

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА, СОДЕРЖАЩЕГО ПОВТОРЫ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Е.Г. Фомина, Т.В. Школина, А.А. Рожкова, Е.А. Нарейко, Ю.В. Новацкая, Е.П. Счесленок, А.С. Владыко

НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Беларусь, vladuko@briem.ac.by

Основной лабораторной диагностики гепатита С служит выявление антител к вирусу. Диагностические препараты для выявления анти-ВГС антител сконструированы на основе белков, информация о которых кодируется различными зонами структурных и неструктурных генов РНК. Диагностика гепатита С осложняется отсутствием эффективных методов культивирования этого вируса. Для решения этой проблемы используют рекомбинантные или синтетические полипептиды, имитирующие свойства нативных белков ВГС. Современные молекулярно-биологические методы позволяют конструировать искусственные рекомбинантные молекулы (*мозаичные антигены*), объединяющие как одинаковые так и различные антигенные детерминанты. Они могут быть локализованы в одном и/или разных белках инфекционного агента и даже принадлежать к разным штаммам. Компьютерный анализ позволяет оценивать пространственную структуру нативных вирусных белков и точно воспроизводить ее при дизайне искусственных молекул антигенов.

Существующая в лаборатории технология позволяет клонировать и экспрессировать отдельные антигенные детерминанты вирусных белков [1,2]. Такая система, по нашему мнению, увеличивает количество специфических комплексов антиген-антитело в иммуноферментной реакции, что позволяет повысить ее чувствительность, а также снизить неспецифическое образование таких комплексов за счет элиминации последовательностей, не имеющих антигенной значимости. В данной работе представлены эксперименты по клонированию антигензначимых участков нуклеокапсидного белка вируса гепатита С. Нуклеокапсидный белок является основной частью большинства диагностикумов, так как обладает сравнительно более выраженной антигенной и иммуногенной активностью. В его составе выделяют, по крайней мере, до семи потенциальных антигензначимых участков. В лаборатории смоделирована система, в которой антигенная детерминанта нуклеокапсидного белка вируса гепатита С может повторяться несколько раз в составе одного рекомбинантного пептида.

С помощью компьютерной программы был проанализирован профиль гидрофобности аминокислот белка Core. Как оказалось, белок Core содержит три протяженных гидрофильных участка, содержащих аминокислотные остатки, которые экспонированы на поверхности молекулы и вероятно являются участками связывания антител. Нами была просканирована существующая в настоящее время база данных вирусов животных и растений, для выявления общих участков профилей гидрофобности. Как показали данные поиска, только первый сайт является видоспецифичным и может служить маркером вируса. Для того чтобы смоделировать систему, состоящую из ряда повторяющихся антигенных детерминант этого белка, была синтезирована полинуклеотидная последовательность из 68 п.н., которая кодирует аминокислотную последовательность первого антигензначимого участка. Данная последовательность служила прямым праймером в реакции полимеризации. В качестве обратного праймера выступала нуклеотидная последовательность, состоящая из 15 нуклеотидов. Оба праймера содержали сайты для ферментов рестрикции HindIII и EcoRI. Следующая пара праймеров была идентична первой, но содержала другие сайты

рестрикции: EcoRI и XhoI для клонирования в полилинкер экспрессирующего вектора. Эти праймеры были полимеризованы в реакции с фрагментом Кленова, для получения двухцепочечной матрицы и лигированы последовательно в вектор pJC40 [3]. Получена рекомбинантная плазмида, содержащая tandemно повторяющуюся последовательность, кодирующую антигенный сайт нуклеокапсидного белка вируса гепатита С. Корректность встраивания повторов оценивалась методом рестрикционного анализа [4].

Данная плазмида была трансформирована в бактериальные клетки BL21 для получения рекомбинантного белка. Индукцию экспрессии проводили добавлением в среду культивирования изопропилтиогалактозида (IPTG), когда культура достигала оптической плотности OD₆₀₀-0,3. Экспрессию рекомбинантного полипептида проверяли с помощью гель электрофореза в градиентном полиакриламидном геле. Полученные результаты представлены на рисунке.

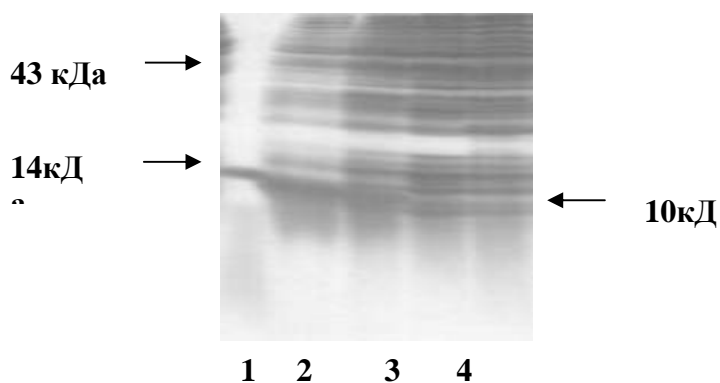


Рисунок: Электрофоретический анализ рекомбинантного полипептида вируса гепатита С. 1-маркер молекулярных масс, 2-культура клеток после индукции IPTG, 3-культура без индукции, 4-5-культура клеток, не содержащая рекомбинантной плазмиды индуцированная IPTG и без индукции (соответственно).

Результаты белкового гель электрофореза показали, что в области 10кДа индуцированной культуры, в отличие от контрольного лизата клеток, наблюдается экспрессия рекомбинантного полипептида на фоне подавления синтеза клеточных белков.

ЛИТЕРАТУРА.

1 Е.Г Фомина, Е.П. Счесленок, А.А. Рожкова, Д.И. Шапошников, А.С. Владыко. Получение рекомбинантной плазмиды, содержащей повторы антигенных детерминант нуклеокапсидного белка вируса ГЛПС// тезисы докладов. Материалы международной научно-практической конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». Минск 24-26 ноября. С.196.

2 Владыко А.С. Фомин И.К. Счесленок Е.П. Получение и характеристика низкомолекулярных пептидов, представляющих антигенные домены белка NP белка вируса ЛХМ// Вопр. вирусол. - №6-2000-С.13-15.

3 Joachim Clos and Sven Brandau//pJC20 and pJC40– Two High-Copy-Number Vectors for T7 RNA Polymerase-Dependent Expsression of Recombinant Genes in *Escherichia coli*//Protein exspression and purification.–1994–№5.–P.133–137.

4 Маниатис Т. и др. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М: Мир, 1984 -480с.