вариабельные участки белка NS5A. Более того, получение в очищенном состоянии полноразмерного белка NS5A для использования в серологических тестах затруднено сложностью его препаративной наработки с использованием рекомбинантных продуцентов. Перспективным решением для улучшения эффективности продукции белка NS5A в искусственных системах и одновременного конструирования панели «моноспецифичных» антигенов, соответствующих физиологически важным полиморфным позициям этого белка, является получение делеционных производных NS5A с использованием современной технологии иммунологического скрининга.

Целью данной работы была отработка нового высокоэффективного метода конструирования и скрининга делеционных банков и демонстрация возможностей этого метода на модели неструктурного белка NS5A ВГС.

Материал и методы

В работе были использованы 27 образцов кДНК гена NS5A—NS5B из ВГС генотипа 1b (GenBank accession number JX022751—JX022777) длиной 1670 п. н., наработанных с помощью ПЦР с праймерами 1b_6117_S_L (TCCCCCACGCACTATGTGCC) и 1b_7780_AS_L (CGGTARTGGTCGTCCAGGAC). Образцы перечисленных фрагментов кДНК были подвергнуты вторичной ПЦР-амплификации с целью накопления ДНК целевого гена NS5A—NS5B, объединены в пул и очищены с помощью набора Silica bead DNA gel extraction kit («Thermo Fisher Scientific») согласно протоколу производителя.

Очищенный ПЦР-продукт, содержащий целевой ген, в количестве 10 мкг разбавляли в объеме 80 мкл в буфере 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ $MgCl_2$, 50 мМ NaCl, 1 мМ восстановленного дитиотрейтола. Полученную смесь делили на 4 аликвоты объемом 20 мкл каждая. В первую пробирку вносили ДНКазу («Thermo Fisher Scientific») с активностью $1•10^{-4}$ ед/мкл, тщательно перемешивали, и аликвоту полученного раствора объемом 2 мкл переносили во вторую пробирку. Операцию серийного разбавления ДНКазы с шагом 10 раз повторяли с третьей и четвертой пробирками. Время приготовления серии разбавлений ДНКазы не превышало 2 мин.

Подготовленную серию разведений инкубировали 20 мин при 37°С, после чего реакцию останавливали, внося в каждую пробирку по 20 мкл смеси водонасыщенного нейтрального фенола и хлороформа (1:1). Степень деградации ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле. Для дальнейшей работы объединяли и использовали образцы с видимой степенью деградации: концентрация ДНКазы равна $1•10^{-5}$—$1•10^{-6}$ ед/мкл. Объединенную ДНК подвергали фенольной экстракции, осаждали изопропанолом в стандартных условиях и растворяли10 мкл деионизированной воды.

К 10 мкл каждого образца добавили 1 мкл (4 ед.) полимеразы 1 из *E. coli* в соответствующем буфере и инкубировали в течение 1 ч при 37°С. Реакцию останавливали фенольной экстракцией.

ДНК, полученную после фенольной экстракции, растворяли в воде и лигазном буфере общим объемом 30 мкл, добавляли ДНК-лигазу фага Т4. Разделяли смесь на 3 равные порции по 10 мкл. В первую пробирку вносили 1 мкл (4 пмоль) праймера (*supl*, *supl-11* или *supl-17*), перемешав, переносили 2 мкл во вторую пробирку и затем 2 мкл - из второй в третью пробирку. Лигирование протекало в течение 14 ч при 4°С. Затем лигазную смесь использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймера-

ми *ES1* и *ES3*. Прохождение реакции оценивали электрофоретически.

ПЦР-продукт, полученный в предыдущей стадии, очищали с помощью набора Gel extraction kit («Thermo Fisher Scientific») согласно протоколу производителя. Очищенный продукт подвергали воздействию эндонуклеазы рестрикции BamHI при 37°C в течение 2 ч. Аналогичным образом обрабатывали плазмидную ДНК вектора pQL30. Лигирование проводили в течение 14 ч при 4°C. Клетки *E. coli* штамма TG1 трансформировали лигазной смесью и высевали на чашки со средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 0,05% X-gal. Из колоний с восстановленной активностью β-галактозидазы (синих) была выделена плазмидная ДНК. Наличие соответствующей вставки в клонах по сравнению с нерекомбинантным вектором pQL30 выявлялось с помощью ПЦР со стандартными праймерами *pQE-for* и *pUC-for*. В качестве отрицательного контроля использовали нерекомбинантный вектор pQL30. Все отобранные клоны, представляющие собой производные штамма *E. coli* TG1 и несущие отобранные из банка плазмиды, использовали для наработки рекомбинантных белков. В качестве отрицательного контроля, не содержащего целевой вставки, был выбран продуцент полноразмерной β-галактозидазы *E. coli* (β-Gal) и ее слитые бифункциональные производные, содержащие гены лектинов из эндоплазматического ретикулума дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: pLacZ-emp46 и pLacZ-emp47.

Полученные продуценты (включая контрольные культуры) культивировали в течение 14 — 18 ч при 30°C в жидкой среде (0,5% дрожжевой экстракт, 1% пептон, 0,5% NaCl) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина в пробирках объемом 10 мл с 3 мл среды в каждой. Индукцию промотора в клетках продуцента проводили добавлением IPTG до 1 мМ. Клетки собирали низкоскоростным центрифугированием и подвергали дезинтеграции встряхиванием со стеклянными шариками диаметром 0,5 мм. Для количественного определения активности β-галактозидазы по 100 мкл грубого клеточного лизата разделяли на растворимую и нерастворимую фракции, приведенные к эквивалентному объему (нерастворимую клеточную фракцию суспендировали в воде до объема 100 мкл). По 20 мкл растворимой и нерастворимой клеточных фракций от каждой полученной культуры смешивали с 50 мкл субстратной смеси, содержащей 0,02% X-gal, 25 мМ Трис-HCl, pH 8,5. В качестве отрицательного контроля использовали клеточный лизат штамма TG1 (pQL30). Смесь инкубировали при 37°C в течение 2—4 ч, затем замеряли сигнал на спектрофотометре при длине волны (λ) 620 нм.

Выход целевого продукта оценивали при помощи электрофоретического разделения белков по Лэммли с последующим вестерн-блоттингом на нитроцеллюлозной мембране и детекцией целевого белка с использованием сывороток крови людей, инфицированных ВГС. Для этого грубый клеточный лизат центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 мин. Белки растворимой и нерастворимой клеточных фракций солюбилизировали в 30 мкл буфера Лэммли и разделяли в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану и обратимого окрашивания перенесенных белков красителем Понсо С наблюдали полосу, соответствующую расчетной массе белка. Для блокировки неспецифического связывания инкубировали мембрану с перенесенными на нее белками в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина, приготовленного на буфере PBS. Затем мембрану с белками инкубировали с пулом сывороток крови 7 пациентов, инфицированных ВГС генотипа 1b (общее разведение пулированной сыворотки в буфере PBST составило 1:300), и далее с вторичными антивидовыми антителами к IgG человека, конъюгированными с пероксидазой хрена (в PBST-буфере, разведение антител 1:10000). Окрашивание с диаминобензидином — ДАБ (до 0,1 мг/мл) проводили в буфере PBS в присутствии 0,01% пероксида водорода. Наблюдали полосу, соответствующую расчетной массе белка.

Результаты

Принцип нового метода получения серийных делеций состоит в возможности устранения ограничения метода ПЦР со случайной затравкой, состоящего в способности случайной затравки образовывать в растворе дуплексы, самопроизвольно размножающиеся при проведении ПЦР в отсутствие специфической ДНК-матрицы.

В первой стадии процедуры получают банк фрагментов исходного гена в форме смеси продуктов ПЦР, последовательно выполняя следующие операции:

— в случайные сайты целевого гена в форме линейного фрагмента ДНК вносят однонитевые разрывы с помощью ограниченного гидролиза панкреатической дезоксирибонуклеазой 1 (ДНКазой 1);

— расширяют бреши в сторону 5’-конца с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* в отсутствие дезоксирибонуклеотидтрифосфатов;

— выполняют отжиг синтетических олигонуклеотидов, имеющих на 3’-конце 6-, 11- или 17-членную случайную последовательность, а на 5’-конце — константный участок (20 нуклеотидов), предназначенный для отжига адаптерного праймера (случайные праймеры); ковалентно присоединяют случайные праймеры, соединившиеся с ДНК-матрицей за счет комплементарных взаимодействий, путем лигирования ДНК-лигазой фага T4;

— удаляют избыток не связанного с матричной ДНК случайного праймера путем батч-хроматографии на микропористом стеклянном сорбенте;

— проводят реакцию ПЦР с адаптерным праймером («однопраймерная» ПЦР).

Для оптимизации концентрации реагентов, нуждающихся в точных стехиометрических соотношениях с целью подбора желательной средней длины фрагментов делеционных производных, готовят серийные разведения панкреатической ДНКазы 1 и случайного праймера, объединяя продукты реакции, полученные в разных условиях. Для отбора делеционных производных, пригодных для экспрессии *in vivo*, полученные *in vitro* фрагменты (очищенные продукты ПЦР) подвергаются клонированию в вектор прямой селекции pQL30, содержащий ген β-галактозидазы *E. coli* со встроенным полилинкером с мутацией смещения трансляционной рамки считывания. Встройка делеционных производных целевого гена в полилинкер с определенной вероятностью приводит к восстановлению рамки, что позволяет визуально контролировать экспрессию белка в полученных клонах. Существенной особенностью предлагаемого метода является возможность отбора только тех фрагментов исходного гена, которые не только в силу восстановления непрерывности открытой рамки считывания, но и в силу своей последовательности, вторичной и третичной структуры кодируемого продукта обладают

DOI http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2017-62-1-17-25

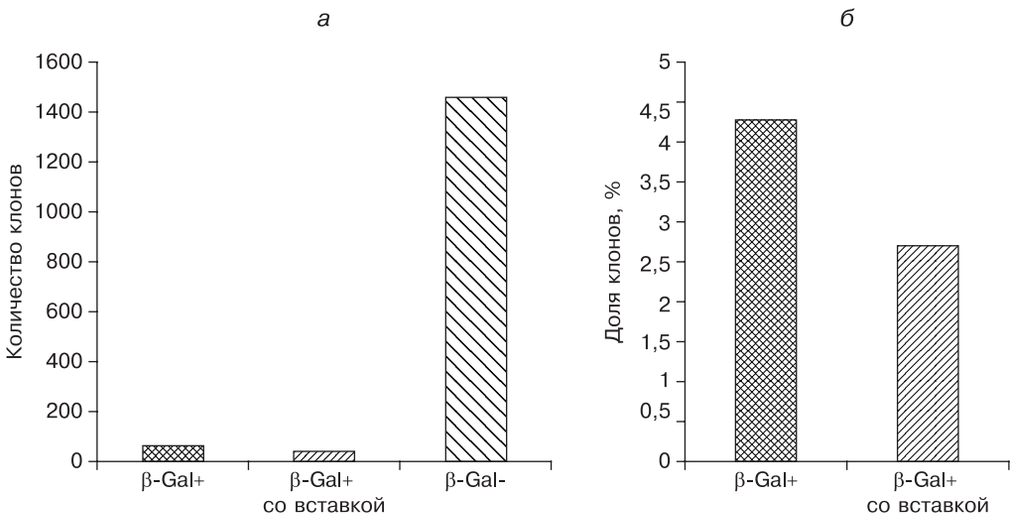

Рис. 1. Характеристика банка клонов, полученных на базе вектора pQL30.

а — распределение количества колоний в зависимости от уровня экспрессии гена LacZ, визуально оцененной в чашечном тесте на индикаторной среде с X-gal: β-Gal — колонии белого цвета, β-Gal+ — колонии синего цвета, β-Gal+ со вставкой — число колоний, несущих вставку целевого размера (более 100 п. н.) по результатам ПЦР. По оси ординат — количество клонов каждого типа; *б* — процентное отношение численности клонов со вставкой (β-Gal+) и клонов со вставкой целевого размера (β-Gal+ со вставкой) к общему числу клонов библиотеки. По оси ординат — процент клонов со вставкой в библиотеке.

способностью к высокоэффективной экспрессии в бактериальных клетках.

В качестве объекта для отработки метода получения и скрининга банков делеционных производных использован ген неструктурного белка NS5A ВГС серотипа 1b. В отличие от оболочечных антигенов хантавирусов этот белок способен к продукции в клетках *E. coli*, однако накапливается в виде тел включения. Характерной особенностью большинства крупных неструктурных белков вирусов является многодоменность. NS5A является значимой мишенью естественного гуморального ответа на инфекцию ВГС у человека, однако не используется в качестве антигена в традиционных серологических тест-системах в связи с недостаточной охарактеризованностью эпитопов на фоне существенной штаммовой вариабельности его последовательности.

ДНК целевого гена NS5A в форме линейного фрагмента получали с помощью ПЦР с праймерами 1b_6117_S_L (TCCCCCACGCACTATGTGCC) и 1b_7780_AS_L (CGGTARTGGTCGTCCAGGAC) с использованием в

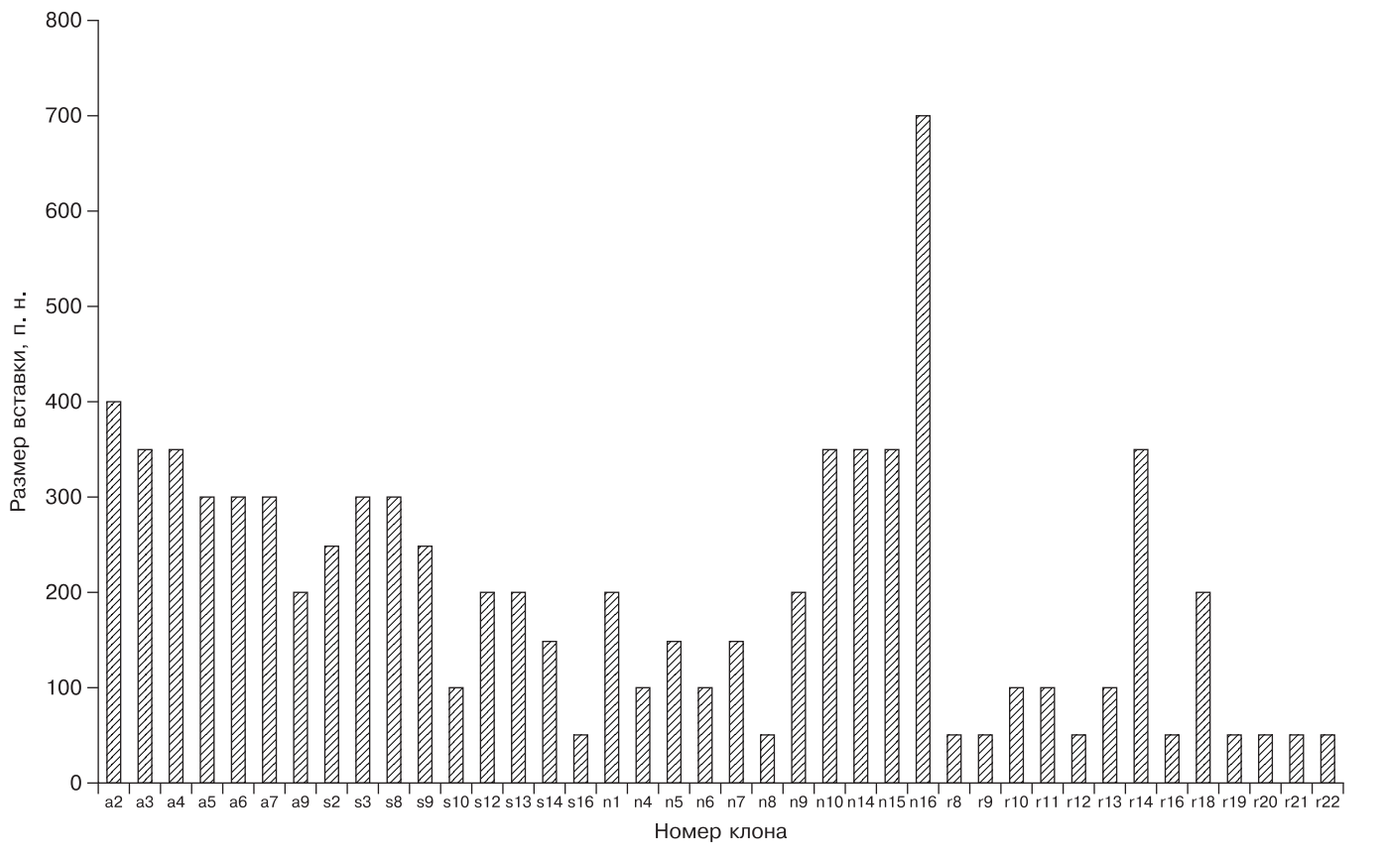

Рис. 2. Распределение величины вставки целевого гена внутри полученной библиотеки клонов по результатам ПЦР со стандартными праймерами *pQE-for* и *pUC-for*. По оси ординат — величина вставки (п. н.); по оси абсцисс — номера клонов библиотеки.

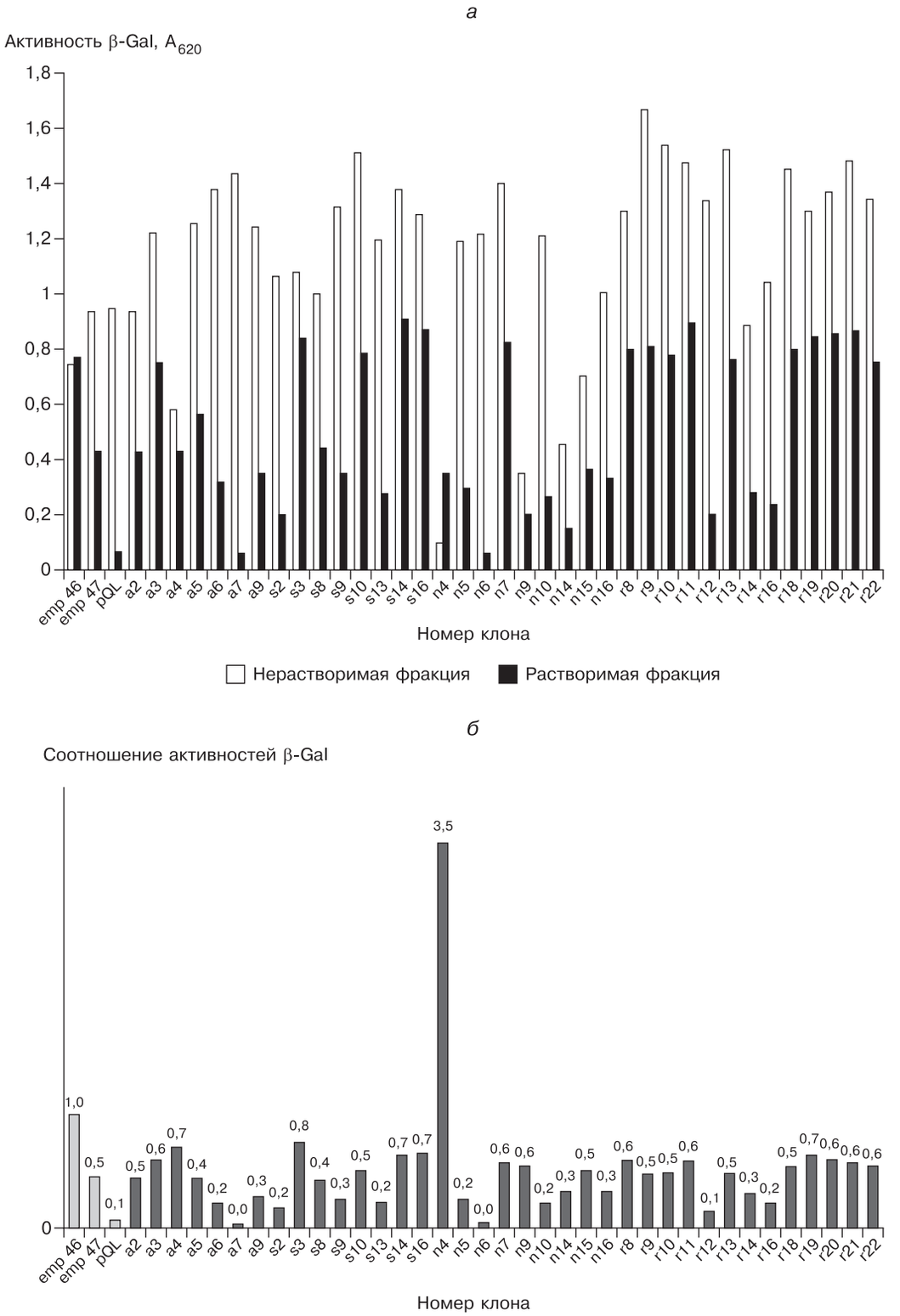

Рис. 3. Распределение активности β-галактозидазы в растворимой и нерастворимой клеточных фракциях биомассы отобранных клонов.

а — активность β-галактозидазы в растворимой (темные столбцы) и нерастворимой (светлые столбцы) клеточных фракциях. По оси ординат — оптическая плотность при 620 нм (A_{620}); по оси абсцисс — номера клонов банка; *б* — соотношение суммарной активности β-галактозидазы в растворимой фракции по отношению к нерастворимой.

качестве матрицы смеси кДНК, полученной из РНК крови пациентов с ВГС серотипа 1b следующих групп: пациентов ($n = 9$), которые благодаря курсу комбинаторной терапии ПЭГ-интерфероном/рибавирином эффективно

DOI http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2017-62-1-17-25

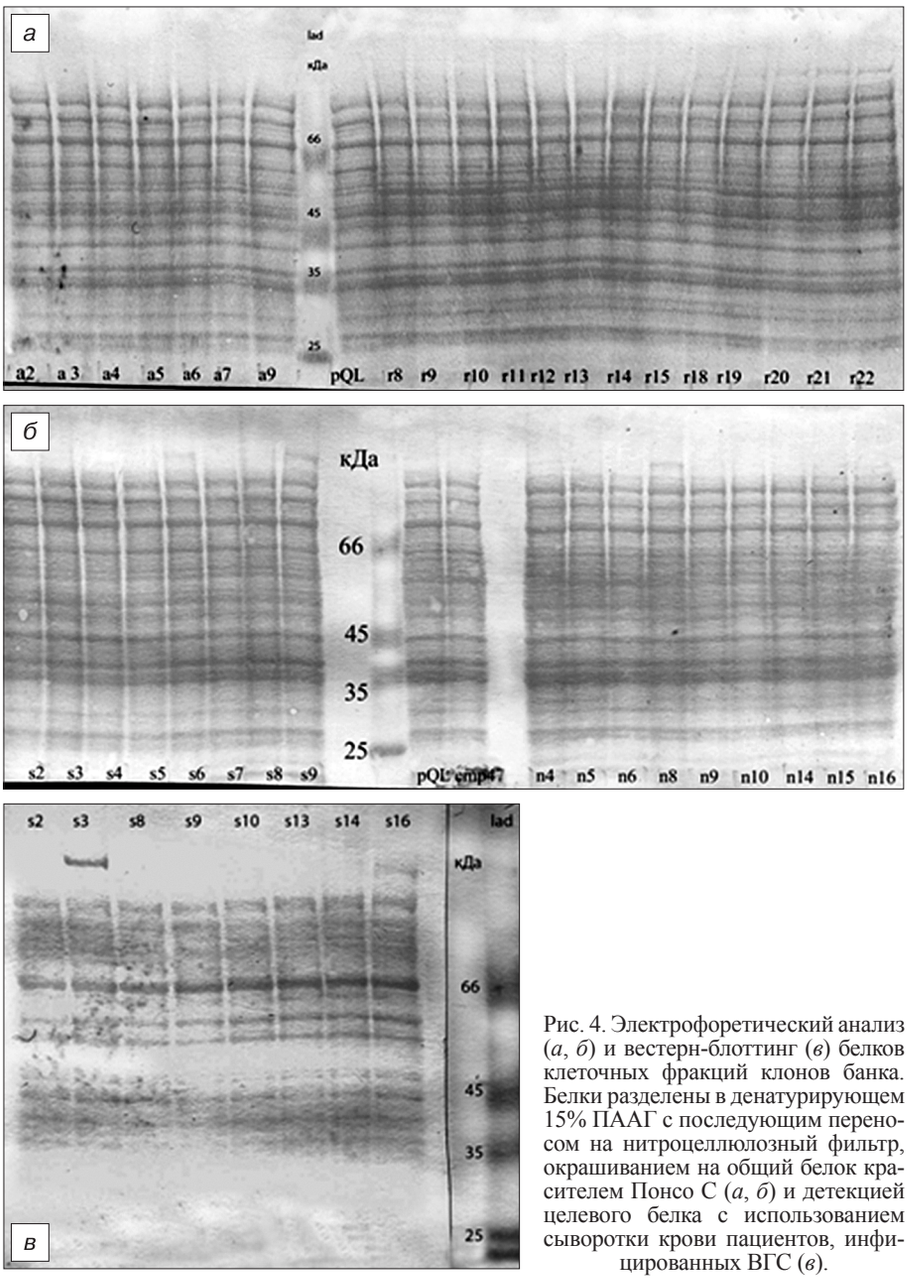

Рис. 4. Электрофоретический анализ (*а*, *б*) и вестерн-блоттинг (*в*) белков клеточных фракций клонов банка. Белки разделены в денатурирующем 15% ПААГ с последующим переносом на нитроцеллюлозный фильтр, окрашиванием на общий белок красителем Понсо С (*а*, *б*) и детекцией целевого белка с использованием сыворотки крови пациентов, инфицированных ВГС (*в*).

достигли статуса устойчивого вирусологического ответа (SVR); пациентов (n = 9), полностью устойчивых к комбинаторной терапии ПЭГ-интерфероном/рибавирином; пациентов (n = 9) с рецидивированием инфекции ВГС после комбинаторной терапии ПЭГ-интерфероном/рибавирином.

Продукт ПЦР очищали с помощью набора Silica bead DNA gel extraction kit («MBI Fermentas»), не используя препаративный электрфорез. Полученную смесь делили на 4 аликвоты и за счет серийного разбавления с шагом 10 раз подбирали концентрацию ДНКазы.

Подготовленную серию разведений инкубировали 20 мин при 37 °С, после чего реакцию останавливали, внося в каждую пробирку по 20 мкл смеси водонасыщенного нейтрального фенола с хлороформом (1:1). Степень деградации ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле. Для дальнейшей работы объединяли и использовали смесь образцов с заметной степенью деградации, но содержащих детектируемые количества ДНК. Для этого объединенную ДНК подвергали фенольной экстракции, осаждали изопропанолом в стандартных условиях и растворяли в минимальном объеме деионизированной воды.

ПЦР-продукт, полученный, как описано выше, очищали с помощью бесколоночной батч-хроматографии на стеклянном сорбенте. Очищенный продукт подвергали воздействию эндонуклеазы рестрикции BamHI при 37°С в течение 2 ч и использовали для получения плазмидного банка на базе вектора pQL30. Банк скринировали визуально на индикаторной среде с X-gal (рис. 1, *а*). Для дальнейшей работы отбирали клоны, проявляющие активность β-галактозидазы (синяя окраска колоний на среде с X-gal). Результаты определения активности β-галактозидазы в колониях трансформантов учитывали примерно через 40 ч с момента окончания трансформации; температура культивирования 37°С.

Все отобранные клоны анализировали:

— на размер вставки (рис. 2);

— на наличие β-галактозидазной активности в растворимой и нерастворимой клеточных фракциях (рис. 3);

— на содержание специфической активности целевого белка в клетках продуцента (методом вестерн-блоттинга) (рис. 4).

Соотношение синих (с экспрессирующейся вставкой) и белых (без вставки или с неэкспрессирующейся вставкой) колоний в ходе описанного эксперимента составило 63:1460 (см. рис. 1, *а*).

Из колоний с восстановленной активностью β-галактозидазы была выделена плазмидная ДНК. Наличие соответствующей вставки в клонах по сравнению с нерекомбинантным вектором pQL30 определяли с помощью ПЦР со стандартными праймерами *pQE-for* и *pUC(M13)-for*. В качестве отрицательного контроля использовали нерекомбинантный вектор pQL30.

Таким образом, удалось отобрать 40 клонов с размером вставки, визуально превышающим контроль. Размер вставки колебался от 50 до 700 п. н. без существенных различий между группами. Статистические данные, характеризующие клоны банка, представлены на рис. 1, 2.

Все отобранные клоны, представляющие собой производные штамма *E.coli* TG1, несущие отобранные из банка плазмиды, использовали для наработки рекомбинантных белков. Клоны культивировали в течение 14—18 ч при 30°С в жидкой среде (0,5% дрожжевой экстракт, 1% пептон, 0,5% NaCl) с добавлением 100 мкг/мл

ампициллина в пробирках объемом 10 мл с 3 мл среды в каждой. Индукцию промотора в клетках продуцента проводили путем внесения раствора IPTG до конечной концентрации 1 мМ.

В качестве отрицательного контроля, не содержащего целевой вставки, был выбран продуцент полноразмерной β-галактозидазы *E. coli* (β-Gal) и ее слитые бифункциональные производные, содержащие гены лектинов из эндоплазматического ретикулума дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: pLacZ-emp46 и pLacZ-emp47.

Каждую из полученных культур отобранных клонов дезинтегрировали встряхиванием со стеклянными шариками диаметром 0,5 мм, разделяли гомогенат на водорастворимую и водонерстворимую фракции путем центрифугирования и определяли во фракциях активность β-галактозидазы, используя в качестве субстрата 0,02% X-gal и нормируя ее на содержание общего белка в гомогенате (см. рис. 3, *а*). Для каждого препарата вычисляли соотношение активности во фракциях (см. рис. 3, *б*), обращая внимание на клоны, обладающие максимальной активностью в растворимой фракции, поскольку хорошая растворимость продукта является показателем его эффективного фолдинга при синтезе рекомбинантными продуцентами.

Наличие целевого продукта во фракциях определяли также с помощью электрофореза и иммуноблоттинга с антителами сыворотки крови больных, инфицированных ВГС генотипа 1b. Этот метод выявил наличие иммунопозитивного белка массой ~114 кДа в растворимой фракции клона s3 группы SVR (см. рис. 4, *б*), содержание которого в растворимой клеточной фракции составило ~0,3% общего белка. Этот белок показал ярко выраженную реакцию с антителами пациентов, инфицированных ВГС, но не здоровых пациентов. В растворимых фракциях контрольных клонов с нерекомбинантным вектором pQL30 и лизатах других исследованных клонов аналогичного продукта не наблюдалось.

Поскольку также установлена высокая доли активности β-галактозидазы в растворимой клеточной фракции клона s3 (см. рис. 3), данный клон был признан наиболее перспективным для использования в качестве источника укороченного варианта гена NS5A ВГС, имеющего оптимальные биотехнологические характеристики.

Обсуждение

Представленные данные свидетельствуют о том, что предложенный новый метод позволяет добиваться существенного снижения токсичности рекомбинантного продукта для клеток продуцента и улучшения фолдинга целевого продукта в гетерологичной системе. Актуальность этого объясняется высокой склонностью многих практически важных белков прежде всего вирусного происхождения образовывать агрегаты при попытках их продукции в клетках бактерий, а также токсичностью многих таких белков по отношению к клеткам рекомбинантного продуцента. Можно предполагать, что общей причиной такого поведения большинства вирусных белков, а также многих бактериальных антигенов, рецепторов и поверхностных белков клеток эукариот является наличие в их структуре двух доменов и более с выраженной связывающей способностью в отношении клеточных структур: липидных мембран, нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов и др. Такая организация с большой вероятностью приводит к образованию в клетке рекомбинантного продуцента нежелательной сети физических контактов, нарушающих нормальную передачу сигналов в цитоплазме. С точки зрения этой гипотезы расчленение генов природных белков на фрагменты, кодирующие изолированные глобулярные домены, может снизить общую токсичность мультидоменных белков, обеспечить повышение уровня их экспрессии в гетерологичных системах. Однако до настоящего времени не предложен универсальный эвристический подход к расчленению белка на изолированные домены, содержащие на флангах линкерные последовательности аминокислот небольшой протяженности, оптимальные для трансляции, котрансляционного фолдинга и релизинга продуктов из рибосом.

Предлагаемый подход нацелен на решение задачи расчленения целевого гена на фрагменты, оптимальные для экспрессии в бактериальных клетках, методом конструирования и скрининга банка делеционных производных. Этот подход позволяет работать с неохарактеризованными генами с неизвестной пространственной организацией продуктов. Эта задача особенно актуальна для большинства структурных и неструктурных вирусных антигенов, предварительные кристаллографические исследования которых затруднены из-за невозможности получения этих белков в нативной водорастворимой форме.

Характеризуя практическую ценность белка-антигена, получаемого с помощью сконструированного продуцента делеционного производного, необходимо отметить, что белок NS5A исследовался в ряде работ и показал свою ценность с точки зрения создания тест-систем для мониторинга течения инфекции ВГС. В частности, в работе [8] показано, что только 68% пациентов с подтвержденным диагнозом ВГС-инфекции имеют детектируемые титры антител к белку NS5A. В работе [9] наличие антител к белку NS5A в крови больных связывают с положительным прогнозом комбинаторной терапии ПЭГ-интерфероном/рибавирином. В работе [10] сообщается, что белок NS5A использовался в качестве одного из компонентов генно-инженерной вакцины. Однако во всех перечисленных исследованиях при выполнении серологических тестов оперировали пептидными антигенами. Очевидно, серологическая реакционная способность таких антигенов отличается от реакционной способности полноразмерных белков. В совокупности это доказывает, с одной стороны, сохраняющуюся неопределенность роли NS5A в патогенезе при ВГС-инфекции, а с другой — необходимость использования рекомбинантных белков для выяснения роли иммунного ответа против NS5A у пациентов.

Финансирование. Научно-исследовательская работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2017 гг., тема № 240 «Разработка нового метода получения высокоэффективных рекомбинантных продуцентов вирусных антигенов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Benkovic S.J., Putney S.D., Schimmel P.R. *Method for Degrading DNA*. Patent USA № 4521509; 1985.
2. Sugino Y., Morita M., Matuo Y., Uchida K. *Method for Producing DNA Nested Deletions by an in Vitro Reaction Using Transposase*. Patent USA № 6265159; 2001.
3. Whitcomb J.M., Rashtchian A., Hughes S.H. A new PCR based method for the generation of nested deletions. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21(17): 4143—6.
4. Bouzgarrou N., Hassen E., Mahfoudh W., Gabbouj S., Schvoerer E.,

Ben Yahia A. et al. NS5A(ISDR-V3) region genetic variability of Tunisian HCV-1b strains: Correlation with the response to the combined interferon/ribavirin therapy. *J. Med. Virol*. 2009; 81(12): 2021—8.
5. MacDonald A., Harris M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(9): 2485—502.
6. Muñoz de Rueda P., Casado J., Patón R., Quintero D., Palacios A., Gila A. et al. Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin treatment responses. *J. Virol.* 2008; 82(13): 6644—53.
7. Noguchi T., Tamori A., Ogura N., Hori Y., Ikeda S., Nishiguchi S. Investigation of interferon-α response by a single amino acid substitution of nonstructural protein 5A in hepatitis C virus-infected patients. *J. Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(8): 589—99.
8. Sillanpää M., Melén K., Porkka P., Fagerlund R., Nevalainen K., Lappalainen M. et al. Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. *J.Virol.* 2009; 6: 84.
9. Desombere I., Van Vlierberghe H., Weiland O., Hultgren C., Sällberg M., Quiroga J. et al. Serum levels of anti-NS4a and anti-NS5a predict treatment response of patients with chronic hepatitis C. *J. Med Virol.* 2007; 79(6): 701—13.
10. Swadling L., Capone S., Antrobus R.D., Brown A., Richardson R., Newell E.W. et al. A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6(261): 261ra153.

Поступила 18.04.16
Принята в печать 24.05.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.373:547.962.4].03:616.98:578.833.3]-084

Борисевич И.В.[1], Черникова Н.К.[2], Марков В.И.[2], Краснянский В.П.[2], Борисевич С.В.[2], Рождественский Е.В.[2]

ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДЕЙ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА ЭКСТРЕННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА

[1]Центр планирования и координации научно-исследовательских работ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 119002, г. Москва;
[2]ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России, 141306, г. Сергиев Посад

***Цель* работы — оценка безопасности и эффективности специфического гетерологичного иммуноглобулина при однократном внутримышечном введении в целях экстренной профилактики геморрагической лихорадки Эбола. *Материалы и методы*. Иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей однократно внутримышечно вводили в качестве средства экстренной профилактики 28 лицам по эпидемическим показаниям после повреждения кожных покровов при работе с инфицированными материалами или контакта с зараженной кровью. Проведено клинико-лабораторное обследование 24 человек после однократного внутримышечного введения гетерологичного иммуноглобулина Эбола. Пробы сывороток крови людей исследовали на наличие иммуноглобулина Эбола и антител к лошадиному гамма-глобулину через 30 и 60 дней после экстренной серопрофилактики. *Результаты*. После проведения экстренной профилактики специфическим гетерологичным иммуноглобулином ни один человек не заболел лихорадкой Эбола. Клинико-лабораторное обследование не выявило ни одного случая развития аллергической реакции немедленного типа в ответ на введение препарата. Среди лиц с нормальным аллергологическим анамнезом количество местных реакций в ответ на проведение экстренной профилактики составило 31%, общих реакций в виде легкой сывороточной болезни — 13%. У лиц с неблагоприятным анамнезом при введении препарата на фоне десенсибилизирующей терапии реакций практически не было; при ее отсутствии местные реакции имели место у 50%, сывороточная болезнь легкой степени — у 17%, средней степени — у 33% указанных лиц. В целом при соблюдении правильной тактики применения иммуноглобулина количество местных и распространенных аллергических реакций замедленного типа составило 28 и 6%, развитие сывороточной болезни легкой степени зарегистрировано у 11% пациентов. Ожидаемый период невосприимчивости реципиента к вирусу лихорадки Эбола при экстренной профилактике специфическим гетерологичным иммуноглобулином составляет не более 30 сут. *Заключение*. Применение иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей в качестве средства экстренной профилактики эффективно и при соблюдении принципа десенсибилизации по показаниям относительно безопасно.**

Ключевые слова: *иммуноглобулин из сыворотки крови лошадей; эффективность; безопасность; экстренная профилактика; анафилактогенность.*

Для цитирования: Борисевич И.В., Черникова Н.К., Марков В.И., Краснянский В.П., Борисевич С.В., Рождественский Е.В. Опыт клинического применения специфического иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей в качестве средства экстренной профилактики лихорадки Эбола. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(1): 25-29.

DOI: http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2017-62-1-25-29

Borisevich I.V.[1], Chernikova N.K.[2], Markov V.I.[2], Krasnianskiy V.P.[2], Borisevich S.V.[2], Rozhdestvenskiy E.V.[2]

AN EXPERIENCE IN THE CLINICAL USE OF SPECIFIC IMMUNOGLOBULIN FROM HORSE BLOOD SERUM FOR PROPHYLAXIS OF EBOLA HAEMORRHAGIC FEVER

[1] Centre for Research Planning and Coordination, Scientific Centre for Expertise of Medical Application Products, Moscow, 119002, Russian Federation;
[2]Central Research Institute № 48, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation

Для корреспонденции: Черникова Наталья Константиновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФГБУ «48 Центрального научно-исследовательского института» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, г. Сергиев Посад. E-mail: 48cnii@mil.ru