

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АНТИГЕННЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА ХАНТАВИРУСА ПУУМАЛА

Е.П. Счесленок, Е.Г. Фомина, Т.В. Школина, Д.И. Шапошников,
А.С. Левкович, А.С. Владыко

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

В настоящее время известно, что хантавирусы, которые относятся к семейству *Bunyaviridae*, вызывают два серьезных заболевания человека: хантавирусный легочный синдром (ХЛС) с летальностью до 40%, впервые диагностированный в 1993 году на юго-западе США, и геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС), распространенную повсеместно. Описано четыре основных ГЛПС-ассоциированных хантавируса: вирусы Хантаан и Добрава, вызывающие тяжелую форму ГЛПС с летальностью 5-35%, и вирусы Сеул и Пуумала, вызывающие заболевание средней тяжести. Вирус Пуумала – являющийся этиологическим агентом эпидемической нефропатии (1), циркулирует в Скандинавских странах, Западной России, Балканском регионе, а также некоторых странах Центральной Европы, включая Беларусь.

Лабораторная диагностика остается одним из важных инструментов, направленных на решение задач по противоэпидемической защите и своевременному лечению инфекционных заболеваний. Метод иммуноферментного анализа, достаточно специфичный и чувствительный, широко используется в медицинской практике для осуществления эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями.

Целью настоящей работы явилось получение рекомбинантных полипептидов, представляющих антигенно-активные участки нуклеокапсидного белка вируса Пуумала, для последующей разработки высокочувствительной иммуноферментной тест – системы.

Нуклеокапсидный белок (N) обычно используется в качестве антигена в большинстве серологических исследований, так как обладает выраженными антигенной и иммуногенной активностями. С целью локализации антигенно-активных участков N белка вируса Пуумала был проведен компьютерно-математический анализ с использованием авторской программы WxGeneBee. По профилю гидрофильности аминокислотных остатков (а.о.) были идентифицированы 7 потенциальных антигенных участков (В-эпитопов). Для выявленных антигенных сайтов был осуществлен поиск гомологичных структур с использованием базы данных нуклеотидных последовательностей GeneBank. В результате были выбраны 2 потенциальных эпитопных участка, которые являются уникальными для N белка вируса Пуумала. Они представляют собой пептиды длиной 12 и 11 а.о., расположенные в областях 71-82 и 86-96, считая с N-конца нуклеокапсидного белка.

По данным литературы известно, что аминотерминальный участок N белка вируса Пуумала длиной около ста а.о. обладает высокой степенью иммуногенности (2). В связи с этим первоначально нами в экспрессирующий вектор рJC40 (3) была клонирована нуклеотидная последовательность, кодирующая с N-конца 117 аминокислот антигенно-активного участка N белка. Лизогенный бактериальный штамм (BL21) клеток *E.coli* трансформировали рекомбинантной плазмидой и после селективного отбора колоний рекомбинантные клоны бактерий накапливали в присутствии изопропилтиогалактозида (ИПТГ) для индукции синтеза рекомбинантного полипептида. Методом электрофореза в ПААГ было показано наличие экспрессии рекомбинантного полипептида с молекулярной массой 17 кДа. Специфичность данного полипептида была

подтверждена методом иммунного блоттинга. С использованием аффинной металлохелатной хроматографии на Ni - NTA колонке был получен рекомбинантный полипептид, максимально очищенный от белков бактериальных клеток.

На основании выдвинутого нами предположения о том, что многократное повторение антигенной детерминанты в составе одного рекомбинантного полипептида позволит повысить чувствительность иммуноферментной реакции за счет увеличения специфических комплексов антиген-антитело, а элиминация последовательностей, не имеющих антигенной значимости, позволит снизить образование аналогичных неспецифических комплексов, была получена следующая конструкция: рекомбинантная плазмида, содержащая нуклеотидную последовательность двух tandemно повторяющихся уникальных антигенных детерминант N белка вируса Пуумала. Последовательность, кодирующая пептиды длиной 12 и 11 а.о., расположенные в областях 71-82 и 86-96 гена белка N, была искусственно синтезирована и последовательно клонирована в полилинкерную область экспрессирующего вектора pJC40. Для получения рекомбинантного полипептида данная плазмида была трансформирована в бактериальный штамм (BL21) клеток *E.coli*. Индукцию экспрессии проводили добавлением в среду культивирования ИПТГ и для выявления экспрессии рекомбинантного полипептида бактериальные лизаты анализировали с помощью метода электрофореза в градиентном полиакриламидном геле. Показана экспрессия рекомбинантного полипептида с молекулярной массой приблизительно 10 кДа. На рисунке 1 представлен электрофоретический анализ фракций металлохелатной хроматографии, используемой для очистки экспрессируемого полипептида. Результаты электрофореза показали наличие только одной мажорной полосы полипептида в области 10 кДа (дор.7) что свидетельствует о высокой степени очистки рекомбинантного полипептида.

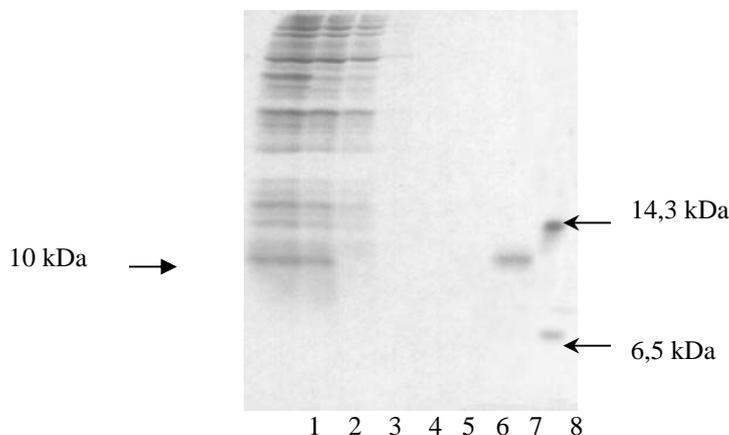


Рис. 1 Электрофоретический анализ очищенного рекомбинантного полипептида

В результате проведенных исследований получены очищенные рекомбинантные полипептиды, содержащие антигенные детерминанты нуклеокапсидного белка вируса Пуумала. В дальнейшем будет проведен сравнительный анализ данных полипептидов в иммуноферментной реакции с использованием референс-сывороток к вирусу ГЛПС.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Feldmann H. Hantaviruses//Encyclopedia of life sciences. – 2001. Nature Publishing Group.
2. Kallio-Kokko H.. Recombinant hantavirus proteins: antigenic properties and diagnostic applications. Academic Dissertation. Haartman Institute. Helsinki, 2000.
3. Clos J., Brandau S. pJC40 and pJC20 – two high-copy-number vectors for T7 RNA-polymerase-dependent expression of recombinant genes in *E. coli*//Protein expression and purification. – 1994. – 5. – 133-137.