

Клонирование и экспрессия в *E. coli* рекомбинантного белка VP1 вируса инфекционной анемии цыплят

М.П. Грудинин¹, кандидат биологических наук, руководитель отдела биотехнологии, **А.Б. Комиссаров**¹, зав. лабораторией молекулярной вирусологии, **А.З. Гусейнова**, лаборант-исследователь лаборатории генной инженерии и экспрессии рекомбинантных белков, **А.А. Шалджян**¹, лаборант-исследователь лаборатории генной инженерии и экспрессии рекомбинантных белков, **Я.А. Забродская**¹, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник лаборатории системной вирусологии, **Д.Л. Жук**³, магистр ветеринарных наук, **А.С. Алиев**³, доктор ветеринарных наук, профессор, руководитель отдела

¹ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова 15/17).

²УО Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия (210026, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. 1-я Доватора 7/11).

³ООО «Биовет-К» (109382, Москва, Егорьевский пр-д, 2А стр.6).

Цель исследования. Получить рекомбинантный белок VP1 вируса инфекционной анемии цыплят (ИАЦ), способный специфически выявлять антитела к вирусу ИАЦ в сыворотках крови больных кур.

Материалы и методы. Клонирование фрагмента гена VP1 вируса инфекционной анемии цыплят проводили в экспрессионные плазмиды pET15b и pGEX-3T в рамках считывания полигистидиновой последовательности и глутатион-S-трансферазы, соответственно. Экспрессированные в штаммах *E. coli* Rosetta(DE3) рекомбинантные белки 6HIS-ΔVP1 и GST-ΔVP1 были очищены методом металл-аффинной хроматографии. Аминокислотную последовательность рекомбинантных белков подтверждали методом масс-спектрометрии. Специфичность взаимодействия рекомбинантных белков с поликлональными антителами определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Способность рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1 к выявлению антител в полевых и сыворотках крови SPF-цыплят оценивали методом непрямого ИФА. Для контроля специфичности антигена использовали иммунные сыворотки птиц к вирусам инфекционного бронхита, Ньюкаслской болезни, инфекционного ларинготрахеита, аденовирусной инфекции, *Mycoplasma gallisepticum*, а также отрицательную сыворотку крови кур. **Результаты.** Был получен рекомбинантный белок VP1 вируса ИАЦ, содержащий полигистидиновый тэг (6HIS-ΔVP1). Было показано, что данный рекомбинантный белок способен специфически выявлять антитела к вирусу ИАЦ в сыворотках крови кур.

Заключение. Полученный рекомбинантный белок 6HIS-ΔVP1 может быть использован для выявления антител к вирусу ИАЦ в сыворотке крови больных кур, а также может быть рассмотрен как потенциальный компонент вакцин против данного вируса.

Ключевые слова: клонирование, экспрессия, штаммы *E. coli*, рекомбинантный белок VP1, вирус инфекционной анемии, СПФ-цыплят, антигенная активность, ИФА.

Generation and characterization of the VP1 recombinant protein of the chicken anemia virus

M.P. Grudin¹, the Head of the Biotechnology Department, Ph.D. in Biol. Science (Virology), **A.B. Komissarov**¹, the Head of the Molecular virology Lab, **A.Z. Guseynova**¹, assistant-researcher of the Genetic Engineering and Recombinant Protein Expression Lab, **A.A. Shaldzhyan**¹, assistant-researcher of the Genetic Engineering and Recombinant Protein Expression Lab, **Y.A. Zabrodskaya**¹, researcher of the Systemic Virology Lab, Ph.D. in Physics and Math Science (Biophysics), **D.L. Zhuk**², Master of Veterinary Sciences, **A.S. Aliev**³, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of the Department

¹Smorodintsev Research Institute of Influenza Ministry of Healthcare of the Russian Federation (197376 Saint-Petersburg, prof. Popov street, 15/17)

²Vitebsk State Academy of the Order of the «Badge of Honor» (210026, Republic of Belarus, Vitebsk, 1st Dovator street 7/11)

³LLC (limited liability company) «Biovet-K LLC» (109382, Moscow, Egorjevsky pr-d, 2A-6)

The aim of this study is to obtain a VP1 recombinant protein of the chicken anemia virus, capable of specifically detecting antibodies in the blood sera of sick chickens.

Materials and methods. Cloning of a fragment of the VP1 gene of an infectious anemia virus of chickens was performed in the expression plasmids pET15b and pGEX-3T in the context of reading the polyhistidine sequence and glutathione-S-transferase, respectively. The recombinant proteins 6HIS-ΔVP1 and GST-ΔVP1 expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) strains were purified by metal affinity chromatography. Amino acid sequence of recombinant proteins was confirmed by mass spectrometry. The specificity of the interaction of recombinant proteins with polyclonal antibodies was determined by

ELISA. The ability of the recombinant 6HIS-ΔVP1 protein to detect antibodies in field and blood sera of SPF chickens was evaluated by indirect ELISA. To control the specificity of the antigen, the immune sera of birds for viruses of infectious bronchitis, Newcastle disease, infectious laryngotracheitis, adenoviral infection, *Mycoplasma gallisepticum*, and negative serum of chickens were used.

Results. The recombinant VP1 protein of chicken anemia virus containing a polyhistidine tag (6HIS-ΔVP1) was obtained. It was shown that this recombinant protein is able to specifically detect antibodies in the blood sera of sick chickens.

Conclusion. The obtained recombinant protein 6HIS-ΔVP1 can be used to detect antibodies to the chicken anemia virus in the serum of sick chickens, and can also be considered as a potential component of vaccines against this virus.

Keywords: cloning, expression, *E. coli* strains, recombinant protein VP1, infectious anemia virus, SPF chickens, antigenic activity, ELISA.

Сокращения: а.о. — аминокислотные остатки, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИАЦ — инфекционная анемия цыплят, ИФА — иммуноферментный анализ, ОП — оптическая плотность, ПАВ — поверхностно-активные вещества, ФМСФ — фенилметилсульфанил фторид, ФС — фосфатно-солевой, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, IPTG — isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид), NCBI — National Center for Biotechnology Information (Национальный центр биотехнологической информации), SPF — specific pathogen free (свободные от патогенных контаминантов)

Введение

Возбудитель ИАЦ играет важную роль в инфекционной патологии птиц: активно размножаясь в гемоцитобластах костного мозга и предшественниках Т-лимфоцитов, вирус вызывает их гибель и развитие иммунодефицитного состояния [2, 4]. У переболевшей птицы создаются условия для возникновения вторичных инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами [20].

Вирус ИАЦ относится к роду *Gyrovirus* семейства *Circoviridae*. Вирионы циркувирусов — икосаэдрические частицы диаметром 16...25 нм. Капсид включает в себя 32 капсомера. Геном вируса ИАЦ представляет собой кольцевую одноцепочечную ДНК длиной около 2 300 нуклеотидов и кодирует три частично перекрывающихся рамки считывания (ORF1, ORF2 и ORF3). Основной структурный белок вириона VP1 (51 кДа) закодирован в ORF1 (1347 п.о.) [17, 19]. Именно этот фрагмент генома, включающий ORF1, чаще всего является объектом секвенирования и молекулярно-генетического анализа. Анализ ДНК различных штаммов, выделенных в разных регионах мира, показал, что идентичность нуклеотидных последовательностей составляет более 94 % [3, 5, 13, 14]. Это подтверждает наблюдение McNulty [11, 12] о том, что все известные изоляты относятся к одному серотипу. Капсидный белок VP1 является одним из белковых компонентов вириона, пригодных для разработки вакцинных и диагностических препаратов [15, 18]. В ряде работ показана возможность экспрессии генов вируса ИАЦ в клетках *E. coli*, а белки, полученные подобным образом, обладают выраженной антигенной и иммуногенной активностью [7, 16]. Применение полученного в прокариотической системе экспрессии генов рекомбинантного нуклеокапсидного белка VP1 повысит специфичность и чувствительность метода ИФА, используемого для выявления специфических антител.

Цель работы

Получить прокариотическую систему экспрессии гена VP1 вируса ИАЦ, оптимизировать условия экспрессии и очистки целевого рекомбинантного белка.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и плазмиды. Для получения продуцентов структурного белка VP1 вируса ИАЦ последовательность фрагмента гена VP1 штамма «ИК-4» вируса ИАЦ, кодирующая фрагмент белка VP1 вируса ИАЦ (со 130 по 450 а.к.) была оптимизирована без изменения его аминокислотной последовательности для экспрессии в *E. coli* и синтезирована ООО «Евроген», Москва. Штамм «ИК-4» ранее был описан Алиевым А.А. с соавторами [1]. На первом этапе исследования синтезированная последовательность гена VP1 была клонирована в экспрессионные векторы pGEX-3T и pET15b по сайтам рестрикции BamHI/EcoRI и NdeI/XhoI, соответственно. В результате были получены конструкции pGEX-3T/GST-ΔVP1 и pET15b/6HIS-ΔVP1, кодирующие рекомбинантные белки GST-ΔVP1 и 6HIS-ΔVP1.

Для экспрессии рекомбинантных генов штамм-реципиент *E. coli* Rosetta(DE3) (Novagen, Германия) был трансформирован рекомбинантными плазмидами pGEX-3T/GST-ΔVP1 и pET15b/6HIS-ΔVP1, содержащими укороченный ген белка VP1 вируса ИАЦ в составе слитых генов 6his-ΔVP1 и gst-ΔVP1, соответственно. Известно, что экспрессия гена, кодирующего белок VP1 в *E. coli*, может быть существенно увеличена путем удаления аргинин-богатого N-концевого домена [8]. Последовательность гена VP1 штамма «ИК-4» вируса ИАЦ была оптимизирована без изменения его аминокислотной последовательности для экспрессии в *E. coli*, была синтезирована в ООО «Евроген», Москва.

Трансформация клеток штамма-реципиента *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Компетентные клетки *E. coli* Rosetta (DE3), подготовленные согласно протоколу [10], помещали в ледяную баню, после чего к 100 мкл клеток добавляли раствор плазмидной ДНК (5 нг) и инкубировали на льду в течение 1 ч. Затем клетки опускали в водяную баню при 42 °С на 30 с и повторно инкубировали на льду в течение 2 мин. Далее к клеткам добавляли 400 мкл среды SOB (2 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 5M NaCl, 1M KCl), инкубировали при температуре 37 °С на орбитальном шейкере при 220 мин⁻¹ и высевали на агаризованную среду с антибиотиком (ампициллин 100 мкг/мл и хлорамфеникол 25 мкг/мл).

Индукция экспрессии генов, кодирующих рекомбинантные белки. Для индукции экспрессии генов клетки

штаммов-продуцентов *E. coli* Rosetta (DE3)/pGEX-3T/GST-ΔVP1 и *E. coli* Rosetta (DE3)/pET15b/6HIS-ΔVP1 культивировали в 5 мл среды YT*2 (1,6 % триптон, 1 % дрожжевой экстракт, 0,5 % NaCl), содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл), на орбитальном шейкере при 220 мин⁻¹ в течение 4 ч при 37 °С до достижения оптической плотности OD=0.6. Экспрессию гена целевого белка индуцировали добавлением IPTG (Promega, США) до конечной концентрации 0.2 mM. Клетки культивировали в течение 5 ч. Наличие и уровень синтеза рекомбинантных белков 6HIS-ΔVP1 и GST-ΔVP1 оценивали методом электрофоретического разделения белков в 12%-м полиакриламидном геле [6].

Накопление биомассы клеток, содержащих рекомбинантный белок. Клетки штаммов-продуцентов культивировали в 500 мл той же среды и при тех же условиях. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 1 ч с ускорением 9000 g при 4 °С, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФС-буфер: 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl), повторно осаждали центрифугированием в тех же условиях. Полученную биомассу клеток хранили при -20 °С. Наличие целевых белков подтверждали методом электрофоретического разделения белков в 12%-м полиакриламидном геле.

Идентификация рекомбинантных белков методом MALDI масс-спектрометрии. Лизаты клеток штаммов-продуцентов подвергали электрофоретическому разделению в 12%-м полиакриламидном геле по методике Лэммли [6] на аппарате MiniProtean III с использованием коммерческих гелей MiniProtean TGX StainFree (Bio-Rad). Гели окрашивали коллоидным раствором Кумасси G-250 [3], изображения получали на аппарате ChemiDoc XRS+ и анализировали при помощи программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad). Окрашенные зоны, предположительно соответствующие целевым белкам GST-ΔVP1 и 6HIS-ΔVP1, вырезали и проводили ферментативный гидролиз белков в геле трипсином. Для этого вырезанные зоны отмывали два раза по 15 мин в 100 мкл 40%-го ацетонитрила, 30 mM NH₄HCO₃ и обезвоживали 100 мкл 100%-го ацетонитрила, после чего к сухому фрагменту геля добавляли 2 мкл трипсина (Sigma, США), 20 мкг/мл в 50 mM NH₄HCO₃. Ферментативный гидролиз проводили в течение 5 ч при температуре 37 °С. Реакцию останавливали 3 мкл 10%-го ацетонитрила, 0,5%-й трифторуксусной кислоты.

Для масс-спектрометрического исследования образец смешивали с матрицей DHB (2,5-дигидроксибензойная кислота, Bruker, Германия) и наносили на мишень GroundSteel (Bruker, Германия). Спектр триптических пептидов получали на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре «ultrafleXtreme» (Bruker, Германия) в режиме регистрации положительных ионов. Идентификацию белка осуществляли с использованием Mascot (matrixscience.com). Поиск проводился одновременно среди всех известных белков в базе данных NCBI (США) и в локальной базе данных, куда вносили оригинальные последовательности рекомбинантных белков. В качестве переменных модификаций а.о. указывали окисление метионинов, ошибку ограничили 20 ppm.

Выделение телец включения. Биомассу размораживали, ресуспендировали в лизирующем буфере (50 mM трис-HCl, 500 mM NaCl, 1 % Тритон X-100, 1 mM ФМСФ, 5 mM β-меркаптоэтанол, pH 8,0) из расчета 2 мл буфера на 1 г биомассы. Далее клетки разрушали, подвергая суспензию обработке ультразвуком при помощи деинтегратора MSE (Великобритания) (5 циклов по 30 с озвучивания и 2 мин охлаждения в ледяной бане). Полученные лизаты центрифугировали в течение 1 ч при 15000 g, 4 °С, супернатант отбрасывали. Осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (см. выше) из расчета 1 мл буфера на 1 г осадка, центрифугировали в течение 1 ч при 30000 g, 10 °С. Супернатант отбрасывали, полученные осадки, содержащие тельца включения целевых белков GST-ΔVP1 и 6HIS-ΔVP1, хранили при -20 °С.

Хроматографическая очистка и рефолдинг рекомбинантного белка GST-ΔVP1. Тельца включения растворяли в денатурирующем буфере (ФС-буфер, 8 M мочевины, 2 mM ЭДТА, 1 mM ФМСФ) из расчета 5 мл буфера на 1 г телец включения. Раствор инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 ч, далее центрифугировали при 30000 g, 10 °С в течение 1 ч. Супернатант отбирали, фильтровали через шприцевой фильтр-насадку (Millipore, размер пор 0.45 мкм, материал мембраны — полиэфирсульфон). Концентрацию белка в растворе определяли методом Лоури [9].

Рефолдинг белка проводили методом разбавления. Раствор телец включения добавляли к предварительно охлажденному буферу для рефолдинга (ФС-буфер, 2 mM ЭДТА, 1 mM ФМСФ) до конечной концентрации белка 0,1 мг/мл и инкубировали на магнитной мешалке в течение 24 ч при температуре 4 °С. Далее раствор центрифугировали в течение 1 ч при 15000 g, 4 °С, супернатант отбирали, определяли концентрацию белка методом Лоури.

Хроматографическую очистку проводили методом аффинной хроматографии на иммобилизованном глутатионе. Хроматографическую колонку GSTrap HP (GE Healthcare, США) объемом 5 мл уравнивали 25 мл стартового буфера (ФС-буфер, 2 mM ЭДТА) на скорости потока 5 мл/мин. Далее вносили раствор белка после рефолдинга на скорости потока 2 мл/мин, после чего промывали колонку 50 мл стартового буфера на скорости потока 2 мл/мин. Целевой белок элюировали буфером для элюции (100 mM трис-HCl, 20 mM восстановленный глутатион, pH 7,8) на скорости потока 2 мл/мин. Мониторинг элюции вели по оптической плотности на длине волны 280 нм, отбирая фракции объемом 1 мл при помощи автоматического коллектора.

Хроматографическая очистка и рефолдинг рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1. Тельца включения растворяли в денатурирующем буфере (20 mM Na₃PO₄, 500 mM NaCl, 8 M мочевины, 20 mM имидазол, 1 mM ФМСФ, 5 mM β-меркаптоэтанол, pH 7,4) из расчета 5 мл буфера на 1 г телец включения. Раствор инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 ч, далее центрифугировали в течение 1 ч при 30000 g, 10 °С. Супернатант отбирали, фильтровали через шприцевой фильтр-насадку (размер пор 0,45 мкм, материал мембраны — полиэфирсульфон). Полученный солиоблизат телец включения хранили при 4 °С не более 24 ч с добавлением ФМСФ до конечной концентрации 1 mM.

Хроматографическую очистку проводили методом металл-аффинной хроматографии. Хроматографическую колонку HisTrap FF Crude (GE Healthcare, США) объемом 5 мл перед нанесением образца промывали 25 мл буфера для нанесения (20 мМ Na_3PO_4 , 500 мМ NaCl , 8 М мочевины, 20 мМ имидазол, pH 7,4) на скорости потока 5 мл/мин. Далее вносили солюбилизат телец включения на скорости потока 5 мл/мин, после чего колонку промывали 75 мл буфера для нанесения на скорости потока 5 мл/мин. Целевой белок элюировали буфером для элюции (20 мМ Na_3PO_4 , 500 мМ NaCl , 8 М мочевины, 500 мМ имидазол, pH 7,4) на скорости потока 2 мл/мин. Мониторинг элюции вели по оптической плотности на длине волны 280 нм, отбирая фракции объемом 1 мл при помощи автоматического коллектора. Фракции, имеющие значение оптической плотности более 300 mAU, объединяли.

Рефолдинг очищенного белка 6HIS- Δ VP1 осуществляли методом разбавления. К предварительно охлажденному до 4 °С буферу для рефолдинга добавляли раствор очищенного белка до конечной концентрации белка 0,1 мг/мл и инкубировали на шейкере в течение 24 ч при 4 °С. Далее полученный раствор белка центрифугировали в течение 1 ч при 15000g, 4 °С, супернатант отбирали, концентрацию белка определяли методом Лоури.

Оценка эффективности рефолдинга. Эффективность рефолдинга белков определяли методом электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле с последующей денситометрией. Супернатант после рефолдинга и контрольный образец (раствор телец включения белка, разбавленный денатурирующим буфером до конечной концентрации белка 0,1 мг/мл) анализировали по методике Лэммли на аппарате MiniProtean III с использованием коммерческих гелей MiniProtean TGX StainFree (Bio-Rad). Гели окрашивали коллоидным раствором Кумасси G-250 [3], изображения получали на аппарате ChemiDoc XRS+ и анализировали при помощи программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad). Процент целевого белка в растворимой форме вычисляли, проводя сравнительную денситометрию дорожек исследуемого образца и образца сравнения.

Метод непрямого ИФА. Постановку непрямого ИФА проводили по следующей схеме. Рекомбинантный антиген в концентрации 5 мкг/мл сорбировали на планшетах для ИФА (Медполимер, Россия) в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5; в течение 18 ч при 4 °С, промывали ФСБТ (ФС-буфером, содержащий 0,05 % Твин-20) и высушивали при 37 °С. В качестве блокирующего раствора использовали 5%-е обезжиренное молоко в ФС-буфере. Далее в лунки последовательно вносили по 100 мкл исследуемых сывороток (использовали серию двукратных разведений 1:100, 1:200 и т.д.) в ФСБТ, а затем меченые пероксидазой антитела к IgY кур в рабочем разведении. В качестве контроля также вносили по 100 мкл положительной и отрицательной сыворотки. На каждом этапе планшеты инкубировали 1 ч с последующей трехкратной отмывкой ФСБТ. Далее в лунки вносили по 100 мкл субстратного раствора с тетраметилбензидином («ТМБ», «Sigma») и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 0,05 мл 2 М H_2SO_4 . Интенсивность окраски в лунках определяли на планшетном

фотометре Multiskan EX (Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм (A450). Положительными считали сыворотки со значением A450 в два и более раза превышающие значения A450 отрицательной сыворотки.

Результаты и обсуждение

Конструирование экспрессионных плазмид. Для разработки эффективной технологии получения и очистки фрагмента белка VP1 вируса инфекционной анемии цыплят использовали две генетические конструкции, которые кодируют два рекомбинантных белка. В рекомбинантном белке GST- Δ VP1 целевой белок Δ VP1 маркирован глутатион-S-трансферазой, а в рекомбинантном белке 6HIS- Δ VP1 целевой белок Δ VP1 маркирован 6HIS-тегом, расчетная молекулярная масса белков составляет 63,6 и 41,0 кДа, соответственно.

На первом этапе исследования последовательность гена VP1 клонировали в экспрессионные векторы pGEX-3T и pET15b по сайтам рестрикции BamHI/EcoRI и NdeI/XhoI, соответственно. В результате получили конструкции pGEX-3T/GST- Δ VP1 и pET15b/6HIS- Δ VP1, кодирующие рекомбинантные белки GST- Δ VP1 и 6HIS- Δ VP1 (рис. 1).

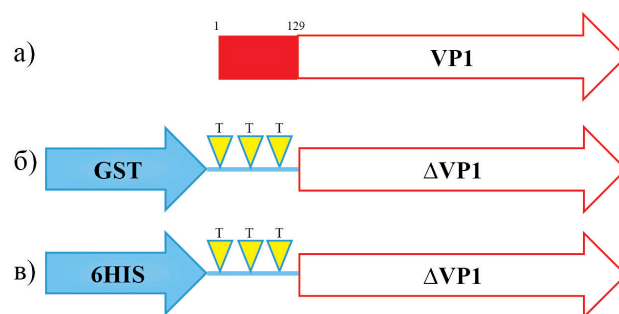


Рис. 1. Схема строения рекомбинантных белков: а) VP1 дикого типа, красным отмечен участок с 1 по 129 а.о., обогащенный аргинином; б) рекомбинантный белок GST- Δ VP1, содержащий протеолитический тромбиновый сайт (TTT); в) рекомбинантный белок 6HIS- Δ VP1, содержащий протеолитический тромбиновый сайт (TTT)

Fig. 1. The scheme of the recombinant proteins structure: а) wild-type VP1, enriched with arginine region from 1 to 129 a.a. marked in red; б) GST- Δ VP1 recombinant protein, containing a proteolytic thrombin site (TTT); с) 6HIS- Δ VP1 recombinant protein containing proteolytic thrombin site (TTT)

Затем отбирали клоны клеток, в которых выявили экспрессию созданных генетических конструкций (рис. 2, дорожки 2...4 и рис. 3, дорожки 2...7).

В ходе исследований установили, что рекомбинантные белки накапливаются в клетках в форме телец включения (данные не представлены).

Таким образом, рекомбинантные белки в клетках штаммов-продуцентов *E. coli* Rosetta(DE3)(pGEX-3T/GST- Δ VP1) и *E. coli* Rosetta(DE3)(pET15b/6HIS- Δ VP1) накапливаются в состоянии, не обладающим нативной пространственной структурой, в функционально не активной форме. В связи с этим на следующем этапе исследования осуществили подбор условий рефолдинга для перевода белков в нативное состояние, то есть в активную форму, а также оптимизировали метод их очистки.

Рекомбинантный белок GST-VP1. Методом MALDI масс-спектрометрии в образце, содержащем рекомби-

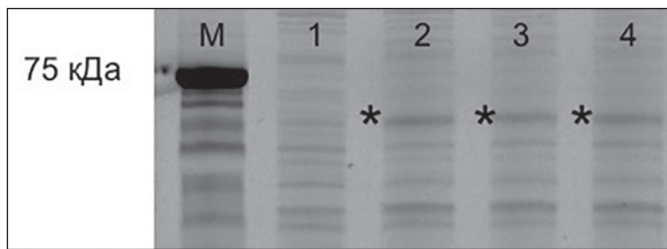


Рис. 2. Электрофорезграмма лизата клеток *E.coli* Rosetta (DE3) трансформированных плазмидой pGEX-3T/GST-ΔVP1: дорожка М — маркер молекулярных масс; дорожка 1 — лизат клеток до индукции; дорожки 2...4 — лизат клеток после индукции и 5 ч культивирования; * — зона, по электрофоретической подвижности соответствующая рекомбинантному белку GST-ΔVP1 с молекулярной массой 63.6 кДа

Fig. 2. Electrophoregram of the *E. coli* Rosetta (DE3) cells lysate transformed with the pGEX-3T / GST-ΔVP1 plasmid: M — molecular weight marker; lane 1 — cell lysate before induction; lanes 2...4 — cell lysate after induction and 5 h of cultivation; * — band, corresponding to the GST-ΔVP1 recombinant protein according to electrophoretic mobility with a molecular weight of 63.6 kDa

нантный белок GST-VP1, достоверно идентифицировали белок слияния GST-VP1 [chicken anemia virus]. Величина Score составила 551 при пороговом значении 89 (в случае, если Score превышает пороговое значение, идентификация считается достоверной, $p < 0.05$).

Эксперименты по оптимизации условий рефолдинга белка слияния GST-VP1 показали, что изменение состава буфера для рефолдинга не оказывает существенного влияния как на выход растворимой формы белка, так и на эффективность его связывания с иммобилизованным глутатионом (данные не представлены). Аффинная



Рис. 3. Электрофорезграмма лизата клеток *E.coli* Rosetta (DE3) трансформированных плазмидой pET15b/6HIS-ΔVP1: дорожка М — маркер молекулярных масс; дорожка 1 — лизат клеток до индукции; дорожки 2...7 — лизат клеток после индукции и 5 ч культивирования; * — зона, по электрофоретической подвижности соответствующая рекомбинантному белку 6HIS-ΔVP1 с молекулярной массой 41,0 кДа

Fig. 3. Electrophoregram of the *E. coli* Rosetta (DE3) cells lysate transformed with the pET15b / 6HIS-ΔVP1 plasmid: M — molecular weight marker; lane 1 — cell lysate before induction; lanes 2...7 — cell lysate after induction and 5 h of cultivation; * — band, corresponding to the 6HIS-ΔVP1 recombinant protein according to electrophoretic mobility with a molecular mass of 41.0 kDa

хроматография GST-меченого белка на иммобилизованном глутатионе (колонке GSTар HP) оказалась невозможной для растворимой формы белка GST-ΔVP1 после рефолдинга. Причиной этого может являться как некорректный фолдинг глутатион-связывающего сайта, так и его экранирование элементами пространственной структуры рекомбинантного белка. В обоих случаях хроматографическая очистка на иммобилизованном глутатионе оказывается неэффективной.

Таким образом, синтезировали целевой продукт, меченый GST, но не способный взаимодействовать с иммобилизованным глутатионом. Однако не удалось подобрать условия, обеспечивающие связывание рекомбинантного белка GST-VP1 с иммобилизованным глутатионом.

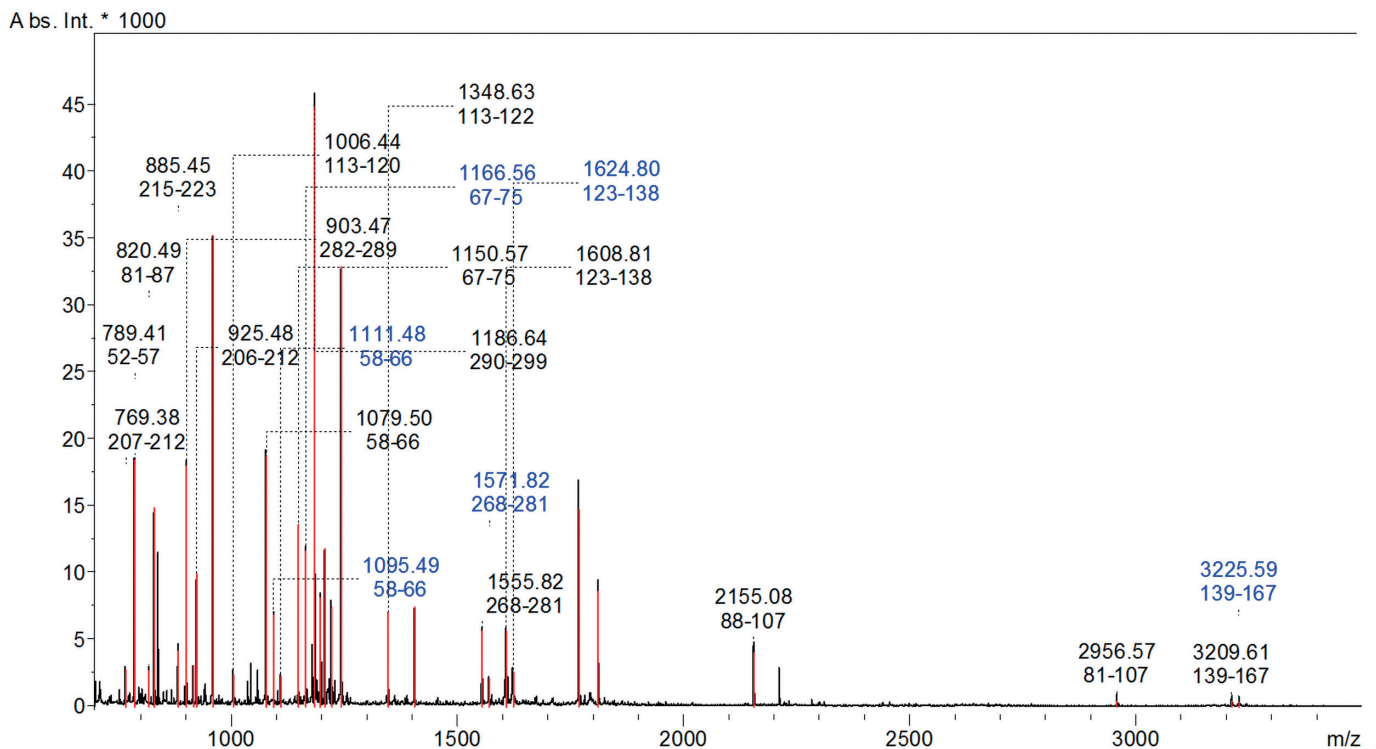


Рис. 4. Фрагмент MALDI масс-спектра рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1. Отмечены ионы, найденные в последовательности белка. Указаны их m/z и номера соответствующих им аминокислотных остатков

Fig. 4. The 6HIS-ΔVP1 recombinant protein MALDI mass spectrum fragment. The ions found in the protein sequence are noted. Their m/z and the numbers of the corresponding amino acid residues are indicated

1	AGELIADGSQ	SQAAQNWPNC	WLPLDNNVPS	ATPSAWRWA	LMMMQPTDSC
51	R FFNHPKQMT	LQDMGRMFGG	WHLFRHIETR	FQLLATKNEG	SFSPVASLLS
101	QGEYLTRDD	VKYSSDHQNR	WRKGEQPMTG	GIAYATGKMR	PDEQQYPAMP
151	PDPPIITATT	AQGTQVRCMN	STQAWWSWDT	YMSFATLTAL	GAQWSFPPGQ
201	RSVSR RSFNH	HKARGAGDPK	GQRWHTLVPL	GTETITDSYM	SAPASELDTN
251	FFTLYVAQGT	NKSQQYK FGT	ATYALKEPVM	KSDAWAVVRV	QSVWQLGNRQ
301	RPYPWDVNA	NSTMYWGSQP			

Рис. 5. Фрагменты аминокислотной последовательности рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1, обнаруженные в ходе масс-спектрометрического анализа (красный)

Fig. 5. Fragments of the amino acid sequence of the 6HIS-ΔVP1 recombinant protein, detected during mass spectrometry analysis (red)

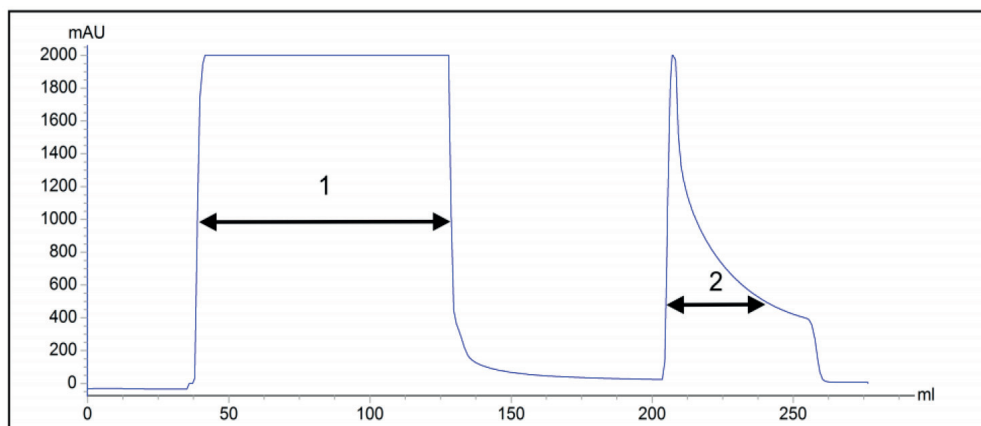


Рис. 6. Хроматограмма очистки рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1 на колонке HisTrap FF Crude: 1 — фракция не связанного материала; 2 — фракция элюата. Синим цветом показана оптическая плотность на длине волны 280 нм
Fig. 6. Chromatogram of 6HIS-ΔVP1 recombinant protein purification on a HisTrap FF Crude column: 1 — fraction of unbound material; 2 — fraction of the eluate. The blue color shows the optical density at a wavelength of 280 nm

Рекомбинантный белок 6HIS-ΔVP1. Методом MALDI масс-спектрометрии в образце, содержащем рекомбинантный белок 6HIS-ΔVP1, достоверно идентифицировали белок слияния 6HIS-ΔVP1 [chicken anemia virus]. Величина Score составила 233 при пороговом значении 70 (в случае, если Score превышает пороговое значение, идентификация считается достоверной, $p < 0.05$) (рис. 4 и рис. 5). На рисунке 4 представлен фрагмент масс-спектра рекомбинантного белка, на котором отмечены зарегистрированные ионы и номера аминокислотных остатков в последовательности, которым они соответствуют. Таким образом, синтезировали целевой продукт, меченый полигистидиновой последовательностью.

На рисунке 5 представлена аминокислотная последовательность рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1, подчеркнуты фрагменты, обнаруженные в ходе масс-спектрометрического анализа. Покрытие последовательности составило 47 %.

В отличие от аффинной хроматографии на иммобилизованном глутатионе, металл-аффинная хроматография, использующаяся для очистки гистидин-меченых белков, позволяет проводить процесс как в нативных, так и в денатурирующих условиях, что в большинстве случаев обеспечивает решение проблем, связанных с экранированием аффинной метки. Металл-аффинную хроматографию в денатурирующих условиях использовали для очистки рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1 (рис. 6). Пул фракций, содержащий целевой белок, диализовали против 50 мМ натрий-фосфатного буфера,

pH 7.4, содержащего 1 мМ ЭДТА и 8 М мочевины, и хранили при -20°C .

Для изучения биологических свойств очищенного рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1 оптимизировали условия его рефолдинга с оценкой количества растворимой формы. При этом применяли буферные растворы, содержащие различные концентрации стабилизирующих агентов и неионных ПАВ, имеющих разные значения ионной силы и pH. На рисунке 6 представлены результаты эксперимента по рефолдингу целевого белка в 9-ти различных буферных растворах. Рефолдинг проводили, добавляя раствор денатурированного белка в концентрации 2 мг/мл к каждому из 9 испытуемых буферных растворов в соотношении 1:19. Фактическую концентрацию белка измеряли методом Лоури, после чего проводили электрофорез в полиакриламидном геле по методу Лэммли с последующей денситометрией для оценки его процентного содержания в растворимой форме. Данные представлены на рисунке 7.

Наибольший выход белка 6HIS-ΔVP1 в растворимой форме получили с использованием трех буферных систем: 50 мМ натрий-ацетатный буфер, pH 5.5, содержащий 0,1 % Твин-20 (85 % белка в растворимой форме); фосфатно-солевой буфер, pH 7.4, содержащий 0,5 М L-аргинин (60 % белка в растворимой форме) и 50 мМ натрий-ацетатный буфер, pH 5.5 (55 % белка в растворимой форме). Однако методом ИФА показали, что только в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, содержащем 0,5 М L-аргинин, рефолдинг рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1 обеспечил его специфическое взаимо-

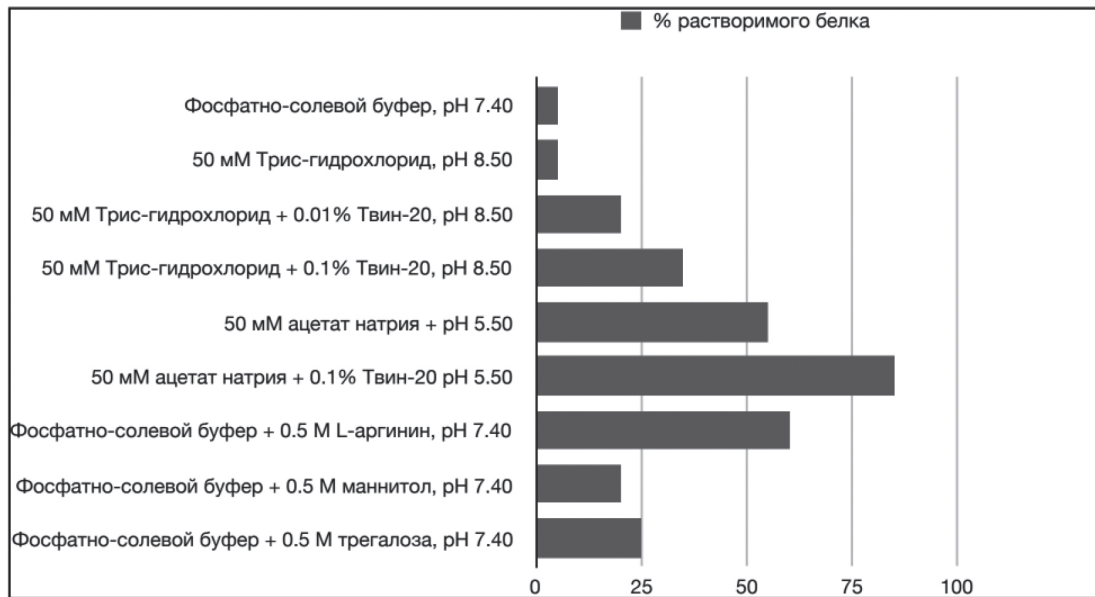


Рис. 7. Рефолдинг рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1 в различных буферных системах
Fig. 7. Refolding of 6HIS-ΔVP1 recombinant protein in various buffer systems

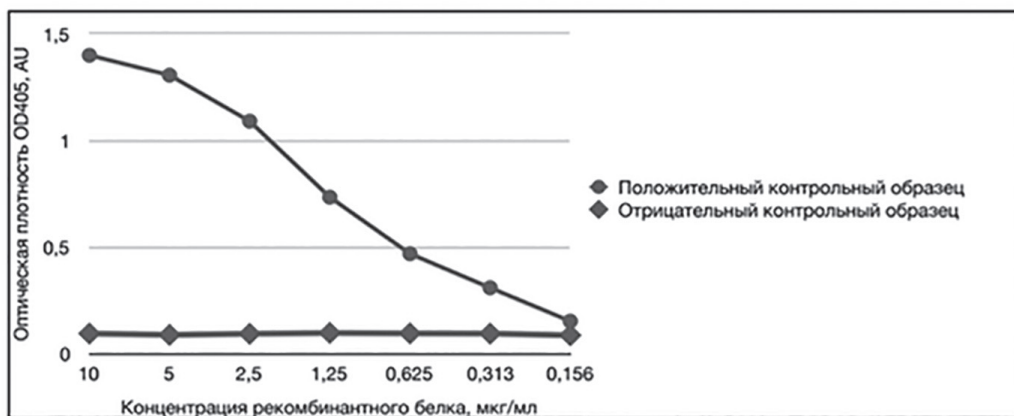


Рис. 8. Антигенная активность растворимой формы очищенного белка 6HIS-ΔVP1: положительный контрольный образец — сыворотка крови птиц, содержащая антитела к возбудителю инфекционной анемии; отрицательный контрольный образец — сыворотка крови SPF кур

Fig. 8. Antigenic activity of the purified 6HIS-ΔVP1 protein soluble form: a positive control — avian blood serum containing antibodies to the causative agent of infectious anemia; negative control - serum of SPF chickens

действие с поликлональными антителами сывороток кур (рис. 7). Чистота рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1 в растворимой форме в данном буфере составила 96,8 %, а его концентрация — 62 мг/л.

Для оценки антигенной активности очищенного рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1 в ИФА использовали положительные и отрицательные сыворотки, входящие в набора BioCheck CAV Antibody test kit (BioCheck, США). Рекомбинантный белок 6HIS-ΔVP1 сорбировали на 96-луночный планшет Nunc MaxiSorp (ThermoFisher, США) в концентрации 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 и 0.156 мкг/мл. Далее проводили ИФА с использованием реагентов из набора BioCheck согласно инструкции производителя. Результаты документировали при помощи планшетного фотометра Multiskan EX (Thermo Scientific, США). На рисунке 8 показана корреляция (зависимость) среднего значения оптической плотности контрольных образцов от концентрации рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1.

Методом ИФА с использованием рекомбинантного белка в качестве антигена, адсорбированного в лунки планшет, испытывали полевые и сыворотки крови SPF-цыплят, полученные в разные сроки после экспериментального заражения их в суточном возрасте патогенным штаммом «ИК-4» вируса ИАЦ, также сыворотки в контрольной группе цыплят. Суточным SPF-цыплятам (n=10) внутримышечно вводили 0,1 мл патогенного штамма «ИК-4» в дозе 6,4 ДНК коп/мл. Контрольной группе (n=5) вводили 0,1 мл физиологического раствора. До и на 21-, 28-, 35-, 42- и 48-е сутки опыта брали кровь и сыворотки исследовали в ИФА. Полученные в ходе опыта данные приведены в таблице 1 и на рисунке 9.

Предварительно методом «шахматного» титрования определяли концентрацию рекомбинантного белка и рабочее разведение иммунопероксидазного конъюгата к IgG кур (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, г.Москва) путем постановки непрямой

Результаты исследования методом ИФА сывороток крови цыплят на наличие антител к вирусу ИАЦ
The presence of antibodies to the infectious anemia virus in serum of chickens detecting by ELISA

Возраст цыплят, сутки	Число проб	Титр антител				
		0	200	400...800	800...1600	3200...6400
1	61	16	10	12	18	5
21	65	18	15	20	12	0
35	94	0	16	18	34	26

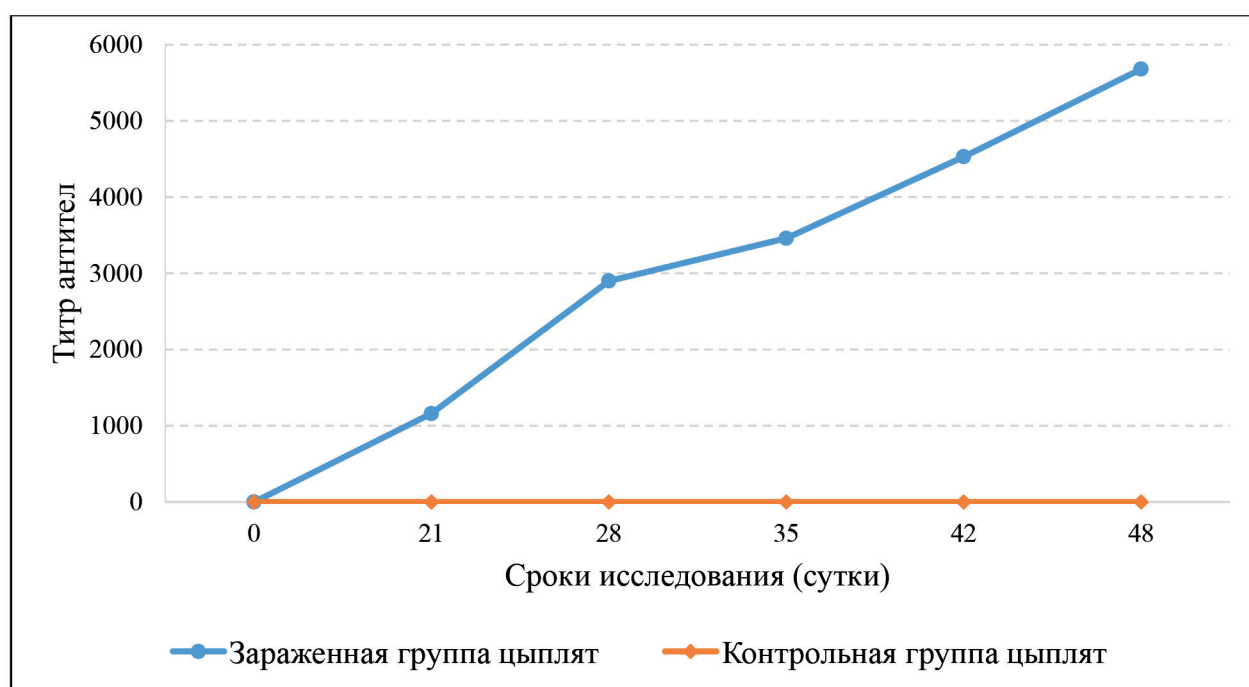


Рис. 9. Динамика накопления антител в сыворотке крови СПФ-цыплят, зараженных штаммом «ИК-4» вируса ИАЦ
Fig. 9. The dynamics of the antibodies' accumulation in the serum of SPF-chickens infected with strain IK-4 of infectious anemia virus

го варианта, используя двукратные последовательные разведения препаратов. За рабочее разведение каждого из компонентов принимали предельное разведение каждого, обеспечивающее ОП=1,0 ед.

Для определения пороговой чувствительности ИФА устанавливали зависимость величины ОП₄₅₀ продукта реакции от разведения положительной и отрицательной сывороток. Двукратные разведения положительной и отрицательной сыворотки начинали с разведения 1:100. Опыт проводили при оптимальной концентрации сорбированного рекомбинантного антигена. Достоверно регистрируемое различие в показаниях ОП₄₅₀ (более чем в 2 раза) наблюдали при разведении положительной и отрицательной сывороток с 1:200. При разведении ниже 1:200 появляется неспецифическое взаимодействие, что сказывается на результатах реакции.

Таким образом, были определены оптимальная концентрация рекомбинантного антигена для сорбции и разведение положительной сыворотки, которые могут быть использованы при постановке ИФА для выявления специфических антител к вирусу ИАЦ.

Специфичности метода определяли, используя иммунные сыворотки птиц к вирусам инфекционного бронхита, ньюкаслской болезни, инфекционного ларинготрахеита, аденовирусной инфекции, *Mycoplasma*

gallisepticum, а также отрицательную сыворотку кур. Отсутствие положительной реакции с нормальной сывороткой и сыворотками к гетерологичным возбудителям птиц свидетельствует о специфичности рекомбинантного антигена.

Постановку непрямого ИФА проводили по следующей схеме. Рекомбинантный антиген в концентрации 5 мкг/мл сорбировали на планшетах ИФА (Медполимер, Россия) в 0,05 М КББ, рН 9,5 в течение 18 ч при 4 °С, промывали ФСБТ и высушивали при 37 °С. Свободный участок лунок блокировали 5,0 % обезжиренного молока в ФСБ. Затем в лунки последовательно вносили по 100 мкл исследуемых сывороток (двукратные разведения 1:100...1:200 и т.д.) в ФСБТ, меченых пероксидазой антитела к IgY кур в рабочем разведении. Одновременно на каждой планшете по две лунки вносили 100 мкл положительной и отрицательной сыворотки. На каждом этапе планшеты инкубировали 1 ч при последующей трехкратной отмывке ФСБТ. Затем вносили в лунки 100 мкл субстратного раствора с тетраметилбензидином («ТМБ», «Sigma») с последующей инкубации в течение 15 мин при комнатной температуре и реакцию останавливали добавлением 0,05 мл 2 М H₂SO₄. Интенсивность окраски в лунках определяли на спектрофотометре с вертикальным лучом

(Multiscan EX, США) при 450 нм (A450). Положительными считали сыворотки со значением A450 в 2 и более раза выше значения A450 отрицательной сыворотки. Данные, приведенные в таблице 2 и на рисунке 8 свидетельствуют, что рекомбинантный белок VP1 пригоден для выявления антител к вирусу ИАЦ в сыворотке крови птиц больных ИАЦ.

Заключение

Отработан метод очистки рекомбинантного белка 6HIS-ΔVP1 и подобраны условия рефолдинга обеспечивающие антигенную активность его растворимой формы. Полученный рекомбинантный белок 6HIS-VP1 пригоден для выявления антител к вирусу инфекционной анемии цыплят и его можно рассматривать как потенциальный компонент вакцины против данного вируса, что является предметом наших дальнейших исследований.

Конфликт интересов

Авторский коллектив не получал спонсорской помощи от производителей или поставщиков оборудования и расходных материалов, указанных в данной работе.

References

1. Aliev A.S., Gromov I.N., Musorina A.S., Gadzhiguseeva N.F., Isolation and characterization of the infectious anemia virus chickens, *Veterinary science (Veterinariya)*, 2017, No. 11, pp. 7–14. (In russ.).
2. Adair B., Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection, *Dev. Comp. Immunol.*, 2000, No. 24, pp. 247–255.
3. Ducatez M.F., Owoade A.A., Abiola J.O., Muller C.P., Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria, *Arch. Virol.*, 2006, No. 151, pp. 97–111.
4. Jeurissen S.H.M., Wagenaar F., Pol J.M. van der Eb A.J., Noteborn M.H. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection, *J. Virol.*, 1992, No. 66(12), pp. 7383–7388.
5. Kumar S., Stecher G. and Tamura K., MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets, *Molecular Biology and Evolution*, 2016, No. 33, pp. 1870–1874.

6. Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 1970, Vol. 227, pp. 680–685. doi:10.1038/227680a0.
7. Lee M.S., Lien Y.Y., Feng S.H., Huang R.L., Tsai M.C., Chang W.T., Chen H.J., Production of chicken anemia virus (CAV) VP1 and VP2 protein expressed by recombinant *Escherichia coli*, *Process Biochem.*, 2009, No. 44, pp. 390–395.
8. Lee M.S., Lien Y.Y., Feng S.H., Huang R.L., Tsai M.C., Chang W.T., Chen H.J., Production of chicken anemia virus (CAV) VP1 and VP2 protein expressed by recombinant *Escherichia coli*, *Process Biochem.*, 2009, No. 44, pp. 390–395.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J., Protein Measurement with the Folling Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951, No. 193, pp. 265–275.
10. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E.F., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 545 p.
11. McNulty M.S., Connor T.J., McNeilly F. and Spackman D., Chicken anemia agent in the United States: isolation of the virus and detection of antibody in broiler breeder flocks, *Avian Diseases*, 1989, Vol. 33, pp. 691–694.
12. McNulty M.S., Connor T.J., McNeilly F., McLoughlin M.E., Kirkpatrick K.S., Preliminary characterization of isolates of chicken anaemia agent from the United Kingdom, *Avian Pathology*, 1990, Vol. 19, pp. 67–73.
13. Natesan S., Kataria J., Dhama K., Rahul S., Bhardwaj N., Biological and molecular characterization of chicken anaemia virus isolates of Indian origin, *Virus Res.*, 2006, No. 118, pp. 78–86.
14. Nayabian H., Mardani K. Molecular characterization of the chicken anaemia viruses isolated from broiler farms of west Azerbaijan, Iran, *Avian Pathology*, 2013, Vol. 42, pp. 108–113.
15. Noteborn M., Verschuere C., Koch G., Van der Eb A., Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope, *J. Gen. Virol.*, 1998, No. 79, pp. 3073–3077.
16. Pallister R.J., Fahey K.J., Sheppard M., Cloning and sequencing of the chicken anemia virus (CAV) ORF-3 gene, and the development of an ELISA for the detection of serum antibody to CAV, *Veterinary Microbiology*, 1994, No. 39, pp. 167–178.
17. Pringle C.R., Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, *Archives of Virology*, 1999, No. 144, pp. 2065–2070.
18. Renshaw R.W., Soine C., Weinkle T., O'Connell P.H., Ohashi K., Watson S., Lucio B., Harrington S., Schat K.A., A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture, *J. Virol.*, 1996, No. 70, pp. 8872–8878.
19. Phenk K.V., Meehan B.M., Todd D., McNulty M.S., Transcriptional analysis and genome expression of chicken anemia virus, *Journal of General Virology*, 1994, No. 75, pp. 905–909.
20. Todd D., Circoviruses: Immunosuppressive threat to avian species; a review, *Avian Pathology*, 2000, No. 29, pp. 373–394.

