

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-229

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА NS1
ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА*****CHARACTERIZATION OF THE ANTIGENIC PROPERTIES OF THE RECOMBINANT NS1
PROTEIN OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS**

Н. Н. Голосова, Я. А. Хлусевич, Б. И. Кравчук, А. Л. Матвеев, Л. А. Емельянова, Н. В. Тикунова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

N. N. Golosova, Ya. A. Khlusevich, B. I. Kravchuk, A. L. Matveev, L. A. Emelyanova, N. V. Tikunova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ n.golosova@g.nsu.ru

Аннотация

Известно, что гликопротеин NS1 играет важную роль в патологии клещевого вирусного энцефалита (КЭ), а в крови пациентов с клещевым энцефалитом обнаруживаются NS1-специфические антитела. В данной работе белок NS1 вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) был получен в клетках HEK 293. Полученный рекомбинантный белок NS1 ВКЭ проявлял иммунологические свойства, сходные с нативным белком NS1.

Abstract

There is evidence that NS1 glycoprotein plays an important role in the pathology of tick-borne encephalitis (TBE) and NS1-specific antibodies are detected in the blood of patients with TBE. In this study, TBEV NS1 protein was produced in HEK 293 cells. Obtained protein showed immunological properties similar to the native NS1 protein.

Одноцепочечный (+)РНК-вирус *Orthoflavivirus encephalitis*, более известный как вирус клещевого энцефалита, передается при укусе нескольких видов иксодовых клещей. Ген NS1 кодирует один из семи неструктурных белков ВКЭ, длина белка NS1 составляет 352 а. о, а молекулярная масса зависит от его гликозилирования и составляет около 46–55 кДа. Несмотря на высокую идентичность генов, кодирующих гликопротеины NS1, между всеми флавивирусами, эпитопные структуры этих белков разнообразны. NS1 существует в нескольких олигомерных формах и обнаруживается в различных клеточных компартментах. Внутриклеточный NS1 ко-локализуется с дцРНК и другими компонентами комплекса репликации вируса. Секретируемый и связанный с клеточной поверхностью NS1 обладает высокой иммуногенностью. Было показано, что NS1 флавивирусов, переносимых комарами, участвует в нарушении проницаемости эндотелия сосудов, легких и мозга. Кроме того, NS1 этих вирусов может ингибировать продукцию интерферонов, подавляя противовирусный иммунитет, может активировать комплемент, чтобы вызвать комплемент-зависимую цитотоксичность в эндотелиальных клетках. На сегодняшний день нет данных о роли NS1 ВКЭ в патогенезе КЭ, хотя известно, что иммунизация мышей NS1 ВКЭ приводит к формированию протективного иммунитета.

Для получения рекомбинантного белка NS1 была использована ранее сконструированная плазида pSB-NS1-sof, содержащая ген, кодирующий NS1 ВКЭ. Плазидами pSB-NS1-sof и pSB100x были ко-трансформированы клетки HEK 293. Через 48 ч после трансфекции с помощью клеточного сортера SH800S была получена GFP-положительная популяция клеток. Отдельные клоны были получены методом предельных разведений. Продуктивность полученных клонов оценивали с помощью проточного цитофлуориметра Novocyte по интенсивности сигнала GFP.

Для наработки рекомбинантного NS1 был использован клон-продуцент 293/TBEV-NS1 с наибольшим уровнем экспрессии GFP. Рекомбинантный белок нарабатывали в 100 мл среды, выделяли из культуральной жидкости с помощью металлохелатной хроматографии на Ni-NTA агарозе и диализовали против натрий-фосфатного буфера. Выход рекомбинантного NS1 составил около 10 мг с 1 л культуральной жидкости.

Электрофоретический анализ очищенного рекомбинантного NS1 в 12%-м ПААГ показал высокую степень чистоты и гомогенности полученного препарата белка. Молекулярная масса очищенного белка NS1 соответствует теоретически предсказанной — 45 кДа.

* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 22-74-10103).

© Н. Н. Голосова, Я. А. Хлусевич, Б. И. Кравчук, А. Л. Матвеев, Л. А. Емельянова, Н. В. Тикунова, 2024

Корректность фолдинга рекомбинантного белка NS1 исследовали с помощью иммуноферментного и вестерн-блот-анализа с использованием моноклональных антител NS1-1.3, NS1-1.6, NS1-2.299, NS1-2.290, NS1-2.44 против вирусного NS1 белка ВКЭ, полученных ранее с использованием нативного NS1 белка и иммунной асцитной жидкости. В качестве отрицательного контроля использовали мышинное антитело 3G11 против бета-глюкана. Было показано, что антитела NS1-1.3, NS1-1.6, NS1-2.299, NS1-2.290, NS1-2.44 и иммунная асцитная жидкость выявляют белок NS1 как в ИФА, так и в вестерн-блот-анализе, что может свидетельствовать о его корректном фолдинге.

Таким образом, нами был получен эукариотический штамм-продуцент белка NS1 ВКЭ и очищенный препарат этого белка. С использованием специфических моноклональных антител и иммунной асцитной жидкости было показано, что наш полученный белок NS1 имеет корректный фолдинг и может быть использован для дальнейшего изучения роли этого белка в патогенезе клещевого энцефалита.