

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЛАВНЫХ АНТИГЕННЫХ ДОМЕНОВ ГЛИКОПРОТЕИНА E2 ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КЛЕТКАХ *E. COLI*

О.В. Пластинина

Белорусский государственный университет, г. Минск;

oksana02plastinina@gmail.com;

науч. рук. – Н.В. Сауткина

Среди разнообразных патогенов крупного рогатого скота вирусная диарея (BVDV) занимает значительное место из-за вызываемых ею экономических убытков. Гликопротеин E2 липидной оболочки, а именно его первые два антигенных домена А и В могут выступать в качестве субъединицы для создания рекомбинантной вакцины. Целью работы являлось клонирование гена, кодирующего антигенные домены А и В гликопротеина E2 BVDV 2-ого типа, в составе вектора серии рЕТ для его экспрессии в клетках *E. coli*. В результате работы в клетках штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3) в составе вектора рЕТ-24b(+) клонированы оптимизированные для экспрессии гены DADB и DADBNhis, кодирующие домены А и В гликопротеина E2 вируса BVDV 2-го типа (ген DADB), в том числе с гистидиновой меткой (ген DADBNhis). Результаты клонирования подтверждены ПЦР-анализом, рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру. Установлено, что индукция экспрессии генов DADB и DADBNhis приводит к накоплению в клетках *E. coli* нерастворимой клеточной фракции белков по массе соответствующих белкам DADB и DADBNhis (18,6 кДа и 19,4 кДа соответственно) в количестве около 30 % от общего внутриклеточного белка.

Ключевые слова: BVDV, гликопротеин E2, домены А и В, рекомбинантные белки.

Вирусная диарея крупного рогатого скота является серьезным патогеном крупного рогатого скота, приводящим к значительным экономическим потерям в ряде стран. Заболевание вызывает группа вирусов BVDV (Bovine Viral Diarrhoea Virus), принадлежащая к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Контроль распространения вируса обеспечивается удалением из стада персистентно инфицированных животных, формированием уровня биобезопасности хозяйств и вакцинацией животных. В настоящее время из-за недостаточной эффективности существующих вакцин возникает необходимость создания новых препаратов.

Вирион данного вируса представляет собой нуклеокапсид, в котором заключен одноцепочечный РНК-геном. Основным гликопротеином липидной оболочки является белок E2, который также представляет собой основную мишень для нейтрализующих антител. В настоящее время гликопротеин E2 рассматривается в качестве основы для создания субъединичной вакцины. Но, из-за высокого содержания цистеиновых остатков, образующих внутримолекулярные и одну межмолекулярную дисульфидные связи, белок в клетках *E. coli* экспрессируется преимущественно в не-

растворимом виде [1]. Согласно кристаллической структуре гликопротеина E2 [2] за связывание вируса с мембраной клетки и проникновение в неё отвечают первые два антигенных домена А и В, поэтому в качестве основы для создания вакцины можно рассматривать не полноразмерный, а усеченный белок, имеющий в своем составе домены А и В. Целью работы являлось клонирование и экспрессия в клетках *E. coli* главных антигенных доменов А и В гликопротеина E2 BVDV 2-ого типа.

Нуклеотидная последовательность рекомбинантного белка E2, в состав которого входят домены А и В, оптимизировали для экспрессии в клетках *E. coli* путем замены редко встречающихся кодонов следующих аминокислот: лейцина (в 2 позициях), изолейцина (в 6 позициях), аргинина (в 7 позициях) и пролина (в 1 позиции). Кроме того, произвели замену и других кодонов на оптимальные при сохранении аминокислотной последовательности белка. В результате оптимизации индекс CAI (codon-adaptation index) повысился с 0,53 до 0,8. Также для клонирования в составе вектора pET-24b(+) в ген ввели сайты рестриктаз NdeI (со стартовым триплетом АТГ), XhoI и EcoRI, стоп-кодона перед сайтом EcoRI и дополнительные нуклеотиды на 5'- и 3'-концы. В результате оптимизации был получен ген, обозначенный как *DADB*, длиной 545 п.н., который заказали в виде готового двухцепочечного фрагмента ДНК у компании Integrated DNA Technologies Inc. (IDT).

Данный фрагмент клонировали в составе вектора pET-24b(+) в двух вариантах. Ген *DADB* – по сайтам рестрикции NdeI и EcoRI (для очистки белка ионно-обменной хроматографией), ген *DADBHis* – по сайтам рестрикции NdeI и XhoI (для очистки белка металл-хелатной хроматографией). Полученными плазмидами, названными соответственно pDADB и pDADBHis, трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-Blue. Полученные трансформанты проверяли на наличие вставки в плазмиду двумя способами: ПЦР-анализом и рестрикционным анализом. Также правильность нуклеотидных последовательностей проверяли секвенированием по Сэнгеру [3].

На следующем этапе работы клетки штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3) трансформировали плазмидами pDADB10 и pDADBHis5. Индукцию экспрессии генов проводили в течение 4 часов при 37 °С с добавлением ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) в конечной концентрации 0,5 ммоль/л. В результате проведения SDS/PAGE электрофореза суммарных клеточных белков *E. coli* зафиксировали наличие в клетках всех индуцированных трансформантов продуктов по массе соответствующих целевым белкам *DADB* (18,6 кДа) (дорожка 1 на рис. 1) и *DADBHis* (19,4 кДа) (дорожка 4 на рис. 1). Полученные штаммы обозначили соответственно *E. coli* BG pDADB10 и *E. coli* BG pDADBHis5.

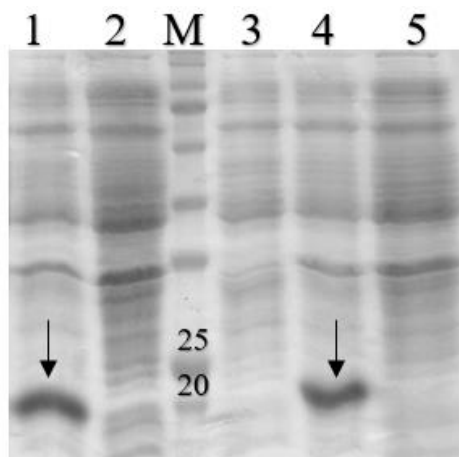


Рис. 1. Электрофоретический анализ белков клеточных лизатов рекомбинантных штаммов *E. coli* BG pDADB10 и *E. coli* BG pDADBHis5.

1 – трансформант *E. coli* BG pDADB10 (индукция), 2 – трансформант *E. coli* BG pDADB10 (без индукции, отрицательный контроль), 3 – *E. coli* BL21 (DE3) pET-24b(+) (индукция, отрицательный контроль), 4 – трансформант *E. coli* BG pDADBHis5 (индукция), 5 – трансформант *E. coli* BG pDADBHis5 (без индукции, отрицательный контроль), М – маркер молекулярного веса Proteinmarker VI (10-245) Prestained (PanReacApplichem). Стрелками указаны экспрессирующиеся белки, цифры на маркере молекулярного веса обозначают массу в кДа

Согласно денситометрическому анализу окрашенных красителем Ку-масси R-250 полиакриламидных гелей при помощи программы ImageJ (SoftonicDeveloperHub.) в клетках продуцентов *E. coli* BGpDADB10 и *E. coli* BGpDADBHis5 белки DADB и DADBHis накапливаются в количестве около 30 % от общего клеточного бактериального белка.

Далее определяли, в растворимой или нерастворимой клеточной фракции синтезируются целевые белки. При условии наличия в молекулах белков 8 остатков цистеина, участвующих в образовании дисульфидных связей, предполагали, что при оптимальной температуре культивирования продуцентов 37 °С белки DADB и DADBHis будут синтезироваться в нерастворимой форме с образованием белковых агрегатов, так называемых «телец включения». Однако понижение температуры культивирования бактерий может привести в отдельных случаях к синтезу растворимых белков вследствие правильного фолдинга. Поэтому индукцию экспрессии генов *DADB* и *DADBHis* культивирование штаммов *E. coli* BG pDADB10 и *E. coli* BG pDADBHis5 проводили при разных температурах: 20 °С и 37 °С. Затем клетки бактерий осаждали центрифугированием и разрушали с использованием реагента B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (ThermoFisherScientificInc.) согласно инструкции производителя. Результаты SDS/PAGE электрофореза белков клеточного лизата штамма *E. coli* BG pDADB10 изображены на рисунке 2.

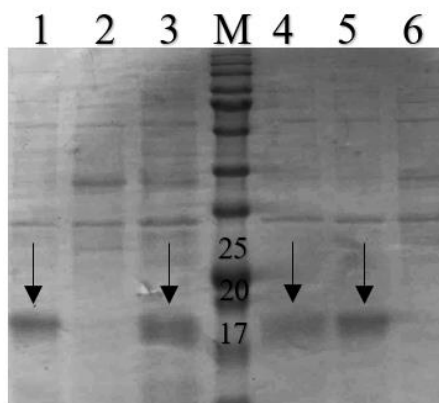


Рис. 2. Электрофоретический анализ белков клеточных лизатов рекомбинантного штамма *E. coli* BG pDADB10.

1 – осадок клеточного лизата (37 °C), 2 – надосадок клеточного лизата (37 °C), 3 – трансформант *E. coli* BG pDADB10 (индукция при 37 °C), 4 – трансформант *E. coli* BG pDADB10 (индукция при 20 °C), 5 – осадок клеточного лизата (20 °C), 6 – надосадок клеточного лизата (20 °C), М – маркер молекулярного веса Proteinmarker VI (10-245) Prestained (PanReacApplichem). Стрелками указаны экспрессирующиеся белки, цифры на маркере молекулярного веса обозначают массу в кДа

В результате установили, что при температурах культивирования продуцентов 20 °C и 37 °C белок DADB накапливается преимущественно в нерастворимой клеточной фракции (дорожки 1 и 5 на рис. 2). Белок DADBN при 20 °C и 37 °C синтезируется в бактериальных клетках также в нерастворимой форме (данные не представлены).

Таким образом, в результате работы были получены штаммы-продуценты рекомбинантных белков DADB и DADBN, несущих в своём составе домены А и В гликопротеина E2 оболочки вируса BVDV 2-го типа.

Библиографические ссылки

1. Endotoxin-free purification for the isolation of Bovine Viral Diarrhoea Virus E2 protein from insoluble inclusion body aggregates / Cavallaro, A.S. [et al.] // Microbial Cell Factories. 2011. Vol. 10, № 57. P. 1–9.
2. Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus / Y. Li [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013. Vol. 110, № 17. P. 6805–6810.
3. Пластинина, О.В. Разработка конструкций на основе вектора серии pET для экспрессии в штаммах *E. coli* антигенных доменов гликопротеина E2 вируса диареи крупного рогатого скота / О.В. Пластинина, Н.В. Сауткина // Тез.докл. VIII Респ. науч.-практ. конф. молодых учёных «Природа, человек и экология» / г. Брест, БрГУ; под общ.ред. С.Э. Карозы. – Брест, 2021. – 111 с.