

ПОЛУЧЕНИЕ И ОХАРАКТЕРИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЭПИТОПНЫХ АНТИГЕНОВ ЯЩУРА ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИ АКТУАЛЬНЫХ ДЛЯ КАЗАХСТАНА СЕРОТИПОВ O, A, ASIA-1

М.Ж. Калиева, А.Ж. Балтабекова, А.В. Шустов

Национальный центр биотехнологии, ул. Ш. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан
shustov@biocenter.kz

АБСТРАКТ

В Казахстане эпизоотическая ситуация по ящуру неблагоприятна. Для предотвращения циркуляции ящура в страну с гиперэндемичных территорий в Казахстане проводится обязательная вакцинация сельскохозяйственных животных в буферной зоне. Традиционно применяемые ящурные вакцины на основе инактивированного вирусного антигена морально устарели, и их применение сопровождается рядом проблем. Рекombинантная ящурная вакцина является объектом интенсивных исследований по причине безопасности, высокой экономической эффективности и совместимости с диагностическими DIVA-тестами. В данном исследовании описано создание рекомбинантных антигенов ящура эпизоотологически актуальных для Казахстана серотипов O, A, Asia-1. Полученные рекомбинантные антигены представляет собой сферические частицы (вирусоподобные частицы, ВПЧ), образованные регулярной пространственной укладкой белка-носителя (НВсАg). На поверхности ВПЧ экспонированы иммунодоминантные участки белков вириона вируса ящура VP1, VP2, VP3. Производство антигена в форме ВПЧ значительно увеличивает иммуногенность. Созданные антигены относятся к классу эпитопных антигенов. Рекombинантные антигены ящура произведены в бактериальной системе экспрессии и очищены до гомогенности с использованием ультрацентрифугирования в градиенте плотности и аффинной хроматографии. Продемонстрирована способность созданных эпитопных антигенов ящура индуцировать в ходе иммунизации экспериментальных животных появление антител, реагирующих с белком вириона VP1 вируса ящура. Описанная технология получения эпитопных антигенов в форме ВПЧ может быть использована для получения кандидатной вакцины.

Ключевые слова: ящур, вирус, антиген, рекомбинантный белок, вакцина, вирусоподобная частица.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT EPITOPE ANTIGENS OF THE FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS SEROTYPES O, A, ASIA-1 EPIZOOTICALLY IMPORTANT FOR KAZAKHSTAN

M.Zh. Kaliyeva, A.Zh. Baltabekova, A.V. Shustov

National center for biotechnology, 13/1 Valikhanov St., Astana, 010000, Kazakhstan
shustov@biocenter.kz

ABSTRACT

The epizootic situation with foot-and-mouth disease (FMD) in Kazakhstan has been unfavorable for years. Mandatory vaccination of farm animals is maintained in the buffer zone of Kazakhstan to prevent circulation of the disease from hyperendemic areas of South and Central Asia. Traditionally used FMD vaccines are based on inactivated virus antigen. Traditional vaccines are becoming obsolete in light of novel requirements of safety and performance. Recombinant FMD vaccine is a subject of intense research worldwide because of safety, high efficiency and compatibility with the DIVA-diagnostic tests. This study describes development of recombinant antigens of FMD virus of serotypes O, A, Asia-1. The resulting recombinant antigens present themselves as spherical particles (virus-like particles, VLPs) formed by a regular spatial assembly of a carrier protein (HBcAg). The VLPs present immunodominant regions of the FMD virion proteins VP1, VP2, VP3. Production of antigen in the form of VLPs significantly increases the immunogenicity. Described FMD antigens belong to a class of epitope antigens. The immunogenic particles are produced in a bacterial expression system and purified to homogeneity using density gradient ultracentrifugation and affinity chromatography. Immunization of laboratory animals with the recombinant antigens was shown to induce antibodies which react with VP1 protein

of FMD virion. The described technology for producing of epitope antigens in the form of VLPs can be used in development of a candidate vaccine.

Keywords: FMD, virus antigen, a recombinant protein, vaccine, virus-like particle.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – одна из самых контагиозных инфекций среди болезней, вызываемых вирусами. Ящур не заразен для человека, но быстро распространяется среди копытных животных, в связи с чем ящур представляет огромную угрозу для животноводства и является источником огромных экономических потерь для стран, где происходят вспышки этой болезни. В Евразии ящур гиперэндемичен в регионе от Ближнего Востока до Южной Азии. В Казахстане эпизоотическая ситуация по ящуру остается неблагоприятной в течение длительного периода [1]. Стратегия борьбы с ящуром в эндемичных регионах опирается на уничтожение инфицированных и контактных животных и на превентивную вакцинацию [2]. Южный Казахстан является буферной зоной, в которой обязательна вакцинация крупного рогатого скота (КРС) против ящура. Для вакцинации КРС против ящура во всех странах мира, где используется вакцинация, до сих пор применяют только вакцины, произведённые по традиционной технологии – инактивированные цельновирионные вакцины [3]. Традиционная технология ящурной вакцины предусматривает наработку вирусного антигена путём выращивания вируса ящура на культурах клеток, инактивацию возбудителя, получения препарата титрованного антигена в смеси с адъювантом (все цельновирионные ящурные вакцины используют адъюванты на масляной основе). Несмотря на то, что вакцины, изготавливаемые по традиционной технологии, широко используются, такие вакцины морально устарели, а недостатки традиционной технологии стали очевидны в свете новых возможностей, предоставляемых генетической инженерией.

Антиген для традиционных вакцин – инактивированный вирус ящура, наработка вируса проводится на высшем уровне биобезопасности (BSL–4), что создаёт постоянную угрозу высвобождения инфекционного материала в окружающую среду, и в ряде случаев такие события происходили [4]. Всегда существуют риск неполной инактивации возбудителя [5]. Традиционные ящурные вакцины требуют для достижения нужной иммуногенности сильных адъювантов на масляной основе. Готовые препараты нестабильны (срок хранения не превышает 1 года), что вынуждает ежегодно обновлять 100% запаса вакцины [6]. Массовая иммунизация КРС вакцинами с использованием инактивированного антигена неожиданно привела к новой проблеме для эпизоотологического надзора: у большего количества привитых животных появляются антитела к неструктурным антигенам ящура (NSP). Доля животных, серопозитивных на антитела к NSP, увеличивается с кратностью иммунизаций. Неструктурные антигены – белки, закодированные в геноме вируса, но не входящих в состав вириона. Антитела против NSP индуцируются у животных, инфицированных ящуром, и присутствуют у животных, перенесших ящур, но анти–NSP не должны обнаруживаться у животных после иммунизации очищенным инактивированным вирусом. В соответствии с этой доктриной животные, имеющие анти–NSP, считаются больными ящуром, переболевшими или носителями возбудителя, и должны быть уничтожены. Согласно правилам международного эпизоотического бюро (WOAH), международная торговля животными и продуктами животноводства, маркированными антителами к NSP ящура, запрещена. Причиной появления анти–NSP у вакцинированных, вероятнее всего, является примесь NSP в инактивированном ящурном антигене.

Современные генно-инженерные технологии предоставляют возможности для эффективного и безопасного производства антигенов, а также для создания принципиально новых антигенов с улучшенными свойствами, в том числе таких антигенов, которые не требуют использования адъювантов. В качестве новых технологий для иммунизации против ящура испытаны рекомбинантные антигены, синтетические пептиды, ДНК–вакцины, аттенуированные вирусы [6-10].

Для вируса ящура характерна большая антигенная вариабельность и молекулярное разнообразие геномов циркулирующих изолятов. Известно семь серотипов вируса ящура, причём разные серотипы не обладают свойством кросс-нейтрализации, то есть антитела против вируса одного серотипа не нейтрализуют вирусы других серотипов. В Казахстане выявлена циркуляция трёх серотипов вируса ящура (серотипов О, А и Asia-1) [1]. Данное обстоятельство означает необходимость разработки как минимум трёх моновалентных (серотип-специфических) рекомбинантных ящурных вакцин для защиты поголовья в Казахстане.

Вируснейтрализующие антигенные детерминанты имеются на трёх структурных белках вируса – VP1, VP2 и VP3. Известно, что иммунизация структурными белками вируса ящура, произведёнными в рекомбинантных системах экспрессии в форме отдельных субъединиц, не защищает от экспериментальной инфекции [7–10], что объясняется недостаточной выработкой вируснейтрализующих антител. Для создания прототипа будущей рекомбинантной вакцины против ящура необходимо увеличить выработку антител против вируснейтрализующих эпитопов, презентуемых в составе рекомбинантного антигена. Известно, что повышение иммуногенности антигенных детерминант может быть достигнуто посредством презентации последних в форме массивов эпитопов (*epitopearray*). В массиве эпитопов выбранный участок природного антигена (презентируемый эпитоп) представлен в виде множества копий, причём массив характеризуется регулярной пространственной укладкой и определённым фиксированным расстоянием между эпитопами. Эффективным способом получения антигенов, индуцирующих сильный и направленный против выбранного эпитопа гуморальный ответ, является презентация массива эпитопов на поверхности наноразмерных носителей. Часто используемым на практике носителем массивов эпитопов являются вирусоподобные частицы (ВПЧ) [11, 12]. ВПЧ значительно более иммуногенны по сравнению с отдельными белками по причине того, что профессиональные антиген-презентирующие клетки (АРС) имеют механизмы неспецифического (врождённого) иммунитета, активирующиеся в ответ на корпускулярные антигены. Молекулярные паттерны поверхности корпускулярных антигенов распознаются толл-подобными рецепторами, что приводит к активации АРС. Корпускулярные антигены способны активировать клетки-эффекторы гуморального ответа напрямую (без участия хелперной помощи Т-лимфоцитов), из-за того, что взаимодействие с массивом эпитопов приводит к кросс-сшивке В-клеточных рецепторов (BCR) на поверхности В-лимфоцитов и плазматических клеток [13, 14].

Среди белков-носителей гетерологических эпитопов, способных образовывать ВПЧ, наибольшую популярность получил коровий антиген вируса гепатита В (НВсAg), из-за небольшого собственного размера и высокой иммуногенности [15]. НВсAg образует частицы, морфологически и иммунологически подобные сердцевинам вирионов (капсидам) вируса гепатита В (НВV), которые имеют сферическую симметрию и присутствуют в двух формах, одна форма состоит из 120 димеров НВсAg (триангуляционное число T₄, диаметр ~34 нм), вторая форма состоит из 90 димеров НВсAg (T₃, диаметр ~30 нм). Молекула НВсAg содержит протяжённый центральный домен, который участвует в формировании шипа, выступающего на 6 нм над поверхностью ВПЧ. Вершина шипа (т.н. главный иммунодоминантный район) является предпочтительным местом для вставки В-клеточных эпитопов, потому что вставленные последовательности экспонируются на внешней поверхности ВПЧ [16-18].

В данной статье описано получение рекомбинантных эпитопных антигенов ящура в форме ВПЧ, образующихся из рекомбинантного белка в бактериальной системе экспрессии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ген, кодирующий НВсAg (подтип ауw), был получен методом синтеза *denovo* последовательностью, кодон-оптимизированной для экспрессии в *Escherichiacoli*. Ген

НВсАg использовали для получения трех других генов, кодирующих НВсАg с вставками эпитопных антигенов структурных белков вируса ящура VP1, VP2 и VP3 в главный иммунодоминантный район. К N-концам продуктов экспрессии были добавлены гексагистидиновые метки (6xHis) для того, чтобы обеспечить возможность использования металлоаффинной хроматографии. Генно-инженерные конструкции для белковой экспрессии были получены с использованием плазмиды pET22 (Novagen) в качестве экспрессионного вектора.

Экспрессия рекомбинантных белков и очистка ВПЧ

Культуры клеток *E.coli* штамма BL21(DE3), трансформированных экспрессионными плазмидами, нарабатывали в объёме 1 л. После достижения культурой оптической плотности $OD_{600}=0,8$ в среду инкубации добавляли химический индуктор IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Индукцию проводили в течение ночи (12-14 ч). Биомассу бактерий осаждали центрифугированием, клетки промывали один раз буфером HN (20 мМ HEPES, pH 7,5, 150 мМ NaCl). Лизис бактериальных клеток проводили с использованием лизоцима. Для этого суспензию бактерий инкубировали в течение 1 ч на льду в растворе состава 20 мМ HEPES, pH 7,5, 5 мМ ЭДТА, 0,1% Triton-X100, 20% сахараза, 1 мг/мл лизоцима, 10 мкг/мл ДНКазы I, 100 мкг/мл РНКазы, 0,2 мМ PMSF. Окончательного лизиса достигали путём обработки ультразвуком (7 пульсов по 30 сек с паузами по 1 мин). Суспензию осветляли путём низкоскоростного центрифугирования (7000 об/мин, 10 мин при 4°C) и осветлённый лизат использовали для выделения ВПЧ путём ультрацентрифугирования в градиентах сахаразы. Для разделения компонентов бактериальных клеток и выделения рекомбинантных антигенов использовали метод зонального ультрацентрифугирования (разделение по скорости седиментации) в градиенте плотности сахаразы. Все растворы сахаразы готовили на буфере HN. Чтобы подготовить ступенчатый градиент в пробирку объёмом 38,5 мл для ротора SW-28 (Beckman) наслаивали по 5,5 мл растворов сахаразы (w/w 60%, 50%, 40%, 30%, 20% и 10%) и затем наслаивали осветлённый лизат. Пробирки устанавливали в ротор и подвергали центрифугированию при 28000 об/мин в течение 3,5 ч при 20°C. По окончании ультрацентрифугирования содержимое пробирки разделяли на 14 фракций объёмом по 2,6 мл. Дальнейшую очистку антигенов выполняли с помощью хроматографии.

Металлоаффинная хроматография (IMAC)

Колонки для металлоаффинной хроматографии HisTrap HP (GE Healthcare) объёмом 1 мл или 5 мл уравнивали буфером HN. Препарат белков пропускали через колонку, несвязавшиеся белки вымывали, пропуская через колонку 3 объёма буфера HN. Колонку присоединяли к хроматографу АКТА Purifier 10. Белки, связавшиеся с металлоаффинным сорбентом, элюировали градиентом концентрации имидазола (20 мМ – 500 мМ). Профиль элюции регистрировали на длине волны 280 нм. Хроматографические пики собирали с использованием коллектора фракций Frac-950.

Электронная микроскопия и динамическое рассеяние света

Капли растворов рекомбинантных антигенов помещали на лист парафильма и опускали на них сеточку с формвар-карбоновым покрытием (TedPella, США). Сеточки затем переносили на капли 2% раствора фосфовольфрамовой кислоты pH 7,0. Сеточки просматривали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа LIBRA 120 (CarlZeiss) на увеличениях 30000-100000X. Размеры ВПЧ также измеряли с помощью метода динамического светорассеяния (DLS) с использованием прибора NanotracsWave (Microtrack).

Иммунизация мышей

Для иммунизации были использованы беспородные мыши в группах по 5 на каждый антиген. Базовые сыворотки собирали до иммунизации и объединяли. Схема иммунизации включала четыре подкожные (SC) инъекции: по 50 мкг на иммунизацию, первая доза в смеси с полным адъювантом Фрейнда, последующие дозы в PBS. Инъекции делали в 1-й, 7-

й, 14-й, и 28-й дни. На 42-й день после первой иммунизации из хвостовой вены брали кровь, получали сыворотку крови, сыворотки от разных животных в пределах группы объединяли.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА проводили по протоколу, описанному в [19], с модификациями. Антиген (5 мкг/мл) в 50 мМ бикарбонатном буфере pH 9,6 раскапывали в лунки 96-луночного планшета (Costar) и планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. PBST был использован в качестве промывочного буфера, а PBST с добавлением 1% BSA использовали в качестве блокирующего буфера и разбавителя для сыворотки. Серийные разведения сывороток (от 1:100 до 1:12800) вносили в лунки и инкубировали планшет в течение 1 ч при 37°C. После трех промывок в PBST, добавляли конъюгат анти-мышинных IgG с пероксидазой (Sigma, Cat# A9044) (1:10000). После 1 ч инкубации при 37°C планшет промывали 3 раза PBS и 3 раза водой. Жидкую субстратную систему с ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (Sigma, Cat# T0440) добавляли по инструкции производителя. Значения оптической плотности считывали при 450 нм после добавления стоп-реагента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания эпитопных антигенов ящура были использованы последовательности белков вириона VP1, VP2 и VP3 вирусов ящура трёх серотипов: О, А и Asia-1. Соответствующие последовательности были загружены из базы Genbank для прототипных штаммов серотипа О (O/TAW/2/99, Acc# AJ539137), серотипа А (A/IND40/00, Acc# NM854025), серотипа Asia-1 (Asia-1/IND/63/72, Acc# AY304994). Для клонирования в состав антигенов были выбраны последовательности иммунодоминантных антигенных детерминант белков, локализация которых на белках VP1, VP2 и VP3 известна [20]. Для каждого серотипа аминокислотные последовательности отдельных антигенных детерминант белков VP1, VP2 и VP3 были *insilico*объединены в единую последовательность полиэпитопного антигена (ПА). Полученные последовательности ПА подвергали обратной трансляции с целью *получения insilico* нуклеотидных последовательностей, кодирующих ПА. Фрагменты ДНК, несущие гены ПА ящура, были получены методом синтеза *denovo* из олигонуклеотидов. В ходе отдельной работы был получен методом синтеза *denovo* ген белка-носителя НВсАg. Полученный ген НВсАg был клонирован в составе генно-инженерной конструкции рЕТ22/НВсАg, предназначенной для бактериальной экспрессии белка НВсАg. Наконец, гены ПА ящура были встроены плазмиду рЕТ22/НВсАg таким образом, чтобы продукты экспрессии с полученных плазмид представляли собой НВсАg со вставками ПА ящура в главный иммунодоминантный район. Таким образом, были получены генно-инженерные конструкции рЕТ22/НВсАg_О, рЕТ22/НВсАg_А и рЕТ22/НВсАg_Asia-1, предназначенные для получения рекомбинантных антигенов ящура серотипов О, А и Asia-1 соответственно. Выбранная схема встройки эпитопов в главный иммунодоминантный район НВсАg призвана обеспечить продукцию антигенов в форме ВПЧ. Схематически дизайн рекомбинантных белков – продуктов экспрессии с вышеперечисленных плазмид представлен в таблице 1.

Таблица 1. Дизайн рекомбинантных антигенов ящура

Table 1. Design of recombinant FMD antigens

| Экспрессионная плазида Expression construct | Последовательность продукта экспрессии ¹ Scheme of the expression product |
|--|---|
| рЕТ22/НВсАg | НВсАg(1–149) ² |
| рЕТ22/НВсАg_О | НВсАg(1–78)–VP1(131–161)–VP2(70–80)–VP2(131–142)–VP3(52–73)–VP1(38–61)–VP1(131–161)–НВсАg(81–149) |
| рЕТ22/НВсАg_А | НВсАg(1–78)–VP1(131–160)–VP2(70–80)–VP2(131–142)– |

| | |
|--|---|
| | VP3(52–73)–VP1(38–61)–VP1(131–160)–HBcAg(81–149) |
| pET22/HBcAg_Asia–1 | HBcAg(1–78)–VP1(131–159)–VP2(70–80)–VP2(131–142)–VP3(52–72)–VP1(38–61)–VP1(131–159)–HBcAg(81–149) |
| Примечания: ¹ для последовательностей антигенных детерминант ящура все позиции указаны начиная с N–конца соответствующего белка вируса ящура; ² в данной работе использован не полноразмерный HBcAg длиной 183 а.о., а только домен, участвующий в сборке ВПЧ; таким образом, последовательность HBcAg заканчивается на Val в позиции 149. | |

Сравнение аминокислотных последовательностей белка-носителя и рекомбинантных эпитопных антигенов ящура представлено на рисунке 1.



HBcAg – коровий антиген вируса гепатита В (белок–носитель). HBcAg_O – рекомбинантный антиген ящура серотипа O; HBcAg_A – антиген серотипа A; HBcAg_ASIA1 – антиген серотипа Asia–1.

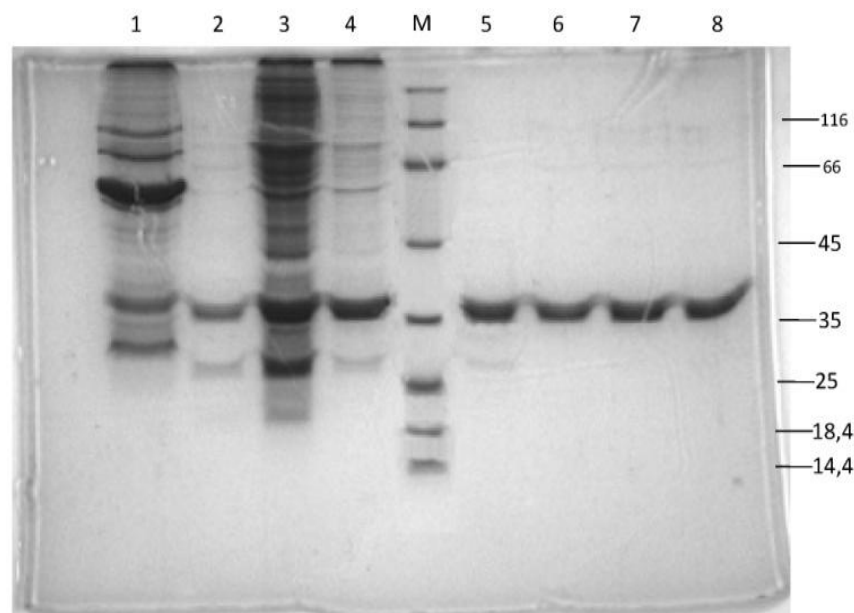
Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей белка–носителя и рекомбинантных эпитопных антигенов ящура

HBcAg – Hepatitis B virus core antigen B (carrier protein). HBcAg_O – recombinant antigen of FMD serotype O; HBcAg_A – antigen of serotype A; HBcAg_ASIA1 – antigen of serotype Asia-1.

Fig. 1. Alignment of amino acid sequences of the carrier protein and the recombinant epitope FMD antigens

Экспрессионными плазмидами pET22/HBcAg_O, pET22/HBcAg_A и pET22/HBcAg_Asia–1 трансформировали штамм *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen), который позволяет экспрессировать рекомбинантные белки, гены которых клонированы под контролем промотора РНК-полимеразы фага T7. Штаммы-продуценты рекомбинантных антигенов ящура серотипов O, A и Asia–1 депонированы в коллекции КазНИИ ППП с регистрационными номерами В–609, В–608 и В–610, соответственно.

В начале работ по наработке рекомбинантных антигенов была определена продукция рекомбинантных белков в растворимую (цитозольную) фракцию и в нерастворимую фракцию. Осветлённый лизат подвергали очистке с использованием металлохелатной хроматографии. Из осадка, полученного в ходе осветления лизата, элюировали белки путём инкубации осадка с буфером, содержащим высокие концентрации мочевины (20 мМ NEPER pH 7,5; 150 мМ NaCl; 20 мМ имидазол; 6М мочевина). Образцы, собранные в ходе данного эксперимента, исследовали с использованием электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (SDS–PAGE). Результаты эксперимента по очистке рекомбинантного антигена представлены на рисунке 2.



На одну дорожку наносили пробу, содержащую 10-50 мкг общего белка. Дорожки геля: 1– нефракционированный лизат биомассы штамма–продуцента; 2– раствор осадка, полученного после отделения растворимой фракции, в буфере содержащем 6М мочевины; 3 – растворимая (цитозольная) фракция лизата биомассы штамма–продуцента; 4 – “проскок” через колонку; 5-8 – фракции элюата, выходящего с колонки, соответствующие пику элюции белка; М – маркер молекулярных масс белков Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, #SM0431). Молекулярные массы бендов маркера приведены.

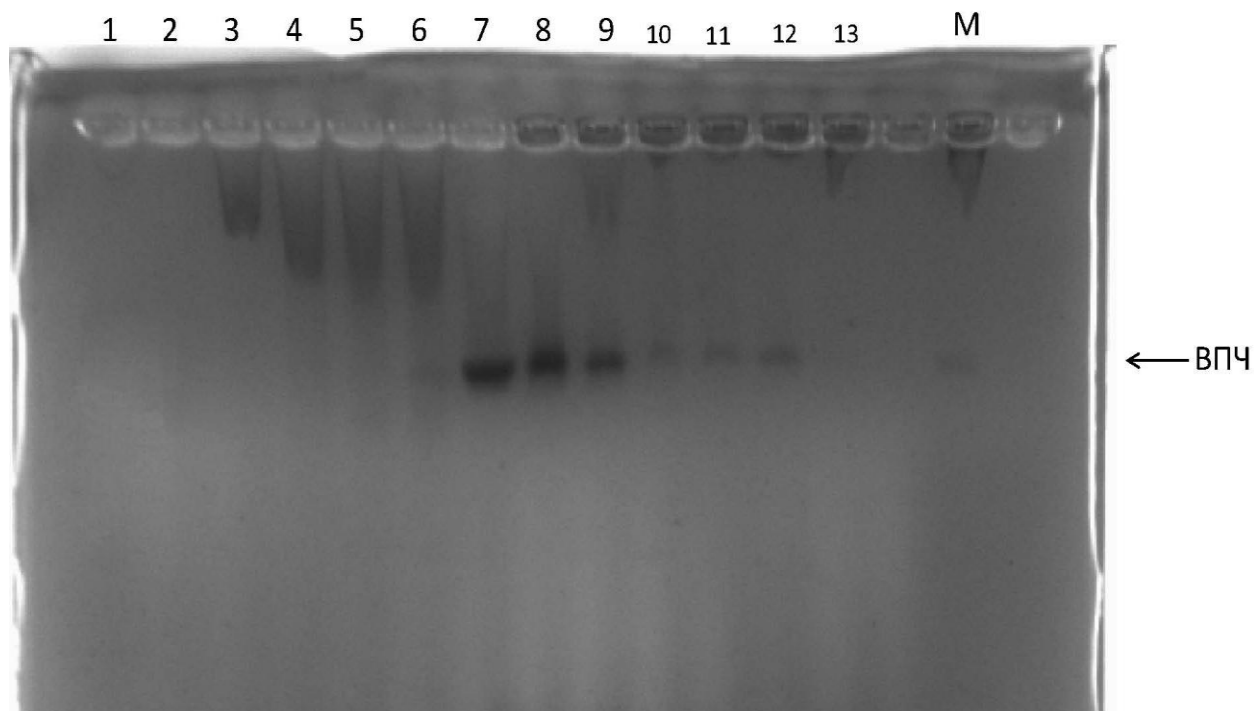
Рис. 2. Результаты эксперимента по оценке характера экспрессии и очистке рекомбинантного антигена ящура серотипа О

Amount of protein loaded into each lane is 10-50 mcg. Lanes: 1- unfractionated lysate of antigen-producing bacteria; 2- proteins solubilized into 6M urea from pellet obtained during clarification of lysate; 3 - soluble (cytosolic) fraction of antigen-producing bacteria; 4 – flowthrough, proteins not retained on column; 5-8 – proteins in elution buffer corresponding to the elution peak; M - Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, # SM0431). Molecular sizes shown.

Fig. 2. Results of the experiment to characterise the expression and purify recombinant FMD (serotype O) antigen

Металлоаффинная хроматография не позволяет отделить ВПЧ от отдельных субъединиц рекомбинантного белка из стохастических агрегатов субъединиц, поскольку все физико-химические формы антигена несут гексагистиридиновые метки. Мы обнаружили, что когда в качестве источника антигена для очистки металлохелатной хроматографией используется осветленный лизат клеток штамма-продуцента колонка достаточно быстро (за 5-10 циклов) теряет сорбционную ёмкость. Данное обстоятельство, вероятно, связано с прочной адсорбцией на сорбент бактериальных компонентов, являющихся примесями в лизате бактериальных клеток. Для того чтобы отделить ВПЧ от невключившихся в частицы полипептидов и удалить из препаратов примеси, ухудшающие работу металлоаффинной колонки, мы применили в качестве первого шага очистки ультрацентрифугирование в градиенте концентрации сахарозы. ВПЧ НВсАг имеют известную плотность (1,12 г/мл), которая соответствует концентрации сахарозы (w/w) 37,5%. Константа седиментации для частиц, образованных белком НВсАг, определена только в одном давнем исследовании, составляет 82,5S [21]. Кроме этого, опубликованы наблюдения, что частицы НВсАг оседают в растворе под действием центрифужных сил быстрее, чем бактериальные рибосомы (полная прокариотическая рибосома имеет коэффициент седиментации 70S) [22]. Данное обстоятельство используется в ходе зонального (скоростного) центрифугирования. В результате ультрацентрифугирования в подобранных условиях ВПЧ НВсАг оказываются в центральной части градиента (соответствующей концентрации сахарозы 30-40%), тогда как

субъединичные белки и низкомолекулярные компоненты остаются в верхней части градиента. Собранные фракции градиента исследовали методом электрофореза в геле нативной агарозы (NAGE). В ходе NAGE ВПЧ дают полосы (бенды) с чёткими границами, в отличие от белков в виде отдельных субъединиц и других примесных компонентов, которые в NAGE дают мазки. Результаты исследования в NAGE фракций градиента представлены на рисунке 3.



1-13 – фракции градиента. Возрастание номера фракции соответствует росту концентрации сахарозы. 7 и 8 соответствуют области градиента на границе 30% и 40% растворов сахарозы, в этой области градиента концентрируются ВПЧ (чёткие бенды ВПЧ маркированы стрелкой); М – (маркёр), ранее полученный препарат очищенных ВПЧ.

Рис. 3. Результаты электрофореза в геле нативной агарозы фракций градиента, полученного в ходе ультрацентрифугирования осветлённого лизата индуцированной биомассы штамма–производителя рекомбинантного антигена ящура

1-13 –fractions of sucrose gradient. Increase in number corresponds to higher sucrose concentration. Fractions 7 and 8 correspond to the border region between the 30% and 40% sucrose, this region of gradient contains concentrated VLPs (distinct bands are marked by an arrow); M – previouslyly obtained preparation of purified VLPs.

Fig. 3. Native gel electrophoresis of fractions obtained during gradient ultracentrifugation of clarified lysate of the antigen-producing recombinant strain

Фракции градиента, дающие чёткие бенды в NAGE, объединяли и использовали для очистки рекомбинантных антигенов с помощью металлоаффинной хроматографии. Выход рекомбинантных антигенов с 1 л индуцированной культуры приведён в таблице 2.

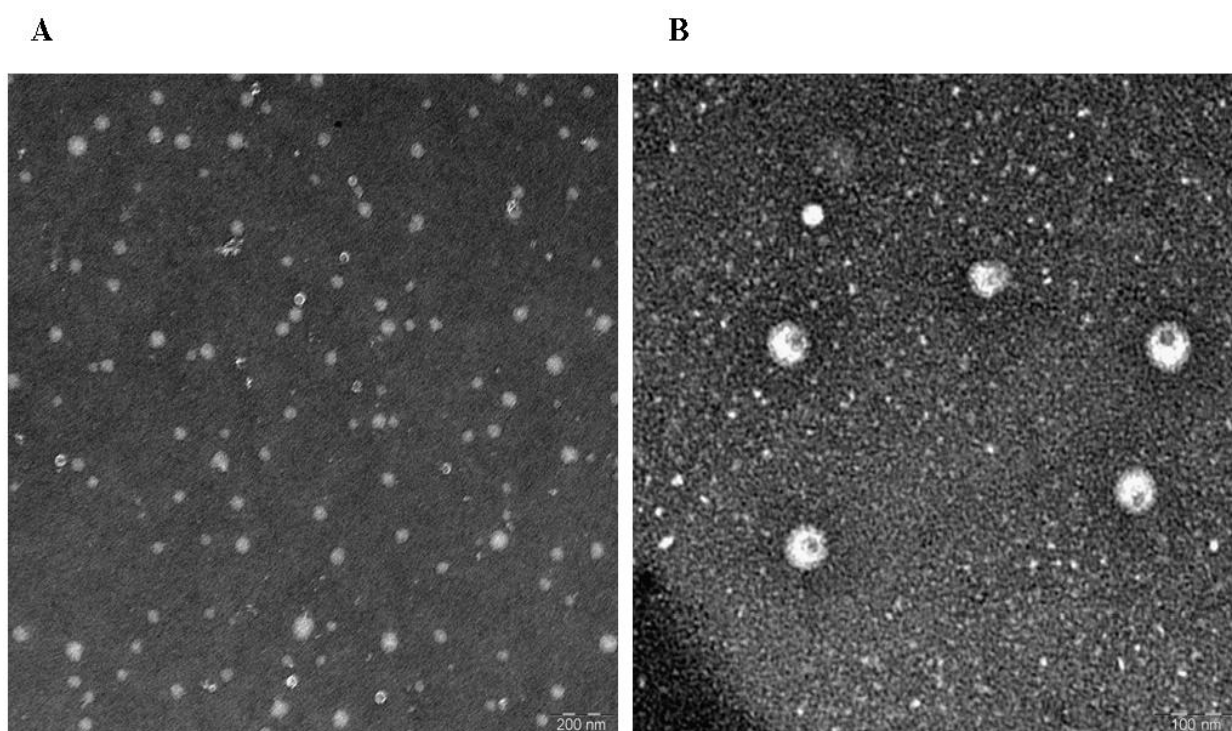
Таблица 2. Выход рекомбинантных антигенов с 1 л культуры

Table 2. Yields of recombinant antigens from 1L culture

| Экспрессионная плаزمида Expressionconstruct | Серотип Serotype | Количество наработанного антигена (мг) |
|--|---------------------|--|
| | | |

| | | Amount of purified antigen (mg) |
|--------------------|--------|---------------------------------|
| pET22/HBcAg_O | O | 9,6 |
| pET22/HBcAg_A | A | 11,0 |
| pET22/HBcAg_Asia-1 | Asia-1 | 7,3 |

Для подтверждения того, что рекомбинантные антигены ящура присутствуют в форме ВПЧ, были использованы трансмиссионная электронная микроскопия и измерение размеров частиц с помощью метода динамического светорассеяния. На рисунке 4 представлены электронные микрофотографии рекомбинантного антигена ящура серотипа О, на которых видны в большом количестве сферические частицы диаметром ~33 нм. Анализ образцов очищенного рекомбинантного антигена с помощью метода DLS показал, что в растворе присутствуют частицы со средним диаметром (MV) 34,3 нм. Таким образом, результаты измерения размеров частиц двумя методами хорошо совпадают и соответствуют литературным данным (30-34 нм).



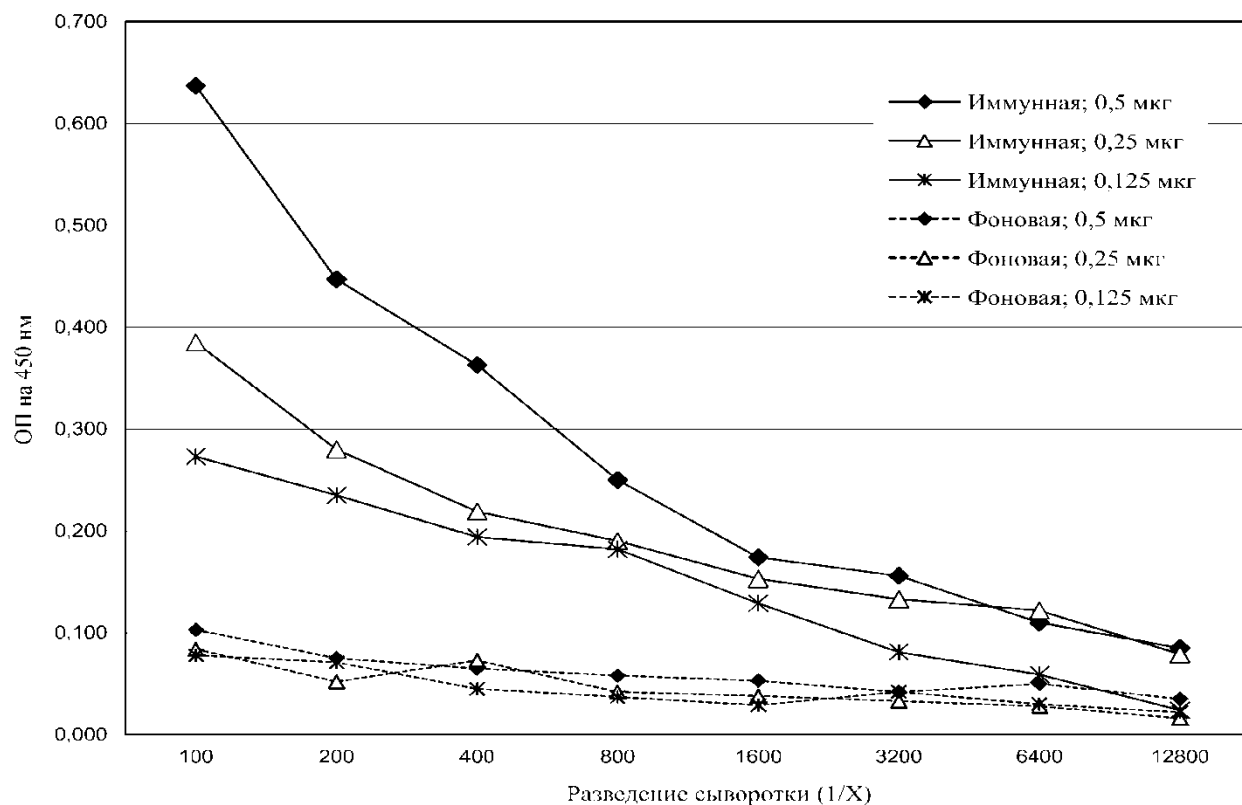
Масштаб шкалы в нижнем правом углу фотографии 200 нм (панель А) или 100 нм (панель В).

Рис. 4. Электронные микрофотографии ВПЧ в препарате рекомбинантного антигена

Scale at the lower right corners of photographs is 200 nm (panel A) or 100 nm (panel B).

Fig. 4. Electron micrographs of VLPs in the preparation of the recombinant antigen

Сыворотки мышей, иммунизированных рекомбинантными эпитопными антигенами HBcAg_O и HBcAg_Asia-1, исследовали в ИФА против рекомбинантного капсидного белка вируса ящура VP1 серотипов О и Asia-1. Рекомбинантный белок VP1 был любезно предоставлен К.Н. Мукантаевым (РГП “Национальный центр биотехнологии”). В ИФА использовали иммунные сыворотки и фоновую сыворотку. Результаты исследования серореактивности сывороток мышей, иммунизированных антигеном HBcAg_O, представлены на рисунке 5, иммунизированных антигеном HBcAg_Asia-1 – на рисунке 6.



Белок VP1 иммобилизован на полистироловом планшете в количестве 0,5 мкг, 0,25 мкг и 0,125 мкг на лунку. Исследована серореактивность иммунной сыворотки и фоновой сыворотки (фоновая сыворотка собрана от животных до иммунизации).

Рис. 5. Результаты ИФА: реакция антител, индуцированных иммунизацией эпитопным антигеном HBcAg_O, с рекомбинантным капсидным белком VP1 вируса ящура серотипа O

Recombinant protein VP1 was immobilized onto polystyrene plate in amount (per well) of 0.5 mcg, 0.25 mcg and 0.125 mcg. Seroreactivity was investigated of immune serum and baseline serum (e.g. serum collected from animals prior to immunization).

Fig. 5. Results of ELISA. Immunization with the epitope antigen HBcAg_O resulted in appearance of antibodies which react with a capsid protein VP1 (serotype O)

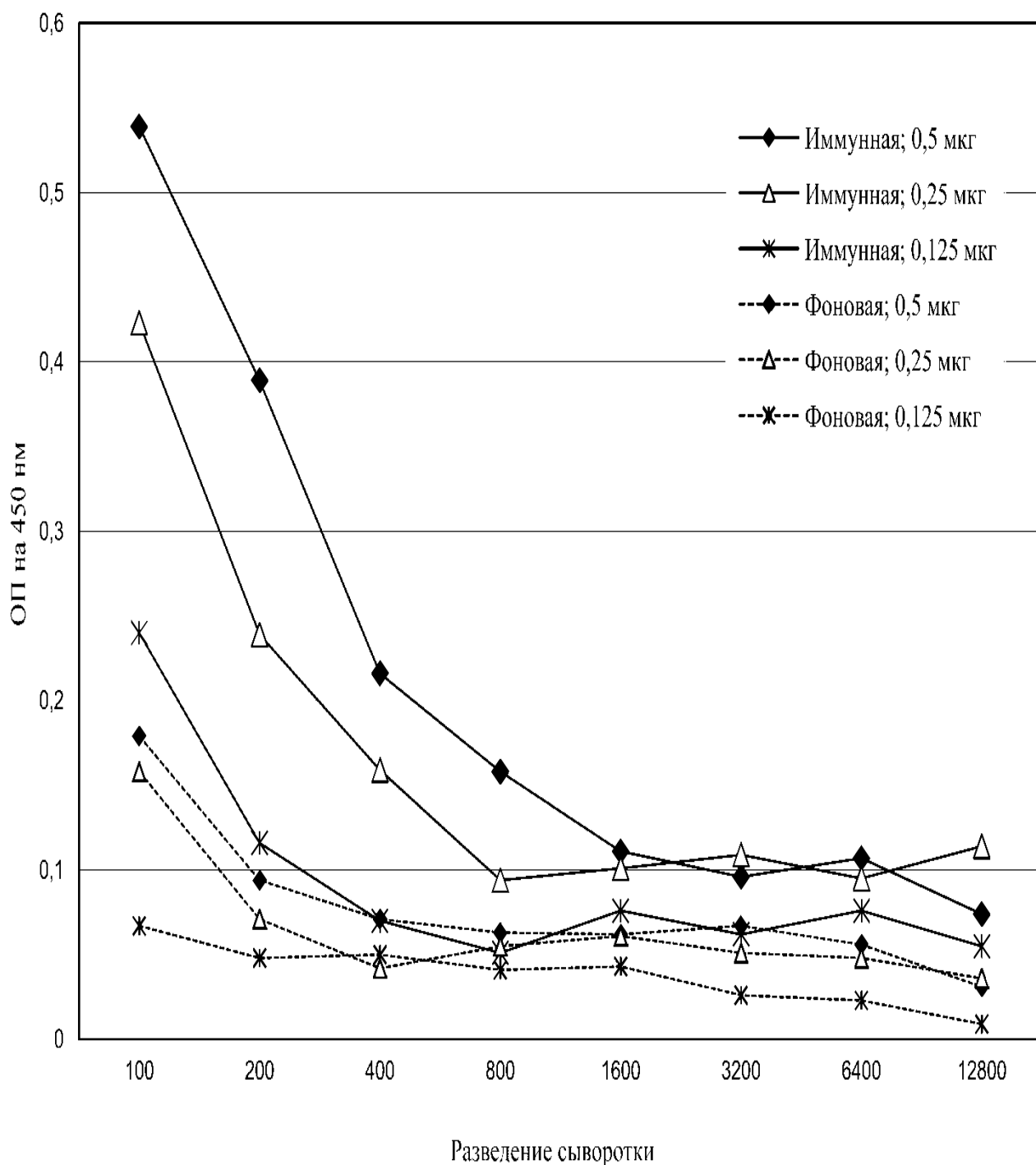


Рис. 6. Результаты ИФА: реакция антител, индуцированных иммунизацией эпитопным антигеном HBcAg_Asia-1, с рекомбинантным капсидным белком VP1 вируса ящура гомологичного серотипа

Fig. 6. Mice were immunized with the epitope antigen HBcAg_Asia-1. Reaction of the antibodies with a capsid protein VP1 (serotype Asia-1) was studied in ELISA.

ВходетитрованияантигенадляИФА (рекомбинантного белка VP1) было обнаружено, что наибольшие значения оптической плотности (ОП) в ИФА для одинаковых разведений сывороток соответствуют лункам, в которые VP1 адсорбирован в количестве 0,5 мкг на лунку. Результаты титрования сыворотки в ИФА против VP1 (0,5 мкг на лунку) использованы для определения титра специфических антител, который определяли как максимальное разведение сыворотки, при котором ОП>0,2. Титр иммунной сыворотки от мышей, получавших инъекции рекомбинантного эпитопного антигена ящура серотипа О

(НВсAg_O), составил 1:800. Титр иммунной сыворотки мышей, иммунизированных рекомбинантным эпитопным антигеном НВсAg_{Asia-1}, составил 1:400.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием методов генетической инженерии созданы рекомбинантные эпитопные антигены вируса ящура серотипов О, А, Asia-1. Рекомбинантный антиген представляет собой сферические частицы, образованные регулярной пространственной укладкой белка-носителя (НВсAg), на поверхности которых экспонированы иммунодоминантные участки белков вириона вируса ящура VP1, VP2, VP3. Рекомбинантный антиген производится в бактериальной системе экспрессии с выходом 7-11 мг с 1 л культуры. Получены электронные микрофотографии иммуногенных частиц (вирусоподобных частиц) в препаратах очищенных рекомбинантных антигенов ящура. Продемонстрирована способность созданных рекомбинантных антигенов ящура индуцировать в ходе иммунизации экспериментальных животных появление антител, реагирующих с белком VP1 вируса ящура.

Финансирование

Работа профинансирована в рамках проекта “Получение рекомбинантных антигенов VP1, VP2 и VP3 вируса ящура серотипов А, О, ASIA-1 для использования в качестве вакцины против ящура” в рамках Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» на 2012–2014 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сытник И.И. Эпизоотологический мониторинг ящура с использованием ГИС – технологий: автореф. ... канд. вет. наук: 12.11.10. – Астана: КазАТУ им. С. Сейфуллина, 2010. – 28 с.
2. Sobrino F., Saiz M., Jimenez-Clavero M.A., Nunez J.I., Rosas M.F., Baranowski E., Ley V. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat // *Vet. Res.* – 2001. – №32. – P. 1-30.
3. Rodriguez L.L., Grubman M.J. Foot and mouth disease virus vaccines // *Vaccine.* – 2009. – №27. – P. 90-94.
4. Grubman M.J., Baxt B. Foot-and-mouth disease // *Clin. Microbiol.Rev.* – 2004. – №17. – P. 465-493.
5. King A.M., Underwood B.O., McCahon D., Newman J.W., Brown F. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot and mouth disease in the UK // *Nature.* – 1981. – №293. – P. 479-480.
6. Cox S.J., Aggarwal N., Statham R.J., Barnett P.V. Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines // *Vaccine.* – 2003. – №21. – P. 1336-1347.
7. Park J.H., Kim S.J., Oem J.K., Lee K.N., Kim Y.J., Kye S.J., Park J.Y., Joo Y.S. Enhanced immune response with foot and mouth disease virus VP1 and interleukin-1 fusion genes // *J. Vet. Sci.* – 2006. – №7. – P.257-262.
8. Xiao C., Jin H., Hu Y., Kang Y., Wang J., Du X., Yang Y., She R., Wang B. Enhanced protective efficacy and reduced viral load of foot-and-mouth disease DNA vaccine with co-stimulatory molecules as the molecular adjuvants // *Antiviral Res.* – 2007. – №76. – P. 11-20.
9. Du Y., Dai J., Li Y., Li C., Qi J., Duan S., Jiang P. Immune responses of recombinant adenovirus co-expressing VP1 of foot-and-mouth disease virus and porcine interferon alpha in mice and guinea pigs // *Vet. Immunol.Immunopathol.* – 2008. – №15. – P. 274-283.

10. Niborski V., Li Y., Brennan F., Lane M., Torche A. M., Remond M., Bonneau M., Riffault S., Stirling C., Hutchings G., Takamatsu H., Barnett P., Charley B., Schwartz–Cornil I. Efficacy of particle–based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV // *Vaccine*. – 2006. – №24. – P. 7204-7213.

11. Crisci E., Barcena J., Montoya M. Virus–like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2012. – №148. – P. 211-225.

12. Kushnir N., Streatfield S.J., Yusibov V. Virus–like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development // *Vaccine*. – 2012. – №31. – P. 58-83.

13. Brun A., Barcena J., Blanco E., Borrego B., Dory D., Escribano J.M., Le Gall–Recule G., Ortego J., Dixon L.K. Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development // *Virus Res.* – 2011. – №157. – P. 1-12.

14. Fehr T., Skrastina D., Pumpens P., Zinkernagel R. M. T–cell–independent type I antibody response against B–cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – №95. – P. 9477-9481.

15. Whitacre D.C., Lee B.O., Milich D.R. Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms // *Expert Rev. Vaccines*. – 2009. – №8. – P. 1565-1573.

16. Crowther R.A., Kiselev N.A., Bottcher B., Berriman J.A., Borisova G.P., Ose V., Pumpens P. Three–dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy // *Cell*. – 1994. – №77. – P. 943-950.

17. Pumpens P., Grens E. HBV core particles as a carrier for B–cell/T–cell epitopes // *Intervirology*. – 2001. – №44. – P. 98-114.

18. Roose K., De Baets S., Schepens B., Saelens X. Hepatitis B core–based virus–like particles to present heterologous epitopes // *Expert Rev. Vaccines*. – 2013. – №12. – P. 183-198.

19. Ko Y.J., Jeoung H.Y., Lee H.S., Chang B.S., Hong S.M., Heo E.J., Lee K.N., Joo H.D., Kim S.M., Park J.H., Kweon C.H. A recombinant protein–based ELISA for detecting antibodies to foot–and–mouth disease virus serotype Asia 1 // *J. Virol. Methods*. – 2009. – №159(1). – P. 112-118.

20. Zhang Y.L., Guo Y.J., Wang K.Y., Lu K., Li K., Zhu Y., Sun S.H. Enhanced immunogenicity of modified hepatitis B virus core particle fused with multiepitopes of foot–and–mouth disease virus // *Scand. J. Immunol.* – 2007. – №65(4). – P. 320-328.

21. Hilditch C.M., Rogers L.J., Bishop D.H. Physicochemical analysis of the hepatitis B virus core antigen produced by a baculovirus expression vector // *J. Gen Virol.* – 1990. – №71(Pt 11). – P. 2755-2759.

22. Walker A., Skamel C., Nassal M. SplitCore: an exceptionally versatile viral nanoparticle for native whole protein display regardless of 3D structure // *Sci Rep*. – 2011. – №1(5). – P. 1-8.

REFERENCES

1. Sytnik I.I. Epizootologicheskiiy monitoring yashchura s ispolzovaniem GIS – technology: avtoref. kand. vet. nauk [Epizootologic monitoring of FMD using GIS – technologies. Candidate of vet.sci. thesis.]. Astana, 2010, 28p.

2. Sobrino F., Saiz M., Jimenez-Clavero M.A., Nunez J.I., Rosas M.F., Baranowski E., Ley V. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.*, 2001, no. 32, pp. 1-30.

3. Rodriguez L.L., Grubman M.J. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*, 2009, no.27, pp. 90-94.

4. Grubman M.J., Baxt B. Foot–and–mouth disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, no. 17, pp. 465–493.

5. King A.M., Underwood B.O., McCahon D., Newman J.W., Brown F. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot and mouth disease in the UK. *Nature*, 1981, no. 293, pp. 479-480.

6. Cox S.J., Aggarwal N., Statham R.J., Barnett P.V. Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. *Vaccine*, 2003, no. 21, pp. 1336-1347.
7. Park J.H., Kim S.J., Oem J.K., Lee K.N., Kim Y.J., Kye S.J., Park J.Y., Joo Y.S. Enhanced immune response with foot and mouth disease virus VP1 and interleukin-1 fusion genes. *J. Vet. Sci.*, 2006, no. 7, pp. 257-262.
8. Xiao C., Jin H., Hu Y., Kang Y., Wang J., Du X., Yang Y., She R., Wang B. Enhanced protective efficacy and reduced viral load of foot-and-mouth disease DNA vaccine with co-stimulatory molecules as the molecular adjuvants. *Antiviral Res.*, 2007, no. 76, pp. 11-20.
9. Du Y., Dai J., Li Y., Li C., Qi J., Duan S., Jiang P. Immune responses of recombinant adenovirus co-expressing VP1 of foot-and-mouth disease virus and porcine interferon alpha in mice and guinea pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2008, no. 15, pp. 274-283.
10. Niborski V., Li Y., Brennan F., Lane M., Torche A. M., Remond M., Bonneau M., Riffault S., Stirling C., Hutchings G., Takamatsu H., Barnett P., Charley B., Schwartz-Cornil I. Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV. *Vaccine*, 2006, no. 24, pp. 7204-7213.
11. Crisci E., Barcena J., Montoya M. Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2012, no. 148, pp. 211-225.
12. Kushnir N., Streatfield S. J., Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 2012, no. 31, pp. 58-83.
13. Brun A., Barcena J., Blanco E., Borrego B., Dory D., Escribano J.M., Le Gall-Recule G., Ortego J., Dixon L.K. Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus Res.*, 2011, no. 157, pp. 1-12.
14. Fehr T., Skrastina D., Pumpens P., Zinkernagel R. M. T-cell-independent type I antibody response against B-cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, no. 95, pp. 9477-9481.
15. Whitacre D.C., Lee B.O., Milich D.R. Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms. *Expert Rev. Vaccines*, 2009, no. 8, pp. 1565-1573.
16. Crowther R.A., Kiselev N.A., Bottcher B., Berriman J.A., Borisova G.P., Ose V., Pumpens P. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, 1994, no. 77, pp. 943-950.
17. Pumpens P., Grens E. HBV core particles as a carrier for B-cell/T-cell epitopes. *Intervirology*, 2001, no. 44, pp. 98-114.
18. Roose K., De Baets S., Schepens B., Saelens X. Hepatitis B core-based virus-like particles to present heterologous epitopes. *Expert Rev. Vaccines*, 2013, no. 12, pp. 183-198.
19. Ko Y. J., Jeoung H. Y., Lee H. S., Chang B. S., Hong S. M., Heo E. J., Lee K. N., Joo H. D., Kim S. M., Park J. H., Kweon C. H. A recombinant protein-based ELISA for detecting antibodies to foot-and-mouth disease virus serotype Asia 1. *J. Virol. Methods*, 2009, no. 159(1), pp. 112-118.
20. Zhang Y.L., Guo Y.J., Wang K.Y., Lu K., Li K., Zhu Y., Sun S.H. Enhanced immunogenicity of modified hepatitis B virus core particle fused with multiepitopes of foot-and-mouth disease virus. *Scand. J. Immunol.*, 2007, no. 65(4), pp. 320-328.
21. Hilditch C.M., Rogers L.J., Bishop D.H. Physicochemical analysis of the hepatitis B virus core antigen produced by abaculovirus expression vector. *J Gen Virol.*, 1990, no. 71(Pt 11), pp. 2755-2759.
22. Walker A., Skamel C., Nassal M. SplitCore: an exceptionally versatile viral nanoparticle for native whole protein display regardless of 3D structure. *Sci Rep.*, 2011, no. 1(5), pp. 1-8.

ТУЙН

Қазақстанда аусыл бойынша эпизоотикалық жағдай қолайсыз. Елге гиперэндемиялық аумақтардан аусылдың таралуының алдын алу үшін Қазақстанда аралық аймақта ауыл шаруашылығы малдарының міндетті вакцинациясы жүргізіледі. Дәстүрлі қолданылатын инактивтелген вирус антигені негізіндегі аусыл вакциналары моральдық жағынан ескірді және олардың қолданылуымен бірқатар проблемалар ілесе жүреді. Рекомбинантты аусыл вакцинасы қауіпсіздігі, жоғары экономикалық тиімділігі және диагностикалық DIVA-тесттерімен үйлесімділігі себебінен қарқынды зерттеулер объектісі болып табылады. Берілген зерттеуде Қазақстан үшін эпизоотологиялы өзекті аусылдың рекомбинантты антигендерінің О, А, Asia-1 серотиптерінің жасалуы сипатталған. Алынған рекомбинантты антигендер тасымалдаушы-ақуыздың (НВсAg) тұрақты кеңістікті құрылымымен түзілген сфералық бөлшектер (вирустәрізді бөлшектер, ВТБ) болып табылады. ВТБ жоғарғы қабатында VP1, VP2, VP3 аусыл вирусы вирионы ақуыздарының иммунодоминантты учаскелері орналасқан. Антигеннің ВТБ түрінде өндірілуі иммуногенділікті айтарлықтай арттырады. Жасалған антигендер эпитоптық антигендер класына жатады. Аусылдың рекомбинантты антигендері бактериалды экспрессия жүйесінде өндірілді және гомогенділікке дейін тығыздық градиентінде ультрацентрифугалауды және аффинді хроматографияны пайдалану арқылы тазаланды. Аусылдың жасалған эпитоптық антигендерінің тәжірибелік жануарларды иммунизациялау барысында ауыл вирусының VP1 вирионы ақуызымен әрекеттесетін антиденелердің пайда болуын индукциялайтын қабілеттіліктері көрсетілді. Эпитоптық антигендерді ВТБ түрінде алудың сипатталған технологиясы кандидаттық вакцина алу үшін пайдаланылуы мүмкін.

Кілтті сөздер: аусыл, вирус, антиген, рекомбинантты ақуыз, вакцина, вирус тәрізді бөлшек.