

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСТВОРИМОСТИ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* ФЬЮЖН-БЕЛКОВ SUMO-DADB И SUMO-DADBHIS, ВКЛЮЧАЮЩИХ ГЛАВНЫЕ АНТИГЕННЫЕ ДОМЕНЫ ГЛИКОПРОТЕИНА E2 ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 2-ГО ТИПА

О. В. Пластинина

Белорусский государственный университет, г. Минск;

oksana02plastinina@gmail.com;

науч. рук. – Н. В. Сауткина, ст. преп.

Заболевание, вызываемое вирусом диареи крупного рогатого скота (BVDV), приносит значительные экономические убытки во многих странах. Гликопротеин E2 липидной оболочки вируса, а именно его первые два антигенных домена А и В могут выступать в качестве субъединицы для создания рекомбинантной вакцины. Однако экспрессия генов, кодирующих полноразмерный вариант белка E2 и усеченный, содержащий первые два домена, в бактериальных клетках *E. coli* сопровождается образованием нерастворимых телец включения.

Целью данной работы являлась индукция экспрессии гибридных генов SUMO-DADB и SUMO-DADBHIS, состоящих из генов, кодирующих главные антигенные домены А и В гликопротеина E2 BVDV 2-ого типа, объединенных с геном белка малого убиквитин-подобного модификатора дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В результате индукции экспрессии гибридных генов SUMO-DADB, SUMO-DADBHIS в клетках штамма *E. coli* BL21 (DE3) при температурах культивирования 37 °C и 20 °C выявили целевые белки, также синтезирующиеся в нерастворимой форме.

Ключевые слова: BVDV; гликопротеин E2; домены А и В; рекомбинантные белки; фьюжен-белки; SUMO.

Группа вирусов BVDV (Bovine Viral Diarrhoea Virus), принадлежащая к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*, является одной из преобладающих причин заболеваемости крупного рогатого скота, ведущей к значительным экономическим убыткам ряда стран, включающих и Республику Беларусь.

Инактивированные и модифицированные живые вакцины, использующиеся в настоящее время для защиты крупного рогатого скота от инфекции BVDV, имеют недостатки, связанные со сложностью получения достаточных объемов и возможностью развития внутриутробной инфекции и иммуносупрессии. В связи с этим, существует необходимость разработки эффективных и безопасных препаратов нового поколения и, например, использование субъединичных вакцин, безопасных с точки зрения горизонтальной и вертикальной передачи.

Вирион вируса BVDV представляет собой нуклеокапсид, в котором заключен одноцепочечный РНК-геном. Основным гликопротеином

липидной оболочки является белок E2, который можно рассматривать как основу для создания субъединичной вакцины, т.к. именно на гликопротеин E2 направлено действие нейтрализующих антител зараженных животных.

В связи с тем, что за связывание вируса с мембраной клетки и проникновение в неё, согласно литературным источникам [1], отвечают первые два домена А и В гликопротеина E2, в качестве субъединичной вакцины можно рассматривать усеченный вариант белка E2, содержащий только эти домены.

Ранее мы уже клонировали в клетках *E. coli* гены *DADB* и *DADBHis*, кодирующие домены А и В гликопротеина E2, в составе вектора pET-24b(+) (Novagen), а также экспрессировали их в клетках штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3), и в результате установили, что белки, названные соответственно *DADB* и *DADBHis*, экспрессируются в нерастворимой форме [2].

Одним из возможных вариантов получения в клетках бактерий *E. coli* растворимых и правильно свернутых белков является использование технологии слияния генов и получения фьюжн-белков, в которых фьюжн-партнёром может выступать, например, белок малый убиквитин-подобный модификатор (small ubiquitin-related modifier, SUMO) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, стабилизирующий и повышающий растворимость фьюжн-белков [3].

Целью данной работы являлось определение растворимости гибридных белков SUMO-DADB и SUMO-DADBHis, состоящих из главных антигенных доменов А и В гликопротеина E2 BVDV 2-ого типа, объединенных с белком малым убиквитин-подобным модификатором.

Изначально гибридные гены *SUMO-DADB* и *SUMO-DADBHis* клонировали в клетках штамма бактерий *E. coli* XL1-Blue [4].

На следующем этапе работы клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали плазмидами pSUMO-DADB и pSUMO-DADBHis. Индукцию экспрессии генов в клетках клонов проводили в течение 4 ч при 37 °С с добавлением ИПТГ (изопропил- β -D-тиогалактопиранозид) в конечной концентрации 0,5 ммоль/л. В качестве отрицательных контролей использовали культуры каждого клона, к которым не добавляли индуктор. Также в качестве отрицательного контроля использовали индуцированный ИПТГ штамм *E. coli* BL21(DE3), содержащий плазмиду pET-24b(+) без вставки. В результате выявили наличие целевых белков SUMO-DADB и SUMO-DADBHis массой 33,8 кДа и 34,6 кД соответственно (данные не представлены).

Далее определяли в растворимой или нерастворимой клеточной фракции синтезируются целевые белки. Для этого проводили индукцию

экспрессии генов при температурах 37 °С и 20 °С в течение 4 ч с добавлением ИПТГ в конечной концентрации 0,5 ммоль/л. Затем клетки бактерий осаждали центрифугированием и разрушали с использованием реагента B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) согласно инструкции производителя. Рисунки 1 и 2 отображают результаты электрофоретического анализа белков клеточных лизатов штаммов *E. coli* BL21 (DE3) pSUMO-DADBHis и *E. coli* BL21 (DE3) pSUMO-DADB соответственно.

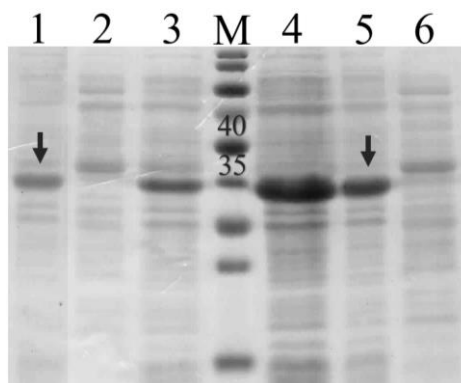


Рис. 1. Электрофоретический анализ белков клеточных лизатов штамма *E. coli* BL21 (DE3) pSUMO-DADBHis

1 – осадок клеточного лизата (37 °С), 2 – надосадок клеточного лизата (37 °С), 3 – трансформант *E. coli* BL21 (DE3) pSUMO-DADBHis (индукция при 37 °С), 4 – трансформант *E. coli* BL21 (DE3) pSUMO-DADBHis (индукция при 20 °С), 5 – осадок клеточного лизата (20 °С), 6 – надосадок клеточного лизата (20 °С), М – маркер молекулярного веса Protein marker VI (10-245) Prestained (PanReac Applichem). Стрелками указаны целевые белки, находящиеся в осадке, цифры на маркере молекулярного веса обозначают массу в кДа

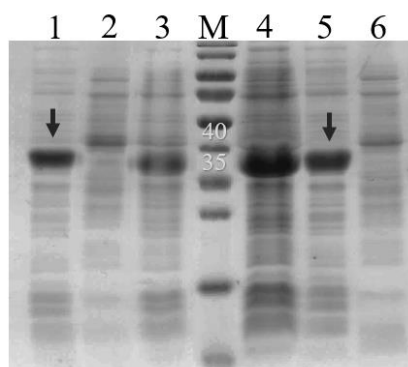


Рис.2. Электрофоретический анализ белков клеточных лизатов штамма *E. coli* BL21 (DE3) pSUMO-DADB.

1 – осадок клеточного лизата (37 °С), 2 – надосадок клеточного лизата (37 °С), 3 – трансформант *E. coli* BL21 (DE3) pSUMO-DADBHis (индукция при 37 °С), 4 – трансформант *E. coli* BL21 (DE3) pSUMO-DADBHis (индукция при 20 °С), 5 – осадок клеточного лизата (20 °С), 6 – надосадок клеточного лизата (20 °С), М – маркер молекулярного веса PageRuler Prestained Protein Ladder (10-180) (Thermo

Fisher Scientific Inc.). Стрелками указаны целевые белки, находящиеся в осадке, цифры на маркере молекулярного веса обозначают массу в кДа

Как видно на рисунках, фьюжн-белки SUMO-DADB и SUMO-DADBHis присутствуют в осадках клеточных лизатов продуцентов как при температуре индукции экспрессии генов 37 °С (дорожки 1 на рисунках 1 и 2), так и при 20 °С (дорожки 5 на рисунках 1 и 2). Таким образом, в результате индукции экспрессии генов SUMO-DADB и SUMO-DADBHis, в клетках штамма *E. coli* BL21 (DE3) при температурах культивирования 37 °С и 20 °С выявили целевые белки, которые синтезируются в нерастворимой форме. Следовательно, слияние с белком малым убиквитин-подобным модификатором дрожжей не привело к повышению растворимости целевых белков.

Библиографические ссылки

1. 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.
2. Пластинина, О.В. Клонирование и экспрессия главных антигенных доменов гликопротеина E2 вируса диареи крупного рогатого скота в клетках *E. coli* / О.В. Пластинина // 78-я научная конференция студентов и аспирантов Белорусского государственного университета. В 3 ч. Ч. 1, Минск, 10-21 мая 2021 г. / Белорус. гос. ун-т; редкол.: В. Г. Сафонов (гл. ред.) [и др.]. Минск: БГУ, 2021. С. 288-291.
3. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins / T. R. Butt [et al.] // Protein Expr. Purif. 2005. Vol. 43, No 1. P. 1-9.
4. Пластинина, О.В. Создание гибридных конструкций для получения главных антигенных доменов гликопротеина E2 вируса диареи крупного рогатого скота 2-го типа в составе фьюжн-белков в штаммах *Escherichia coli* / О.В. Пластинина, Н.В. Сауткина, В.А. Прокулевич // Биотехнология: достижения и перспективы развития: сборник материалов V международной научно-практической конференции, Пинск, 25-26 ноября 2021 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: В.И. Дунай [и др.]. Пинск: ПолесГУ, 2021. С. 99-102.