

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-191

**РАЗРАБОТКА ВОСПРОИЗВОДИМОЙ СИСТЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ  
РАСТВОРИМОГО БЕЛКА E ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА****DEVELOPMENT OF A REPRODUCIBLE SYSTEM FOR OBTAINING  
SOLUBLE PROTEIN E OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS**А. А. Красильникова<sup>1,2</sup>, М. С. Додина<sup>1</sup>, Л. И. Козловская<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Федеральный научный центр исследований

и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РоссииА. А. Krasilnikova<sup>1,2</sup>, М. S. Dodina<sup>1</sup>, L. I. Kozlovskaya<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow<sup>2</sup>Sechenov First Moscow State Medical University

✉ kras2048@gmail.com

**Аннотация**

Был получен белок E оболочки вируса клещевого энцефалита методом коэкспрессии с шаперонами в клетках *E. coli* в агрегированной и частично растворимой формах. Были подобраны условия очистки белка для увеличения его количества. По результатам ИФА белок взаимодействовал с антителами, следовательно, он находился в нативной конформации.

**Abstract**

Envelope protein E of tick-borne encephalitis virus was obtained by coexpression with chaperones in *E. coli* in an aggregated and partially soluble forms. Conditions were optimized for protein purification in order to increase protein yield. According to ELISA's results, protein interacted with antibodies, hence it was in its native conformation.

Клещевой энцефалит (КЭ) является наиболее распространенным вирусным заболеванием, передаваемым клещами, в Европе и Азии. Из-за изменения климата область распространения клещей, переносящих вирус клещевого энцефалита (*Orthoflavivirus encephalitis*, ВКЭ), расширяется. В последние годы количество случаев заболевания клещевым энцефалитом в неэндемичных регионах увеличилось [1].

В мире отсутствуют одобренные препараты для лечения КЭ [2], поэтому поиск противовирусных соединений становится особенно важным. Одной из перспективных мишеней противовирусных препаратов является белок E ВКЭ, который играет ключевую роль во взаимодействии вируса с поверхностными рецепторами клеток. Получение рекомбинантного белка E в растворимой форме затруднено из-за его склонности к деградации и агрегации при экспрессии. Поэтому целью данного исследования является получение растворимого белка sE (домены DI-DIII белка E), а также подбор наиболее оптимальных условий, при которых выход белка будет наибольшим.

Плазмидную конструкцию, кодирующую белок, получали методом молекулярного клонирования. Далее плазмиду трансформировали в клетки *E. coli* штамм BL21(DE3), в которых проводили экспрессию.

При экспрессии белок подвергался протеазной деградации до коротких пептидов вследствие его неправильного фолдинга, что подтверждалось отсутствием сигналов на ожидаемой массе белка 47 кДа при вестерн-блот-анализе образцов клеточного осадка и супернатанта. Для преодоления проблемы мисфолдинга была проведена коэкспрессия белка с шаперонами. Экспрессию шаперонов осуществляли при помощи коммерческого набора Chaperone Plasmid Set (Takara Bio), содержавшего несколько плазмид, кодирующих разные группы шаперонов (dnaK-dnaJ-grpE, groES-groEL, groES-groEL-tig, tig). Вестерн-блот-анализ фракций клеточного осадка и супернатанта, полученных после коэкспрессии белка с каждой системой шаперонов, продемонстрировал, что только коэкспрессия с шаперонами dnaK-dnaJ-grpE и groES-groEL способствовала не только успешной экспрессии белка, но также его частичному переходу в растворимую форму из-за наличия сигнала, соответствующего массе белка, не только в клеточном осадке (агрегированный белок), но и в супернатанте.

Далее подбирали оптимальные условия коэкспрессии и очищали белок из супернатанта при помощи металл-хелатной аффинной хроматографии. Хотя система коэкспрессии с шаперонами позволила получить белок sE сразу в растворимой форме, количество продукта после очистки было небольшим. Поэтому было решено

выделить белок из телец включения, содержащихся в клеточном осадке, чтобы определить, какой метод обеспечивает наибольший выход белка в активной форме. Белок из телец включения получали двумя способами: солюбилизацией телец включения в 8М растворе мочевины с последующими рефолдингом методом диализа и хроматографической очисткой; солюбилизацией телец с последующими параллельными рефолдингом и очисткой на хроматографической колонке.

По количеству белка в зависимости от метода выделения (см. таблицу) был сделан вывод, что метод солюбилизации белка из телец включения с рефолдингом на колонке является наиболее предпочтительным для получения белка в необходимом количестве.

#### Количество белка на 1 л культуры в зависимости от метода выделения

Метод выделения	Из супернатанта	Из телец включения с рефолдингом на колонке	Из телец включения с диализом
Количество белка на 1 л культуры, мг	0,017	0,285	0,15

Оценку взаимодействия белка, полученного методом рефолдинга на колонке, с антителами проводили при помощи иммуноферментного анализа с использованием мышинных сывороток крови, содержащих антитела к клещевому энцефалиту. Для исследования белок брали в трех концентрациях: 10; 35 и 70 мкг/мл. По результатам значений оптической плотности в лунках при длине волны 450 нм был сделан вывод, что белок находится в своей нативной конформации и даже в минимальной концентрации (10 мкг/мл) успешно взаимодействует с антителами.

В результате исследования была создана воспроизводимая система получения белка Е вируса клещевого энцефалита в растворимой форме. В дальнейшем полученный белок будет использован для тестирования библиотек ингибиторов и биофизического анализа методами поверхностного плазмонного резонанса и кристаллографии.

#### Литература

1. Worku D. A. Tick-Borne Encephalitis (TBE): From Tick to Pathology // J. Clin. Med. 2023. Vol. 12 (21). P. 6859.
2. Ruzek D. et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines // Antiviral Res. 2019. Vol. 164. P. 23–51.