

ОЧИСТКА МОДИФИЦИРОВАННОГО БЕЛКА E2 ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ

О. В. Пластинина

*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Беларусь, oksana02plastinina@gmail.com
Научный руководитель – Н. В. Сауткина*

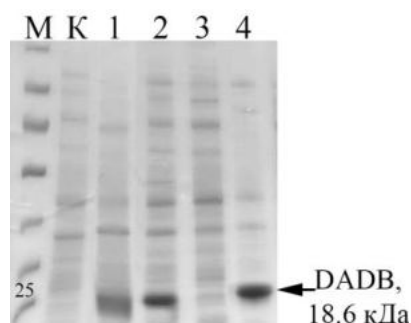
Вирусная диарея крупного рогатого скота является одной из наиболее распространенных инфекций, наносящих наибольший ущерб скотоводческим хозяйствам. Основным иммунногенным белком вируса является гликопротеин E2 оболочки вируса, который может стать основой для создания субъединичной вакцины. В работе представлены результаты солюбилизации модифицированного белка E2 из теляц включения и оптимизация стадии его рефолдинга.

Ключевые слова: вирусная диарея КРС; белок E2; тельца включения; субъединичная вакцина.

Вирусная диарея крупного рогатого скота (Bovine Viral Diarrhoea Virus, BVDV) является одним из основных источников экономических потерь молочно-товарных ферм Беларуси. Заболевание вызывает группа вирусов BVDV, принадлежащих к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Контроль распространения вируса обеспечивается вакцинацией животных и удалением из стада персистентно инфицированных особей. Одним из наиболее безопасных вариантов вакцинации является использование субъединичных вакцин, содержащих антигенные белки вирусов. В случае BVDV действие нейтрализующих антител зараженных животных направлено на иммунногенный гликопротеин E2 внешней оболочки вируса.

В этой работе использовали модифицированный белок E2, ген которого укоротили до последовательности, кодирующей два первых эпитопных N-концевых домена (модифицированный ген обозначили как *dadb*). Такая модификация позволила удалить 9 остатков цистеина из последовательности, сохранив иммунногенную часть белка. Модифицированный белок, обозначенный как DADB, имеет молекулярную массу 18,6 кДа, $pI=6,8$ и 4 дисульфидные связи. Цель данной работы – подобрать условия солюбилизации и рефолдинга белка DADB. Для разработки протокола очистки белка DADB из теляц включения (ТВ) использовали биомассу *E. coli* BL21-Gold(DE3) pDADB в условиях индукции гена 0,5 mM ИПТГ при $OP_{600} = 0,8$ о.е. (длина оптического пути 1 см) [1].

После разрушения клеток при помощи гомогенизатора высокого давления («Panda Plus», Италия), нерастворимую фракцию, содержащую как ТВ, так и примесные соединения (белки, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и мембраны), отмывали в буфере следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН=8), 100 мМ NaCl. Осадок, содержащий ТВ, солюбилизировали в буфере следующего состава: 6 М гуанидин гидрохлорид (Gdn-HCl), 50 мМ Трис-НСl (рН=8), 20 мМ NaCl, в соотношении 10:1 (объем/вес). Дополнительно в буфер вносили 3 % Na₂SO₃, способствующий корректному образованию дисульфидных связей [2]. После чего белок инкубировали при температуре +4 °С в течение 16-18 ч. Электрофоретический анализ фракций белка DADB на разных стадиях очистки изображен на рисунке.



Электрофореграмма фракций белка DADB на разных стадиях очистки белка:
K – *E. coli* BL21-Gold(DE3) pDADB (без индукции) *1* – *E. coli* BL21-Gold(DE3) pDADB (индукция); *2* – клетки *E. coli* BL21-Gold(DE3) pDADB после разрушения; *3* – фракция надосадка; *4* – фракция осадка; *M* – маркер молекулярного веса Prestained Protein Ladder (10–180 kDa) («NeoFroxx»)

На следующем этапе проводили подбор условий рефолдинга белка согласно методике, представленной в [3]. Для этого использовали буферы разных составов, различающиеся рН и наличием добавок (Gdn-HCl или L-Аргинин) в разных концентрациях (табл. 1). К каждому буферу в качестве восстановителя S-S связей добавляли либо DTT (дитиотреитол), либо GSH (глутатион восстановленный) и GSSG (глутатион окисленный).

Таблица 1

Буферы для рефолдинга

Название	Состав
Буфер2 (2х)	100 мМ Трис-НСl (рН=7,6), 40 мМ NaCl, 1,6 мМ KCl
Буфер3 (2х)	100 мМ Трис-НСl (рН=8,3), 40 мМ NaCl, 1,6 мМ KCl
Буфер5 (2х)	100 мМ Трис-НСl (рН=7,6), 40 мМ NaCl, 1,6 мМ KCl, 1 М Gdn-HCl
Буфер6 (2х)	100 мМ Трис-НСl (рН=8,3), 40 мМ NaCl, 1,6 мМ KCl, 1 М Gdn-HCl

Название	Состав
Буфер8 (2х)	100 мМ Трис-НСl (рН=7,6), 40 мМ NaCl, 1,6 мМ KCl, 0,8 М L-Аргинин
Буфер9 (2х)	100 мМ Трис-НСl (рН=8,3), 40 мМ NaCl, 1,6 мМ KCl, 0,8 М L-Аргинин
Буфер11 (2х)	100 мМ Трис-НСl (рН=7,6), 40 мМ NaCl, 1,6 мМ KCl, 2М Gdn-НСl
Буфер12 (2х)	100 мМ Трис-НСl (рН=8,3), 40 мМ NaCl, 1,6 мМ KCl, 2М Gdn-НСl
Буфер14 (2х)	100 мМ Трис-НСl (рН=7,6), 40 мМ NaCl, 1,6 мМ KCl, 1,6 М L-Аргинин
Буфер15 (2х)	100 мМ Трис-НСl (рН=8,3), 40 мМ NaCl, 1,6 мМ KCl, 1,6 М L-Аргинин

Эффективность рефелдинга белка оценивали по мутности раствора при ОП₃₄₀ (длина оптического пути 1 см), где повышенные значения светопроводимости свидетельствовали о процессе агрегации белка. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Сравнение светопроводимости растворов при ОП₃₄₀ в буферах для рефолдинга разных составов

Буфер для рефолдинга + 5 мМ DTT	Светопроводимость при ОП 340	Буфер для рефолдинга + 2 мМ GSH, 0,4 мМ GSSG	Светопроводимость при ОП ₃₄₀
Буфер 2А	2,158	Буфер 2В	2,053
Буфер 3А	2,247	Буфер 3В	1,860
Буфер 5А	1,665	Буфер 5В	1,119
Буфер 6А	1,347	Буфер 6В	0,873
Буфер 8А	1,316	Буфер 8В	0,436
Буфер 9А	0,904	Буфер 9В	0,540
Буфер 11А	0,400	Буфер 11В	0,292
Буфер 12А	0,354	Буфер 12В	0,271
Буфер 14А	0,270	Буфер 14В	0,202
Буфер 15А	0,267	Буфер 15В	0,216

Из табл. 2 видно, что белок DADB, рефолдированный в буфере 14В и 15В склонен к наименьшей агрегации. Таким образом, эти условия были выбраны для дальнейшего этапа – подбора добавок. Значения светопроводимости при ОП₃₄₀ рефолдированного белка в буферах с добавками представлены в табл. 3.

Таблица 3

Сравнение светопроводимости растворов при ОП₃₄₀ в буферах для рефолдинга с добавками

Добавка к буферу 14В	Светопроводимость при ОП 340	Добавка к буферу 15В	Светопроводимость при ОП 340
–	0,199	–	0,188
1 мМ ПЭГ	1,127	1 мМ ПЭГ	0,186

Добавка к буферу 14В	Светопроводимость при ОП 340	Добавка к буферу 15В	Светопроводимость при ОП 340
5 мМ ЭДТА	1,008	5 мМ ЭДТА	0,100
5 мМ CaCl ₂	0,269	5 мМ CaCl ₂	0,251
5 мМ MgCl ₂	0,205	5 мМ MgCl ₂	0,215
0,1 М NaCl	0,197	0,1 М NaCl	0,212
0,005 % Твин 20	0,198	0,005 % Твин 20	0,209
0,12 М сахараза	0,200	0,12 М сахараза	0,214

Из табл. 3 видно, что белок DADB, рефолдированный в буфере 15ВС, содержащий в виде добавки 5 мМ ЭДТА, склонен к наименьшей агрегации.

Таким образом, подобраны условия солюбилизации и рефолдинга белка DADB: солюбилизацию белка DADB из ТВ эффективнее проводить буфером, содержащим 6 М гуанидин гидрохлорид, а оптимальным для рефолдинга денатурированного белка DADB является буфер следующего состава: 50 мМ Трис-НCl (pH=8,3), 20 мМ NaCl, 0,8 мМ KCl, 0,8 М L-Аргинин, 2 мМ GSH, 0,4 мМ GSSG, 5 мМ ЭДТА.

Библиографические ссылки

1. *Пластинина О.В.* Клонирование и экспрессия главных антигенных доменов гликопротеина E2 вируса диареи крупного рогатого скота в клетках *E. coli* // 78-я научная конференция студентов и аспирантов Белорусского государственного университета, Минск, 10–21 мая 2021 г.: в 3 ч. / Белорус. гос. ун-т; редкол.: В. Г. Сафонов (гл. ред.) [и др.]. Минск, 2021. Ч. 1. С. 288–291.
2. *DiBella E. E.* Expression and folding of recombinant bovine prethrombin-2 and its activation to thrombin / E. E. DiBella, M. C. Maurer, H. A. Scheraga // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270, iss.1. P. 163–169.
3. PROTEOSTAT Protein Refolding and Aggregation Sensing Kit [Electronic resource]. URL: https://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ENZ-51040_insert.pdf (date of access: 20.12.2023).