

RECOMBINANT MATRIX PROTEIN OF THE RABIES VIRUS

Mukantayev K., Shustov A., Tursunov K., Ingirbay B., Adish Zh., Ramanculov E., Mukanov K.

*National Center for Biotechnology
13/5, Korgalzhyn hwy, Astana, 010000, Kazakhstan
lii@biocenter.kz*

ABSTRACT

Matrix proteins of RNA viruses are the main structural components and are required for virus assembly. The assembly of these virus particles is based on the ability of binding of the matrix protein to the nucleocapsid. This property suggests a promising role for the matrix protein, as it acts as a bridge between the nucleocapsid and plasma membrane. Analysis of literature on the biological functions of basic components of the rabies virus and the spread of rabies in the Republic of Kazakhstan showed the importance of research on the recombinant matrix antigen of the virus. In this study, we used genetic engineering to show the results of receipt of the recombinant matrix protein of the rabies virus. As a result of research carried out design of the expression genetic construction containing gene of matrix protein of the rabies virus, and was performed synthesis of this gene with length 654 nucleotides under de novo conditions. The nucleotide sequence of the synthesized gene showed the correct assembly. Using expression plasmids, an *Escherichia coli* strain that produced the recombinant matrix antigen of the rabies virus was obtained. Electrophoretic analysis showed the expression of the protein with a molecular weight of 41 kDa. We developed protocols for the cultivation of the obtained strain and purification of the recombinant matrix antigen. Immunization of mice and analysis of sera from the immunized mice with the enzyme-linked immunosorbent assay were used to study the immunogenic properties of the recombinant antigen.

Keywords: rabies, virus, matrix protein, recombinant antigen, genetic construction, production strain

УДК 577.21; 612.017.1:575.2; 602.68; 602.68:57.083

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО МАТРИКСНОГО ПРОТЕИНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Мукантаев К.Н., Шустов А.В., Турсунов К.А., Инірбай Б., Әдіш Ж., Раманкулов Е.М., Муканов К.К.

*Национальный центр биотехнологии
Кургальжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан
lii@biocenter.kz*

АБСТРАКТ

Матриксные белки РНК-содержащих вирусов являются основными структурными компонентами вируса, необходимыми для его сборки. Сборка таких вирусных частиц основана на способности матриксного белка связываться с нуклеокапсидом. Это свойство свидетельствует о многообещающей роли матриксного белка в биологии вируса, как моста между нуклеокапсидом и плазматической мембраной. Анализ литературных данных, полученных при исследовании биологических функций основных компонентов вируса бешенства, и анализ распространения вируса в республике показали необходимость проведения исследований по получению рекомбинантного матриксного белка вируса бешенства. Для достижения поставленной цели использовались методы генетической инженерии. В работе представлены материалы по получению рекомбинантного матриксного белка вируса бешенства. Проведен дизайн экспрессионной генетической конструкции и в условиях *de novo* синтезирован ген матриксного антигена длиной 654 пар оснований. Анализ нуклеотидной последовательности синтезированного гена показал полное соответствие синтезированного гена с прогнозируемой последовательностью. На основе экспрессионных плазмид получен штамм микроорганизма *E. coli*, продуцирующий рекомбинантный матриксный антиген вируса бешенства. Отработаны условия культивирования полученного штамм-продуцента и

протокол выделения очистки рекомбинантного матриксного антигена вируса бешенства. Электрофоретический анализ показал, что штамм микроорганизма продуцирует белок с молекулярной массой 41 кДа. Путем иммунизации мышей и анализа сывороток иммунизированных мышей иммуноферментным анализом изучены иммуногенные свойства рекомбинантного антигена.

Ключевые слова: бешенство, вирус, матриксный белок, генетическая конструкция, штамм-продуцент, рекомбинантный антиген.

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство является одним из древнейших и широко распространенных инфекционных заболеваний, которое регистрируется во всем мире и поражает почти всех млекопитающих. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, ежегодно от болезни погибает более чем 55000 людей и более чем 15 миллионов человек проходят курс лечения после заражения. Большинство случаев заболевания людей возникают в результате укуса инфицированных собак или кошек [1]. Широкое распространение инфекции требует более детального исследования биологических функций как самого вируса, так и основных белков вируса. Для достижения этих целей наиболее эффективным способом является получение рекомбинантных белков вируса и специфичных к ним моноклональных или поликлональных антител.

Вирус бешенства имеет пять белковых компонентов: нуклеопротеид (N), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G), а также РНК-полимеразу (L). Два белка вируса, фосфопротеин (P) и вирусная РНК-полимераза (L) связаны с рибонуклеопротеином (RNP) вируса. Из всех белковых компонентов вируса наименее изученным является матриксный (M) протеин.

Матриксные белки РНК-содержащих вирусов играют важную роль в жизненном цикле вируса. Эксперименты с введением делеций в геном матриксного белка вируса бешенства показали, что отсутствие матриксного белка подавляет репликацию вируса и усиливает транскрипцию. Более того, увеличение концентрации матриксного белка приводит к снижению скорости транскрипции и одновременно к увеличению репликации матрикс дефектных продуктов и полноразмерных вирусных частиц. Эти результаты показывают, что матриксный белок вируса бешенства способен опосредованно переключать высокий уровень синтеза мРНК в пользу геномной РНК для обеспечения сборки вирионов [2].

Анализируя фенотипические признаки различных вирусов бешенства, а также влияние концентрации матриксных белков на синтез РНК, было определено, что вирусы бешенства штаммов ERA и PV, в отличие от вирусов бешенства штамма SAD L16, испытывают дефицит матриксного белка [3]. Сравнение аминокислотной последовательности матриксного антигена выявило, что один остаток аргинина в позиции 58 является критически важным. Рекомбинантный вирус SAD M(R58G), после обмена аргинина на глицин в 58 позиции, утратил способность подавлять транскрипцию вируса и стимулировать репликацию. Это привело к увеличению скорости транскрипции более чем в 15 раз, которое наблюдалось у делеционных мутантов. Самое главное, что эффективность сборки вируса и почкование были равны как для матриксного белка вируса дикого типа, так и для рекомбинантного матрикса с данной мутацией. Кроме того, плотность частиц вируса, белковый состав и удельная инфекционность SAD L16 и SAD M(R58G) вирусов были идентичны. Таким образом, были определены мутации матриксного белка, которые влияют на регуляцию синтеза РНК, но не на сборку вириона, доказывая различие этих функций [3].

Другим процессом, тесно связанным с матриксным белком, является сборка вирусов. Для выяснения важности матриксного белка вируса бешенства при формировании вириона исследователями получен мутантный вирус SAD ΔM, в котором отсутствует весь ген матриксного белка. Уровень размножения SAD ΔM вируса в культуре клеток значительно отличался от дикого типа вируса бешенства. Клетки, зараженные SAD ΔM вирусом, показывали повышенный уровень слияния, усиливая тем самым гибель клеток в отличие от вируса дикого типа, который не демонстрировал цитопатическое действие. Такое поведение зараженных клеток связано только с повышенной экспрессией гликопротеина вируса на поверхности мембраны [4].

Представленные авторами результаты показывают, что матриксный белок является единственным внутренним белком вируса, с которым цитоплазматическая часть гликопротеина может взаимодействовать. Очевидно, что взаимодействие между гликопротеином и рибонуклеопротеиновым комплексом также опосредуется матриксным белком, что позволяет эффективно индуцировать инфекционные вирионы вируса.

Для детального изучения других свойств и функций матриксного белка Satoshi Amezawa с соавторами (2003) использовали моноклональные антитела. Из более 100 штаммов полученных авторами гибридных клеток смогли найти только один клон (#3-9-16), который продуцировал анти-M антитела. Полученные антитела реагировали с линейным эпитопом, расположенным на N-конце белка [5]. В ходе скрининга гибридных клеток авторы выявили, что моноклональные антитела окрашивали зараженные вирусом бешенства культуры клеток совсем по-другому в сравнении с кроличьими анти-M поликлональными антителами. Моноклональными антителами преимущественно окрашивалась зона Гольджи.

В данной статье опубликованы данные по получению рекомбинантного матриксного антигена вируса бешенства, так как для получения моноклональных антител наиболее удобными и прогнозируемыми антигенами являются рекомбинантные. Тем более, дополнительно к полному рекомбинантному антигену

нами получен мутантный антиген, состоящий только из N-концевой фрагмента матричного антигена вируса бешенства, но несущий линейный мотив PPEYVPL. По литературным данным, данный мотив играет важную роль в формировании вирусной частицы и его патогенности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микроорганизмов, плазмиды, питательные среды, олигонуклеотиды

В работе использованы штаммы *E. coli* BL21 (DE3), DH5cc и XLBlue (Novagen, USA), плазмидные вектора pGEM-TEasy (Promega, USA) и pET32. Клетки *E. coli* штаммов DH5cc и XLBlue использовались для препаративной наработки мультикопийных и экспрессионных плазмид. Клетки *E. coli* выращивали на жидких и плотных питательных средах LB. Для синтеза гена матричного белка предварительно синтезированы 18 олигонуклеотидов.

Синтез гена матричного антигена вируса бешенства в условиях de novo

Ген, кодирующий матричный протеин вируса бешенства длиной 654 пар оснований, синтезирован в условиях *de novo* методом полимеразной цепной реакции с использованием Phusion полимеразы. К синтезированному гену матричного протеина с 5'-конца добавлены BamHI и NcoI сайты рестрикции, с 3'-конца XhoI и HindIII. Полученные фрагменты гена матричного протеина клонированы в экспрессионную плазмиду pET32a по NcoI и XhoI сайтам рестрикции. Клонирование проводили согласно Маниатису и др. [6]. Первичную структуру рекомбинантной плазмиды определяли по методу Sanger [7] с использованием наборов BigDye на автоматических анализаторах ДНК ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США). Рекомбинантная плазида трансформировалась в компетентные клетки штамма *E. coli* BL21(DE3). Трансформацию компетентных клеток проводили методом электропорации с использованием MicroPulser (BioRad) при следующих условиях: 100 нг плазмиды на 50 мкл клеток, напряжение – 2,5 кВ; электрическая емкость – 25 мкФ, сопротивление – 200 Ом. Время переноса составило 5,2 мс. С целью определения максимального уровня экспрессии белка экспрессию индуцировали различными концентрациями (0,1, 0,25, 0,5 и 1 мМ) ИПТГ при различных температурах (20, 25, 30 и 37°C) с различными промежутками времени до 12 ч после индукции.

Очистка рекомбинантного матричного протеина вируса бешенства

Клетки продуценты выращивали в 200 мл среды LB до OD600 ~ 0,8 при 37°C в течение 18-24 часов. По достижении необходимой плотности добавляли 0,2 мМ IPTG и культивировали в течение 8 часов при комнатной температуре. После этого клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 20 минут, осадок промывали в 1/3 объема физиологического раствора, центрифугировали при 3000 g в течение 20 минут и ресуспендировали в 10 мл TNE буфера (20 мМ Трис pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl). Клетки разрушали ультразвуком (22 kHz, 4 раза по 120 секунд), нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 60 минут. Нерастворимую фракцию (осадок) ресуспендировали в 10 мл буфер №1 (20 мМ HEPES, 500 мМ NaCl, 1 М мочевиной), инкубировали 30 минут на орбитальном шейкере при комнатной температуре, затем центрифугировали при 13000 об/мин в течение 30 минут. Нерастворимую фракцию ресуспендировали в буфере для металлаффинной хроматографии (20 мМ HEPES, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 8 М мочевины, 10 мМ 2-меркаптоэтанол) и обрабатывали ультразвуком (22 kHz, 1 раз 60 секунд). После обработки ультразвуком суспензию инкубировали 30 минут на орбитальном шейкере при комнатной температуре, затем центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 минут, нерастворимую фракцию отбрасывают. Рекомбинантный белок из надосадочной жидкости очищали на колонке HisTrap (Amersham, США). Элюцию проводили буфером для металлаффинной хроматографии, содержащем 8 М мочевины и 200 мМ имидазол.

Количественное определение концентрации белка в лизате и фракциях определяли по Бредфорду с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [8]. Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лэммли [9] в полиакриламидном геле (10 и 12%) в денатурирующих условиях.

Иммунизация лабораторных животных

Белым мышам в первый день иммунизации внутривенно вводили по 100 мкг антигена в 0,1 мл неполного адьюванта Фрейнда (Gibco, США). На 7, 11, 12, 13 дни иммунизации животным инъецировали по 100 мкг антигена в физиологическом растворе, pH 7,2-7,4. Через три дня после последней иммунизации сыворотка крови иммунизированных мышей исследовалась на наличие антител к антигену вируса бешенства методом иммуноферментного анализа. В качестве антигенов использовали рекомбинантный матричный белок вируса бешенства и фиксированный вирус бешенства.

Вестерн-блот

Электрофорез антигена вируса бешенства проводили в 11%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по методу Лэммли на аппарате для вертикального электрофореза (BioRad, США). Электрофоретический перенос антигенов из геля на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли с помощью трансблота (BioRad, США).

Для иммунохимического проявления специфических антигенов нитроцеллюлозную мембрану сначала инкубировали в 1% растворе БСА в течение ночи при 4°C. Затем отмывали по три раза в фосфатно-солевом

буфере, рН-7,2 (ФСБ, рН-7,2) и фосфатно-солевым буфере с Твином (ФСБ+Тв) и выдерживали 1,5 ч при 37°C в растворе моноклональных антител против 6His-tag или коммерческих поликлональных антител против матричного антигена. После чего носитель вновь отмывали и инкубировали в рабочем разведении антивидовых антител, меченых пероксидазой хрена (1 ч при 37°C). Повторяли процедуру отмывки и проявляли реакцию. Раствор субстрата готовили непосредственно перед использованием следующим образом: 0,01 г 4-хлор-нафтола (Sigma, США) растворяли в 2 мл метанола, смешивали с 18 мл ЗФР (рН 7,2-7,4) и добавляли 0,01 мл 3% перекиси водорода.

Иммуноферментный анализ

96-луночный иммунологический планшет иммобилизовывали рекомбинантным матричным антигеном в оптимальной концентрации (0,01 мг/мл) в 0,05 М бикарбонатном буфере с рН-9,6 и инкубировали в течение 12 часов при 4°C. После отмывки планшета поверхность лунок блокировали 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина. После отмывки планшета в лунки вносили двукратные сыворотки, начиная с 1:100, и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После инкубирования планшет отмывали и в лунки вносили антивидовой конъюгат в разведении 1:5000, инкубировали при 37°C 1 час. Реакцию проявляли с помощью субстрата, полученный результат учитывали с помощью спектрофотометра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Первым этапом работ проведен анализ аминокислотной последовательности матричного белка различных изолятов вируса бешенства с целью поиска подходящего прототипа антигена и дизайн генетической конструкции, несущий оптимизированный ген матричного белка. Для этих целей из базы данных PubMed были отобраны аминокислотные последовательности несколько вариантов матричных антигенов, выделенных в различных странах. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности матричного антигена различных изолятов показал высокую степень идентичности матричного белка вируса, выделенного в Китае и Канаде (рис. 1). По некоторым аминокислотам в позиции 44, 45, 81, 82, 167 и 168 матричный антиген вируса, выделенный в России, значительно отличался от других изолятов. Учитывая географическую близость, предпочтение было отдано аминокислотной последовательности антигена вируса, выделенного в России.

| | | | |
|--------------------------|-------|---|--------------------|
| | | 1 | 40 |
| matrix protein RV China | (1) | MNFLRKIVKNCRDEDTKPFSA | SAPPDDDDLWLPPEYVP |
| matrix protein RV Canada | (1) | MNFLRKIVKNCRDEDTQKPSL | VSAPPDDDDLWLPPEYVP |
| matrix protein RV Brazil | (1) | MNFLRKIVKNCRDEDTQKPS | VSAPPDDDDLWLPPEYVP |
| matrix protein RV France | (1) | MNFLRKIVKNCRDEDTQKPSL | VSAPPDDDDLWLPPEYVP |
| matrix protein RV Russia | (1) | MNLLRKMVKNCRDEDTQKPS | VSAPPYDDDLWLPPEYVP |
| Consensus | (1) | MNFLRKIVKNCRDEDTQKPS | VSAPPDDDDLWLPPEYVP |
| | | 41 | 80 |
| matrix protein RV China | (41) | LKELTGKKNRNFCINGEVKVCSPNGYS | FRILRHILRSFD |
| matrix protein RV Canada | (41) | LKELTGKKNRNFCINGEVKVCSPNGYS | FRILRHILRSFD |
| matrix protein RV Brazil | (41) | LKELTSKKNRNFCINGEVKVCSPNGYS | FRILRHILRSFD |
| matrix protein RV France | (41) | LKELTGKKNRNFCINGEVKVCSPNGYS | FRILRHILRSFN |
| matrix protein RV Russia | (41) | LKEFAGKKNRNFCINGEVKVCSPNGYS | FRILRHILRSFD |
| Consensus | (41) | LKELTGKKNRNFCINGEVKVCSPNGYS | FRILRHILRSFD |
| | | 81 | 120 |
| matrix protein RV China | (81) | EIYSGNHRMIGLVKVVVGLALSGAPVPEGMNWVYKLRRTI | |
| matrix protein RV Canada | (81) | EIYSGNHRMIGLVKVVVGLALSGAPVPEGMNWVYKLRRTI | |
| matrix protein RV Brazil | (81) | EIYSGNHRMIGLVKVVVGLALSGAPVPEGMNWVYKLRRTI | |
| matrix protein RV France | (81) | EIYSGNQRMIGLVKVVVGLALSGAPVPEGMNWVYKLRRTI | |
| matrix protein RV Russia | (81) | EIYIYGNHRMIGLVKVVVGLALSGAPVPEGMNWVYKLRRTI | |
| Consensus | (81) | EIYSGNHRMIGLVKVVVGLALSGAPVPEGMNWVYKLRRTI | |
| | | 121 | 160 |
| matrix protein RV China | (121) | IFQWADSRGPLEGEELYSQEIWDDDT | EFVGLQIRVSAR |
| matrix protein RV Canada | (121) | IFQWADSRGPLEGEELYSQEIWDDDT | EFVGLQIRVSAR |
| matrix protein RV Brazil | (121) | IFQWADSRGPLEGEELYSQEIWDDDT | EFVGLQIRVSAR |
| matrix protein RV France | (121) | IFQWADSRGPLEGEELYSQEIWDDDA | EFVGLQIRVSAR |
| matrix protein RV Russia | (121) | IFQWADSRGPLEGEELYSQEIWDDDT | EFVGLQIRVSAR |
| Consensus | (121) | IFQWADSRGPLEGEELYSQEIWDDDT | EFVGLQIRVSAR |
| | | 161 | 200 |
| matrix protein RV China | (161) | QCHIQGRINWCINMNSRACQLWSDMSLQ | QQRSEEDKDSLL |
| matrix protein RV Canada | (161) | QCHIQGRINWCINMNSRACQLWSDMSLQ | QQRSEEDKDSLL |
| matrix protein RV Brazil | (161) | QCHIQGRINWCINMNSRACQLWSDMSLQ | QQRSEEDKDSLL |
| matrix protein RV France | (161) | QCHIQGRINWCINMNSRACQLWSDMSLQ | QQRSEEDKDSVLL |
| matrix protein RV Russia | (161) | QCHIQGRINWCINTNSRACQLWSDMSLQ | QQRSEEDKDSLL |
| Consensus | (161) | QCHIQGRINWCINMNSRACQLWSDMSLQ | QQRSEEDKDSLL |
| | | 201 | |
| matrix protein RV China | (201) | LE | |
| matrix protein RV Canada | (201) | LE | |
| matrix protein RV Brazil | (201) | LE | |
| matrix protein RV France | (201) | LE | |
| matrix protein RV Russia | (201) | LE | |
| Consensus | (201) | LE | |

Рис. 1. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности матричного антигена вируса бешенства различных изолятов

Fig. 1. Comparative analysis of amino acid sequences of matrix antigen of rabies virus from different isolates

Используя программное обеспечение Vector NTI 11.5 (Invitrogen), получена кодон оптимизированная нуклеотидная последовательность матричного антигена вируса бешенства, выделенного в России. Для эффективного клонирования полученной последовательности в её структуру добавлена нуклеотидная последовательность, специфичная для следующих рестриктаз BamHI, NcoI, и XhoI, HindIII. В результате проведенного дизайна создана генетическая конструкция на основе вектора pET32c с учетом таких сайтов рестрикции как NcoI и XhoI (рис. 2).

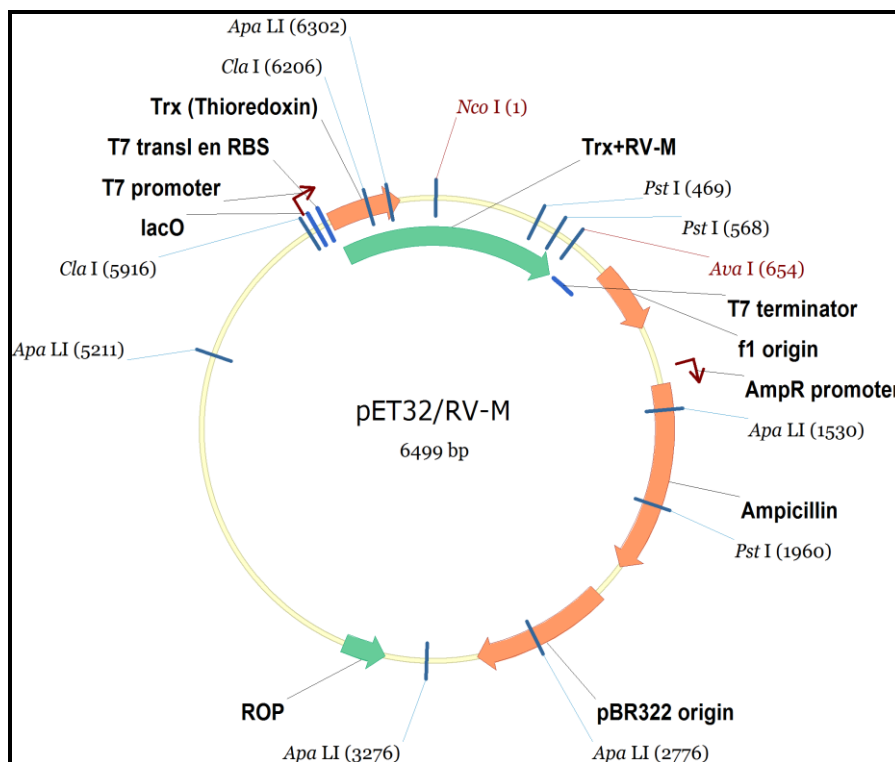


Рис. 2. Схема генетической конструкции на основе pET32, несущей ген матричного белка вируса бешенства

Fig. 2. Map of genetic construction based on the pET32 plasmid having gene of matrix protein of rabies virus

Следующим этапом работ стал синтез гена в условиях *de novo* и получение полноразмерного гена матричного антигена вируса бешенства с концевыми сайтами рестрикции BamH, Nco, XhoI, Hind. Для этих целей предварительно были синтезированы 18 взаимно перекрывающихся олигонуклеотидов. Конечным результатом синтеза стал продукт полимеразной цепной реакции длиной 654 пар оснований. Анализ первичной последовательности синтезированного гена показал 100% совпадение с кодон оптимизированной последовательностью гена матричного антигена вируса бешенства.

Дополнительно с полным геном был получен ген, несущий делецию аденина в позиции 356, что приводило к появлению стоп кодона TGA (рис. 3). Делеция, полученная случайным образом, позволила получить рекомбинантный N-концевой фрагмент матричного антигена.

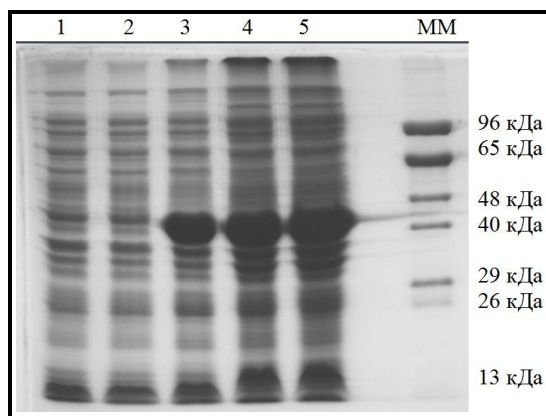
| | | |
|-----------------|--|-----|
| | 301 | 350 |
| MP RV (делеция) | GGTGGTGGGCCTGGCGCTGAGCGGCGCGCCGGTGCCGGAAGGCATGAACT | |
| MP RV (полный) | GGTGGTGGGCCTGGCGCTGAGCGGCGCGCCGGTGCCGGAAGGCATGAACT | |
| MP RV (Россия) | GGTGGTGGGCCTGGCGCTGAGCGGCGCGCCGGTGCCGGAAGGCATGAACT | |
| Consensus | GGTGGTGGGCCTGGCGCTGAGCGGCGCGCCGGTGCCGGAAGGCATGAACT | |
| | 351 | 400 |
| MP RV (делеция) | GGGTGT-TAAACTGCGCCGCACCCTGATTTTTCAGTGGGCGGATAGCCGC | |
| MP RV (полный) | GGGTGTATAAACTGCGCCGCACCCTGATTTTTCAGTGGGCGGATAGCCGC | |
| MP RV (Россия) | GGGTGTATAAACTGCGCCGCACCCTGATTTTTCAGTGGGCGGATAGCCGC | |
| Consensus | GGGTGTATAAACTGCGCCGCACCCTGATTTTTCAGTGGGCGGATAGCCGC | |
| | 401 | 450 |
| MP RV (делеция) | GGCCCCTGGAAGGCGAAGAAGCTGGAACATAGCCAGGAAATACCTGGGA | |
| MP RV (полный) | GGCCCCTGGAAGGCGAAGAAGCTGGAACATAGCCAGGAAATACCTGGGA | |
| MP RV (Россия) | GGCCCCTGGAAGGCGAAGAAGCTGGAACATAGCCAGGAAATACCTGGGA | |
| Consensus | GGCCCCTGGAAGGCGAAGAAGCTGGAACATAGCCAGGAAATACCTGGGA | |

Рис. 3. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена матричного антигена

Fig. 3. Comparative analysis of nucleotide sequences of gene of the matrix antigen

Результатом проведенных работ по клонированию полученных генов в экспрессионную плазмиду pET32 и трансформации рекомбинантных плазмид в компетентные клетки BL21(DE3) стали штаммы

Escherichia coli BL21(DE3)/pET32/MPRV, продуцирующий рекомбинантный матриксный антиген вируса бешенства и BL21(DE3)/pET32/MPRV(del). Ген клонировался в экспрессионную плазмиду по NcoI и XhoI сайтам рестрикции. Анализ индукции рекомбинантного полного матриксного антигена вируса бешенства методом ПААГ электрофореза показал наличие белка с молекулярной массой 45 кДа. При этом количество получаемого продукта, согласно электрофореграмме, составило около 25% от всех клеточных белков (рис. 4). Необходимо отметить, что полученный белок является «фьюжен» белком и состоит из двух компонентов – теоридоксина с молекулярной массой 17 кДа и матриксного белка вируса бешенства молекулярной массой 24 кДа.



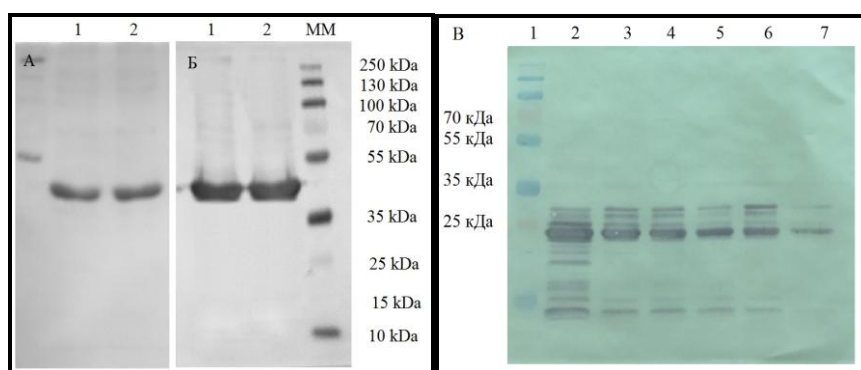
1 – лизат кишечной палочки до индукции; 2 – лизат кишечной палочки через 2 часа после индукции; 3 – лизат кишечной палочки через 4 часа после индукции; 4 – лизат кишечной палочки через 6 часов после индукции; 5 – лизат кишечной палочки через 20 часов после индукции; MM – молекулярные маркеры

Рис. 4. SDS-PAGE анализ индукции матриксного антигена вируса бешенства

1 – lysate of *E. coli* before induction; 2 – lysate of *E. coli*, 2 hours after induction; 3 – lysate of *E. coli*, 4 hours after induction; 4 – lysate of *E. coli*, 6 hours after induction; 5 – lysate of *E. coli*, 20 hours after induction; MM – molecular markers

Fig. 4. SDS-PAGE analysis of induction of the matrix protein of rabies virus

Для обеспечения эффективной очистки рекомбинантных белков методом металл-хелатной хроматографии в состав матриксного антигена встроены гексагистидиновые метки. Вестерн-блот с моноклональными антителами против гексагистидиновых меток показал специфическое взаимодействие антител с белками молекулярной массой 45 и 25 кДа (рис. 5).



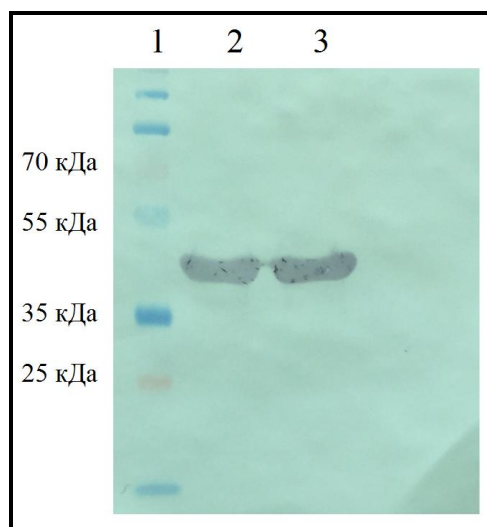
А 1-2 – электрофорез полного матриксного белка; Б 1-2 – вестерн-блот полного матриксного белка; MM – молекулярный маркер; В – вестерн-блот N фрагмента матриксного белка; 1 – молекулярные маркеры; 2-7 – N концевой фрагмент матриксного белка после обработки различными концентрациями ИПТГ

Рис. 5. Вестерн-блот рекомбинантного матриксного антигена вируса бешенства с моноклональными антителами против 6His-tag

А 1-2 – electrophoresis of full matrix protein; Б 1-2 – western blot of the full matrix protein; MM – molecular markers; В – western blot of N fragment of matrix protein; 1 – molecular markers; 2-7 – the N end fragment of matrix protein after treatment with different concentration of IPTG

Fig. 5. Western blot of the recombinant matrix antigen of rabies virus with monoclonal antibodies against 6His-tag

Результаты, полученные вестерн-блотом с моноклональными антителами против 6His-tag, были подтверждены вестерн-блотом с коммерческой сывороткой против матричного антигена вируса бешенства. Результаты вестерн-блота представлены на рисунке 6.



1 – молекулярные маркеры; 2-3 – рекомбинантный матричный белок

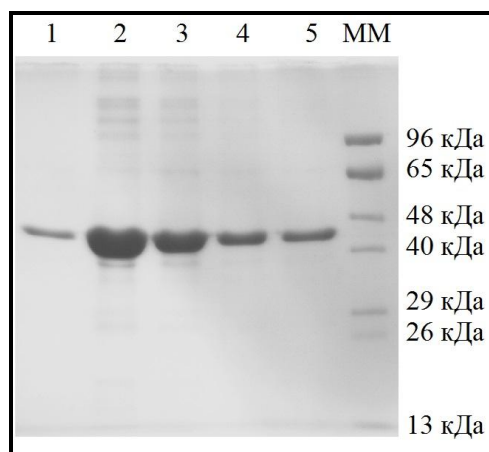
Рис. 6. Вестерн-блот рекомбинантного матричного антигена против коммерческой сыворотки

1 – molecular markers; 2-3 – recombinant matrix protein

Fig. 6. Western blot of the recombinant matrix antigen against commercial serum

Nakahara T. с соавторами (2003) выявили матричный антиген в виде двух форм, в виде димера с массой 54 кДа и мономера массой 24 кДа. Авторами определено, что содержание компонента вириона с молекулярной массой 54 кДа было постоянным и составляло 25-30% от общего количества матричного белка. В клетке это соотношение было несколько меньше и составляло примерно 10-20% от общего матричного белка [10].

Важным показателем получаемого продукта, оказывающим влияние на результаты дальнейших работ, является чистота конечного продукта. В настоящее время широкое применение получила металл-хелатная хроматография на основе никель-сефарозы. Используя данную технологию, подобраны параметры очистки полученных рекомбинантных антигенов (рис. 7). Анализ электрофореграммы очищенных препаратов рекомбинантного протеина показал, что наиболее концентрированный выход антигена из колонки наблюдается при элюции антигена 100 мМ имидазолом.



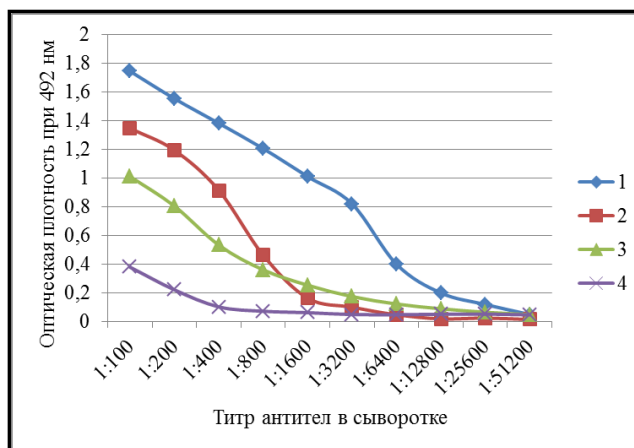
MM – молекулярный маркер; 1 – антиген после обработки хроматографической колонки 50 мМ имидазолом; 2 – антиген после обработки хроматографической колонки 100 мМ имидазолом; 3 – антиген после обработки хроматографической колонки 200 мМ имидазолом; 4-5 – антиген после обработки хроматографической колонки 500 мМ имидазолом

Рис. 7. SDS-PAGE анализ очищенных препаратов рекомбинантного матричного антигена вируса бешенства

MM – molecular markers; 1 – antigen after treatment of chromatographic column with 50 mM imidazole; 2 – antigen after treatment of chromatographic column with 100 mM imidazole; 3 – antigen after treatment of chromatographic column with 200 mM imidazole; 4-5 – antigen after treatment of chromatographic column with 500 mM imidazole

Fig. 7. SDS-PAGE analysis of purified preparations of recombinant matrix protein of rabies virus

Определение иммуногенных свойств полученных рекомбинантных антигенов проводили с использованием иммуноферментного анализа. С этой целью проведена иммунизация лабораторных животных полученными рекомбинантными антигенами и фиксированным вирусом бешенства. Результаты иммуноферментного анализа представлены на рисунке 8.



1 – сыворотка против полного рекомбинантного матричного антигена; 2 – сыворотка против рекомбинантного N-концевого фрагмента матричного антигена; 3 – сыворотка против рекомбинантного нуклеопротеина вируса бешенства; 4 – сыворотка против фиксированного вируса

Рис. 8. График титрации сывороток в иммуноферментном анализе с рекомбинантным полным матричным антигеном вируса бешенства

1 – serum against recombinant full-matrix antigen; 2 – serum against recombinant N terminal fragment of the antigen matrix; 3 – serum against recombinant nucleoprotein of rabies virus; 4 – serum against fixed virus

Fig. 8. Graph of serum titration in ELISA with recombinant full-matrix antigen of rabies virus

Анализ титра антител в сыворотке иммунизированных лабораторных мышей в иммуноферментном анализе показал, что рекомбинантный матричный антиген обладает достаточно высокой иммуногенностью и может быть использован для получения поликлональных и моноклональных антител, титр антител достигал 12800. Сыворотка против N-концевого фрагмента рекомбинантного матричного антигена продемонстрировала титры антител значительно ниже, чем сыворотка против полного матричного антигена вируса бешенства.

Наличие перекрестной реакции рекомбинантного полного матричного антигена вируса с сывороткой мышей, иммунизированных рекомбинантным нуклеопротеином вируса бешенства, демонстрирует, что в препаратах рекомбинантных антигенов присутствуют компоненты кишечной палочки в виде полисахаридных компонентов. Сыворотка против рекомбинантного нуклеопротеина получена путем иммунизации мышей рекомбинантным нуклеопротеином [11].

Сыворотка против фиксированного вируса не показала каких-либо значимых титров антител при взаимодействии с рекомбинантным матричным антигеном вируса бешенства. По нашему мнению, матричный антиген является внутренним антигеном вируса, в результате чего в организме не образуются антитела против данного антигена при иммунизации вакцинными препаратами вируса.

ВЫВОДЫ

Проведен дизайн экспрессионной генетической конструкции, несущей ген матричного антигена вируса бешенства и синтез 18 взаимно перекрывающихся олигонуклеотидов гена матричного белка вируса бешенства. Определены оптимальные параметры синтеза гена матричного белка в условиях *de novo*. Получен ген матричного антигена длиной 654 п.о.

Проведено клонирование синтезированного гена матричного антигена вируса бешенства в экспрессионную плазмиду рЕТ32. Анализ нуклеотидной последовательности синтезированного гена показал правильность сборки генетической конструкции.

Получен штамм микроорганизма *E. coli*, продуцирующий рекомбинантный матричный антиген вируса бешенства. Отработаны условия культивирования полученного штамм-продуцента. Электрофоретический анализ показал экспрессию белка с молекулярной массой 41 кДа. Отработан протокол выделения очистки рекомбинантного матричного антигена вируса бешенства.

Финансирование

Работа профинансирована из средств проекта «Разработка экспресс тест-системы для диагностики бешенства на основе моноклональных антител к рекомбинантному матричному (М) антигену вируса бешенства» в рамках бюджетной научно-технической программы О.0695 «Создание диагностических препаратов и вакцин на основе использования молекулярно-генетических методов для обеспечения ветеринарной безопасности» на 2015-2017 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hongtao K., Yinglin Q., Hualei W., et al. Chimeric Rabies Virus-Like Particles Containing Membrane-Anchored GM-CSF Enhances the Immune Response against Rabies Virus // *Viruses*. – 2015. – Vol. 7. – P. 1134-1152.
2. Finke S., Mueller-Waldeck R., Conzelmann K.K. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication // *Journal of General Virology*. – 2003. – Vol. 84. – P. 1613-1621.
3. Finke S., Conzelmann K.K. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly // *Journal of Virology*. – 2003. – Vol. 77. – P. 12074-12082.
4. Mebatsion T., Weiland F., Conzelmann K.K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G // *Journal of Virology*. – 1999. – Vol. 73. – P. 242-250.
5. Ameyama S., Toriumi H., Takahashi T., et al. Monoclonal Antibody #3-9-16 Recognizes One of the Two Isoforms of Rabies Virus Matrix Protein That Exposes Its N-Terminus on the Virion Surface // *Microbiology and Immunology*. – 2003. – Vol. 47, №9. – P. 639-651.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1982. – 479 с.
7. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceeding National Academic Science. USA*. – 1977. – Vol. 74. – P. 5463-5467.
8. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
10. Nakahara T., Toriumi H., Irie T., et al. Characterization of a slow-migrating component of the rabies virus matrix protein strongly associated with the viral glycoprotein // *Microbiology and Immunology*. – 2003. – Vol. 47. – P. 977-988.
11. Турсунов К., Бегалиева А., Инірбай Б. и др. Получение рекомбинантного иммуногенного домена нуклеопротеина вируса бешенства // *Биотехнология. Теория и практика*. – 2015. – №3. – С. 45-53.

REFERENCES

1. Hongtao K., Yinglin Q., Hualei W., et al. Chimeric Rabies Virus-Like Particles Containing Membrane-Anchored GM-CSF Enhances the Immune Response against Rabies Virus. *Viruses*, 2015, vol. 7, pp. 1134-1152. doi:10.3390/v7031134.
2. Finke S., Mueller-Waldeck R., Conzelmann K.K. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *Journal of General Virology*, 2003, vol. 84, pp. 1613-1621. doi: 10.1099/vir.0.19128-0.
3. Finke S., Conzelmann K.K. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *Journal of Virology*, 2003, vol. 77, pp. 12074-12082. doi: 10.1128/JVI.77.22.
4. Mebatsion T., Weiland F., Conzelmann K.K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *Journal of Virology*, 1999, vol. 73, pp. 242-250.
5. Ameyama S., Toriumi H., Takahashi T., et al. Monoclonal Antibody #3-9-16 Recognizes One of the Two Isoforms of Rabies Virus Matrix Protein That Exposes Its N-Terminus on the Virion Surface. *Microbiology and Immunology*, 2003, vol. 47, no. 9, pp. 639-651. PMID: 14584611.
6. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Molecular cloning*. Moscow, Mir, 1982, 479 p.

7. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding National Academic Science. USA*, 1977, vol. 74, pp. 5463-5467. PMID: 271968.
8. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, pp. 248-254. PMID: 942051.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680-685. PMID: 5432063.
10. Nakahara T., Toriumi H., Irie T., et al. Characterization of a slow-migrating component of the rabies virus matrix protein strongly associated with the viral glycoprotein. *Microbiology and Immunology*, 2003, vol. 47, pp. 977-988. PMID: 14695448.
11. Tursunov K., Begalieva A., Inirbay B., et al. Obtaining recombinant immunogenic domain of the rabies virus nucleoprotein. *Biotechnology. Theory and practice*, 2015, no. 3, pp. 45-53.

ҚҰТЫРУ ВИРУСТЫҢ РЕКОМБИНАНТТЫ МАТРИКС АҚУЫЗЫҢ АЛУ

Мұқантаев Қ.Н., Шустов А.В., Тұрсынов Қ.А., Інірбай Б., Әдіш Ж., Раманқұлов Е.М., Мұқанов Қ.Қ.

*Ұлттық биотехнология орталығы
Корғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан
lii@biocenter.kz*

ТҮЙІН

РНҚ-лы вирустардың матрикс ақуыздары вирустың негізгі құрылымдық компонент болып саналады және вирустың құрастыру процесіне қажет. Осындай вирус бөлшектерінің құрастырылуы матрикс ақуыздың нуклеокапсидпен байланыстырылу қабілеттілігімен негізделген. Осы қасиет вирустың биологиясында матрикс ақуыздың плазма мембранамен нуклеокапсидтің арасында көпір ретінде маңызды рөлің куәлік етеді. Вирустың негізгі құрамдас бөліктердің биологиялық қасиеттеріне арналған әдеби деректерді талдау және Республикада құтыру кең таралғаны деректерді талдау құтыру вирустың рекомбинантты матрикс антигенің алуға арналған зерттеудің қажеттілігін көрсетті. Қойылған мақсатқа қол жеткізу үшін генетикалық инженерия әдістерді қолдандық. Осы мақалада құтыру вирустың рекомбинантты матрикс ақуызды алу материалдары ұсынылған. Зерттеу нәтижесінде құтыру вирустың матрикс антигенің генің экспрессиялайтын генетикалық құрылымның дизайны өткізілді. De novo жағдайда ұзындығы 654 п.о. құтыру вирустың матриксты антигенің гені синтезделген. рЕТ32 экспрессиялайтын плазмидаларға алынған құтыру вирустың матриксты антигенің гені клондалған. Синтезделген гендің нуклеотид реттілігі генетикалық құрылымның құрастыруы дұрыстығын көрсетті. Құтыру вирустың рекомбинантты матриксты антигенді өндіретін *E. coli* штамдын микроағзалары алынды. Алынған штамм-продуценті өсіру жағдайлары өңделген. Электрофоретикалық талдау алынған штамм-продуцентің 41 кДа молекулалық салмағы ақуызды өндіретін көрсетті. Құтыру вирустың рекомбинантты матрикс антигенің бөлінуі және тазарту хаттамсы құрастырылды. Тышқан иммундау әдіспен және иммундалған тышқандардын сарысуларын иммуноферменттык әдіспен қолдана отырып құтыру вирустың рекомбинантты матрикс антигенің иммуногендық қасиеттері зерттелген.

Негізгі сөздер: құтыру, вирус, матрикс ақуыз, генетикалық құрастырылым, штамм-продуцент, рекомбинантты антигені.