

УДК 578.224

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГЛИКОПРОТЕИН Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

© 2022 г. В. С. Барышникова^{1, *, **}, Ю. В. Турченко¹,
А. А. Шишова^{1, 2}, А. С. Климентов¹, К. К. Тучинская¹, Г. Г. Карганова^{1, 3}

¹Федеральное государственное автономное научное учреждение “Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова” Российской академии наук (Институт полиомиелита), Москва, 108819 Россия

²Институт трансляционной медицины, Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, 117418 Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования “Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125445 Россия

*e-mail: baryshnikova_vs@chumakovs.ru

**e-mail: baryshnikova.vs@bk.ru

Поступила в редакцию 15.09.2022 г.

После доработки 11.10.2022 г.

Принята к публикации 13.10.2022 г.

На территории Российской Федерации циркулирует несколько представителей рода *Flavivirus*. Самый распространенный среди них – вирус клещевого энцефалита. Сочетанные очаги флавивирусных инфекций на территории России и расширяющиеся туристические потоки в регионы, эндемичные по другим флавивирусам, поднимают вопрос о дифференциальной диагностике. Существующие коммерческие тест-системы на основе поверхностного гликопротеина Е не обеспечивают надежную дифференциацию между флавивирусами. Считается, что в доменах I и II белка Е содержатся перекрестные (кросс-реактивные) эпитопы, а иммуноглобулинподобный домен III является видоспецифичным. Повысить дифференцирующую способность тест-систем можно с использованием отдельных доменов этого белка. Мы провели поиск и оптимизировали методику получения рекомбинантных доменов поверхностного гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита.

Ключевые слова: гликопротеин Е, вирус клещевого энцефалита, рекомбинантные белки

DOI: 10.56304/S0234275822060023

Многие представители рода *Flavivirus* являются возбудителями тяжелых заболеваний человека и животных. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) – один из самых распространенных представителей рода на территории Российской Федерации, где кроме него циркулируют и такие представители флавивирусов, как вирус Западного Нила, вирус японского энцефалита, вирус Повассан, вирус омской геморрагической лихорадки [1]. По дан-

ным Роспотребнадзора, ежегодно в России регистрируют около 2 тыс. случаев клещевого энцефалита (КЭ) [2].

Для ВКЭ описано 7 генотипов, циркулирующих на территории Российской Федерации: европейский (ТБЕV-Eur), сибирский (ТБЕV-Sib), дальневосточный (ТБЕV-FE), 2871 (ТБЕV-2871, или ТБЕV-Ob), гималайский (ТБЕV-Him), 178-79 (ТБЕV-178-79, или ТБЕV-Vkl-1) и 886-84 (ТБЕV-886-84, или ТБЕV-Vkl-2). Из них 6 были изолированы в разных регионах России, самый распространенный – сибирский подтип [3].

Представители рода *Flavivirus* имеют кросс-реактивные эпитопы [4]. Вируснейтрализующие

Список сокращений: КЭ – клещевой энцефалит; ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; ИФА – иммуноферментный анализ; ADE (antibody-dependent enhancement) – антителозависимое усиление инфекции; sE – эктодомен белка Е ВКЭ; dI+II – домены I и II белка Е ВКЭ; dIII – домен III белка Е ВКЭ.

антитела считаются основой гомотипического иммунитета. Однако для вируса денге показано, что при вторичном заражении другим серотипом развивается антителозависимое усиление инфекции (ADE); то есть кросс-реактивные антитела связываются с вирионами, но из-за низкой аффинности к несколько иному антигену они не нейтрализуют вирус, а способствуют его проникновению в клетки, которые экспрессируют на своей поверхности иммуноглобулиновые рецепторы (FcγR) [5]. Это явление описано и для других переносимых комарами флавивирусов. Пока нет достоверной информации по ADE для переносимых клещами флавивирусов, хотя этот вопрос требует детального изучения.

Сочетанные очаги флавивирусных инфекций на территории России и расширяющиеся туристические потоки в регионы, эндемичные по другим флавивирусам, поднимают вопрос о необходимости дифференциальной диагностики. Дифференциальная серодиагностика нужна, во-первых, для лабораторного подтверждения диагноза и выбора схемы лечения; во-вторых, для оценки вероятности ADE при посещении эндемичных регионов; в-третьих, для мониторинга эпидемиологической ситуации, на основе результатов которого вырабатывают стратегию и тактику проведения профилактических мероприятий, особенно на территории смешанных очагов; в-четвертых, для научных исследований по механизмам формирования иммунного ответа и ADE.

Исторически при исследовании биологических жидкостей для выявления поликлональных антител различных классов использовали иммуноферментный анализ (ИФА) на основе инактивированного ВКЭ [6–8]. В дальнейшем использование инактивированного ВКЭ в качестве основы для ИФА стало стандартом, именно на этом основано подавляющее большинство коммерчески доступных тест-систем [9]. В связи с кросс-реактивностью внутри рода *Flavivirus* были выявлены проблемы со специфичностью подобных систем [10–12].

Геном флавивирусов представлен одноцепочечной РНК положительной полярности, состоящей из приблизительно 11 тыс. нуклеотидов и кодирующей три структурных и семь неструктурных белков. Поверхностный гликопротеин E — это основной антиген, к которому вырабатываются нейтрализующие антитела в процессе инфекции. Этот белок состоит из трех эктодоменов (sE), экспонированных на поверхности вируса, домена “якоря” и домена “стебля” [13]. Считается, что в эктодоменах I и II (dI+II) содержатся кросс-реактивные эпитопы, а в иммуноглобулинподобном

домене III (dIII) — видоспецифичные [14]. В качестве мишени дифференцирующих тест-систем можно использовать домена III белка E, так как он несет наибольшее число вирусспецифичных эпитопов. Рекомбинантные белки на основе доменов I и II применимы в тест-системах для выявления кросс-реактивных антител против флавивирусов [15].

Для повышения специфичности ИФА описаны различные подходы с использованием рекомбинантных белков ВКЭ. Рекомбинантный и химерный dIII был успешно использован для выявления анти-ВКЭ-антител среди сывороток, содержащих антитела к вирусу денге, вирусу желтой лихорадки и ВКЭ [16–18]. Несколькими группами исследователей [19–21] продемонстрирована возможность использования рекомбинантных белков: премолекул (prM) и E ВКЭ (штаммы Kumlinge A25 (европейский подтип) и Oshima 5 (дальневосточный подтип)) в составе вирусоподобных частиц для выявления анти-ВКЭ-антител. Предложено использование рекомбинантного неструктурного белка NS1 ВКЭ для повышения специфичности тест-систем, а также для дифференциации сывороток переболевших и вакцинированных, но пока это больше предмет дискуссий [22, 23]. Таким образом, остается актуальной проблема создания тест-системы для выявления антител ко всем вариантам ВКЭ, циркулирующим на территории России, и для их дифференциации от антител к другим флавивирусам.

Использование рекомбинантных белков позволяет нарабатывать большое количество целевого продукта. Одна из непростых методических задач при этом — извлечение белков из телец включения. Их осадок обрабатывают ультразвуком (сонифицируют) в присутствии мочевины, при оптимально подобранной концентрации которой получают максимальное количество целевого белка в растворенном виде [24].

Цель проведенной нами работы состояла в подборе и оптимизации методик для получения рекомбинантных доменов поверхностного гликопротеина E ВКЭ.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Вирусы и клетки

В работе использовали вирус клещевого энцефалита сибирского подтипа, штамм Сухар (GenBank: OP185392), который был выделен из мозга умершего человека в 2016 году в Ярославской области; а также клетки *Escherichia coli* TOP10 и *E. coli* JM109 (Promega, США).

Таблица 1. Праймеры для клонирования доменов белка Е ВКЭ штамма Сухар
Table 1. Primers for cloning of E protein domains of TBEV strain Sukhar

Праймер	Последовательность, 5'→3'	Участок в геноме*
TBEall_ed-60s	GAGCTACCATGGTCACACATCTGGAGAACAGG	1–19
TBEall_ed-60as	TAGCTCAGATCTCTTTTGGAACTGATGGC	1158–1117
TBEedI+II-60as	TAGCTCAGATCTGTATGTGAGACCTTTCATCT	885–905
TBEedIII-30s	GAGCTAGAGCTCACAATGTGTGACAAAACGAAG	904–925
TBEedIII-3xas	TAGCTCAAGCTTCTTTTGGAACTGATGGC	1158–1117

* *Примечание:* Участки генома на основе последовательности ВКЭ Kumlinge (GenBank: AY268437.1).

* *Note:* Genome regions based on the TBEV Kumlinge sequence (GenBank: AY268437.1).

Таблица 2. Состав сред для индукции экспрессии целевого белка в клетках *E. coli* JM109
Table 2. Composition of media for the target protein expression induction in *E. coli* JM109 cells

Среда	Ингредиенты	Концентрация, г/л
LB	Триптон	10
	Дрожжевой экстракт	5
	NaCl	10
	Триптон	20
SOB	Дрожжевой экстракт	5
	NaCl	0.585
	KCl	0.185
	Триптон	12
TB	Дрожжевой экстракт	24
	Глицерин 99%	20*

* *Примечание:* Концентрация глицерина указана в мл/л.

* *Note:* The concentration of glycerol is given in mL/L.

Клонирование

Олигонуклеотиды для клонирования участков, кодирующих sE, dI+II, dIII были подобраны на основании множественного выравнивания соответствующих последовательностей (табл. 1).

Полученные ампликоны клонировали по сайтам рестрикции *Bgl*II (Thermo Fisher Scientific, США) и *Nco*I FD (Thermo Fisher Scientific) для sE и dI+II, используя вектор pQE-60 (Qiagen, Германия), и по сайтам рестрикции *Hind*III (Thermo Fisher Scientific) и *Sac*I FD (Thermo Fisher Scientific) для dIII, используя вектор pQE-30 (Qiagen). Рестрикцию проводили по протоколу производителя. После обработки рестриктазами плазмиды наносили на 1.5%-ный агарозный гель (Sigma-Aldrich, США) и очищали на центрифужных колонках, следуя инструкции производителя (Qiagen). Концентрацию ДНК измеряли по оптической

плотности. Для реакции лигирования вектор и вставку брали в эквимолярном соотношении.

Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* TOP10 по методике heat-shock. Из клонов выделяли плазмидную ДНК (Qiagen) и проверяли на наличие вставки методом ПЦР с праймерами для клонирования. Отсутствие замен подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру.

Трансформация и культивирование клеток *E. coli*

Полученными конструкциями трансформировали клетки *E. coli* JM109 методом heat-shock. Использовали среды: LB, SOB и TB (табл. 2).

Отдельную колонию клеток растили в течение 12–16 ч в 3 мл среды, содержащей 100 нг/мл ампициллина (“Неофарм”, Россия), с подавлением индукции в присутствии 20 мМ глюкозы (Serva,

Таблица 3. Состав буферов для сонификации и хроматографии
Table 3. Buffer composition for sonification and chromatography

Этап	Буфер	Состав
Сонификация	А	50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 0.2 М NaCl, 2% Тритон X-100, 1 мМ ЭДТА
	В	50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 0.2 М NaCl, мочевины (2–8 М)
Хроматография:		
Промывка колонки	С1	50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 0.5 М NaCl, 6 М мочевины, 10 мМ имидазол
	С2	50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 0.5 М NaCl, 6 М мочевины, 25 мМ имидазол
Элюция	Е_1	50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 0.25 М NaCl, 6 М мочевины, 0.15 М имидазол

Германия). Далее переносили клеточную суспензию в 200 мл среды с ампициллином (100 нг/мл) и глюкозой (20 мМ) и растили клеточную массу до оптической плотности 0.6–0.8 при длине волны 600 нм (9.6×10^9 клеток/мл). Клетки осаждали центрифугированием при 1700 g, 4°C в течение 30 мин. Осадок ресуспендировали в 200 мл среды без глюкозы с изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ; “Диа-М”, Россия) как индуктором экспрессии и инкубировали 18 ч при 37°C при покачивании. Полученный в результате центрифугирования (1700 g, 4°C, 30 мин) осадок промывали 50 мл PBS (Sigma-Aldrich), переосаждали в тех же условиях и ресуспендировали в 5 мл буфера А (табл. 3).

Ультразвуковая обработка клеток

Обработку клеток ультразвуком проводили в следующем режиме: 3 раза по 1 мин импульсом 7 мс на льду. После центрифугирования (7800 g, 4°C, 30 мин) осадок последовательно ресуспендировали в 3 мл буфера В (табл. 3) с концентрацией мочевины в диапазоне от 2 до 8 М — для выхода целевого белка в растворимую фракцию. После использования буфера с одной концентрацией мочевины озвучивали клетки 3 раза по 1 мин импульсом 7 мс на льду. Центрифугировали (7800 g,

Таблица 4. Концентрации очищенных рекомбинантных белков, полученных из 200 мл клеточной суспензии
Table 4. Concentrations of purified recombinant proteins obtained from 200 mL of cell suspension

Белок	Концентрация, мг/мл
sE	0.62
dI+II	1.58
dIII	1.42

4°C, 30 мин) и последовательно использовали буферы с нарастающей концентрацией мочевины.

Аффинная хроматография и рефолдинг белков

Для очистки целевых рекомбинантных белков использовали аффинную хроматографию на 9-сантиметровых гравитационных колонках Poly-Prep® (Bio-Rad, США) с 1 мл Ni-NTA-агарозы (Qiagen). На колонку наносили 3 мл супернатанта, содержащего рекомбинантный белок в буфере А. Колонку промывали 2 мл буфера В, затем С1 и С2 (табл. 3). Элюировали целевой белок 10 мл буфера для элюции Е_1 (табл. 3).

Рефолдинг белка проводили путем смены буфера Е_1 на PBS с использованием Hi-Trap De-salting Column (Cytiva, Швеция), согласно инструкции производителя. Полученные рекомбинантные белки разделяли электрофорезом в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (ПААГ-SDS). Для определения концентрации целевых белков использовали калибровочный график, построенный по известным концентрациям BSA (Genesys tool) (табл. 4).

Иммуноблоттинг

Полученные рекомбинантные белки разделяли электрофорезом в 12%-ном ПААГ-SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) по стандартной методике. Мембрану инкубировали с 5%-ным обезжиренным коровьим молоком (Best Value, США) в трис-боратном буфере (TBS: 25 мМ Tris, 0.15 М NaCl, рН 7.5) в течение 1 ч, затем 1 ч с сывороткой мышей. Мембрану промывали TBS с 0.05% Tween-20 (TBS-T) и инкубировали с мечеными пероксидазой хрена (HRP) антителами против IgG мыши (Abcam, Великобритания) в течение 1 ч. Проявляли мембрану с

использованием набора ECL (Bio-Rad) в гельдокументирующей системе Genesys (Genesys, США).

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Рекомбинантные белки (sE, dI+II, dIII) выравнивали по целевому продукту, как описано выше (см. “Аффинная хроматография и рефолдинг белков”) до концентрации 0.6 мг/мл в PBS. Лизаты клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ (“Биолот”, Россия) доводили до той же концентрации по тотальному белку (методом Лоури по стандартному протоколу). В 96-луночный планшет (Corning, США) вносили рекомбинантные белки в расчете 12 нг белка/лунка и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали PBS, инкубировали с 4%-ным обезжиренным коровьим молоком (Best Value) в PBS в течение 1 ч, затем с содержащей ВКЭ-антитела сывороткой крови человека в PBS с 0.05% Tween-20 (PBS-T) 1 ч. Планшет промывали, инкубировали с HRP-конъюгированными антителами против человеческого IgG (Abcam) в течение 1 ч, после чего промывали и вносили субстрат TMB (Sigma-Aldrich), через 30 мин реакцию останавливали 2 М серной кислотой (“Ленреактив”, Россия). Результаты детектировали при длине волны 450 нм на спектрофотометре (Thermo Fisher Scientific).

Реакция нейтрализации бляшкообразования

Содержание нейтрализующих антител в образцах сывороток определяли с использованием 24-луночных планшетов с монослоем клеток СПЭВ. Сыворотки разводили в соотношении 1 : 4 средой 199 в растворе Эрла (ФГАНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН, Россия) и вносили в них равный объем вируса. Полученную суспензию с концентрацией вируса 20–30 БОЕ/лунка (100 мкл) наносили на планшет и инкубировали 1 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C. Последующие этапы проводили по методике, описанной для титрования вируса *in vitro* [25, 26]. Титр нейтрализующих антител рассчитывали по модифицированной формуле Рида–Менча.

Образцы сывороток крови

В иммуноблоттинге использовали две мышинные гипериммунные сыворотки: содержащую антитела к ВКЭ (штамм Абсеттаров) и не содержащую их. Наличие антител подтверждали в реакции нейтрализации. В работе использовали беспородных мышей ICR (ГБУ “Научный центр биотехнологии”, филиал “Столбовая”, Россия), которых иммуни-

зировали ВКЭ с адьювантом три раза (один раз в неделю), через 10 дней после последней инъекции тотально забирали кровь (декапитация).

В ИФА использовали две сыворотки крови человека: одна содержала антитела к ВКЭ после двукратной иммунизации препаратом Клещ-Э-Вак, другая не содержала анти-ВКЭ-антител (получена от невакцинированного и не подвергавшегося укусам клещей человека). Обе сыворотки представлены авторами статьи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гликопротеин Е оболочки флавивирусов считается основным носителем антигенных сайтов, на обнаружение которых нацелено большинство флавивирусных тест-систем. Консервативность белка Е среди флавивирусов является причиной кросс-реактивности и ложных результатов применяемых серологических диагностикумов. Повышение специфичности тест-систем возможно при использовании не полноразмерного белка Е, а отдельных его участков: доменов I, II и III – и введением в них определенных замен.

Получение конструкций

На основании последовательности белка Е штамма Сухар ВКЭ были подобраны праймеры для амплификации участков, кодирующих домены III (dIII), домены I+II (dI+II) и все три домена (sE) белка Е ВКЭ (табл. 1).

Нами разработана схема клонирования (рис. 1). В качестве векторов для работы выбраны плазмиды группы pQE, компетентные к экспрессии белков в бактериальной системе *E. coli*, благодаря наличию лактозного оперона (*lacO*). Лактозный оперон позволяет контролировать экспрессию встраиваемого гена, что особенно актуально на стадии работы с чистым вектором или работы готовой конструкции. Плазмиды pQE-30 и pQE-60 были выбраны с учетом использованных рестриктаз и отсутствия сдвига открытой рамки считывания целевой последовательности при ее клонировании. Гены, кодирующие целевые белки, были фланкированы последовательностью, кодирующей гистидиновый тег (6×His), что позволяет использовать метод аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе для выделения рекомбинантного белка из бактериального лизата.

При помощи специфичных праймеров были получены ампликоны целевых участков гена белка Е ВКЭ (рис. 2).

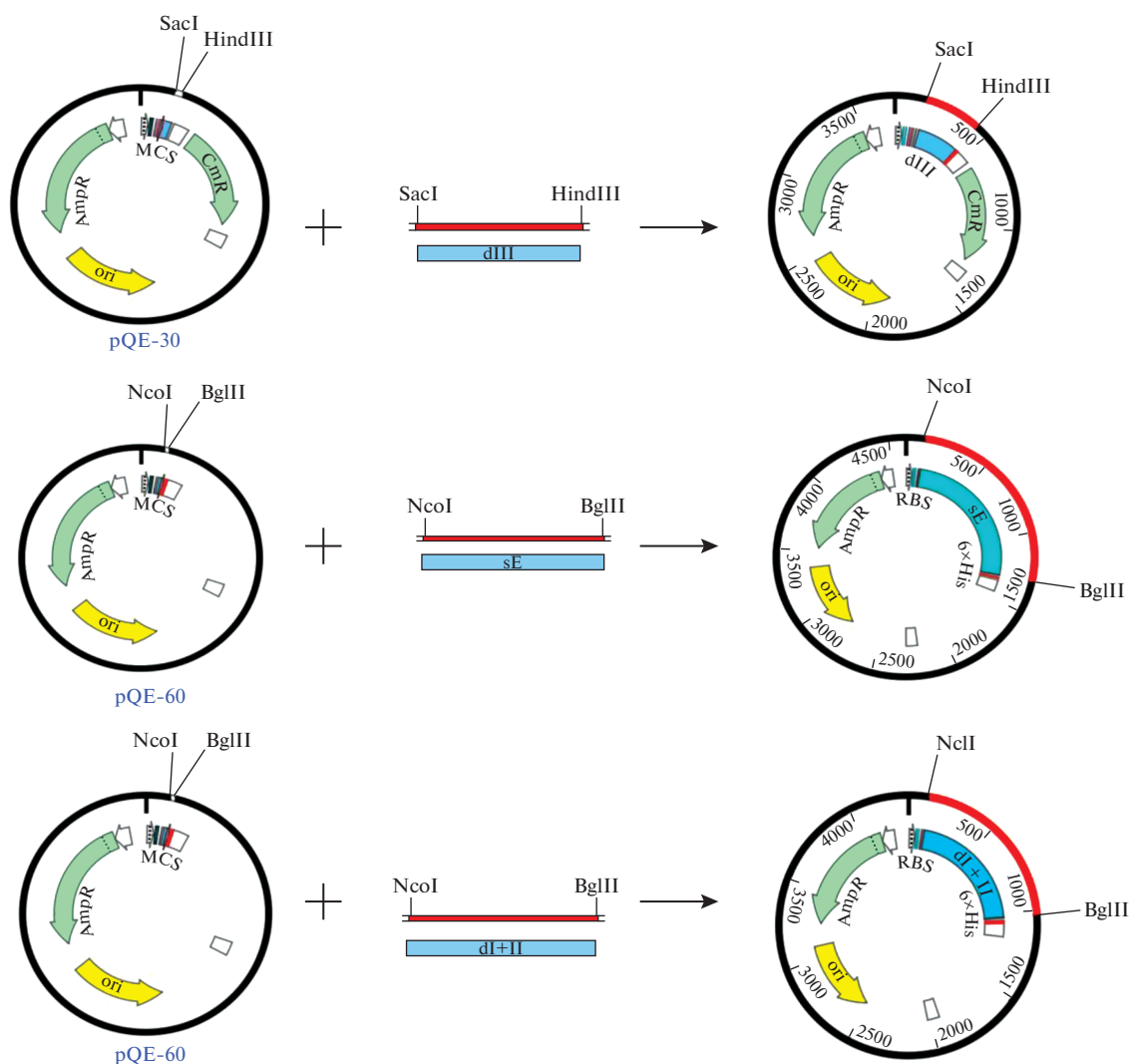


Рис. 1. Схема получения векторных конструкций.
Fig. 1. Scheme of designed vectors.

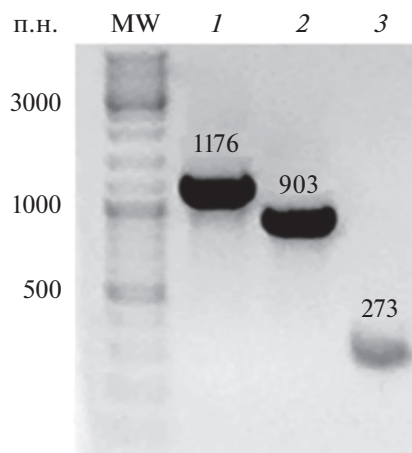


Рис. 2. Электрофоретический анализ ампликонов целевых участков гена белка E. На дорожки нанесены: MW – маркер длины ДНК (п.н.); 1 – sE; 2 – dI+II; 3 – dIII.

Fig. 2. Agarose gel analysis of E-protein domains PCR products amplified with specific primers. MW – DNA marker; 1 – sE; 2 – dI+II; 3 – dIII.

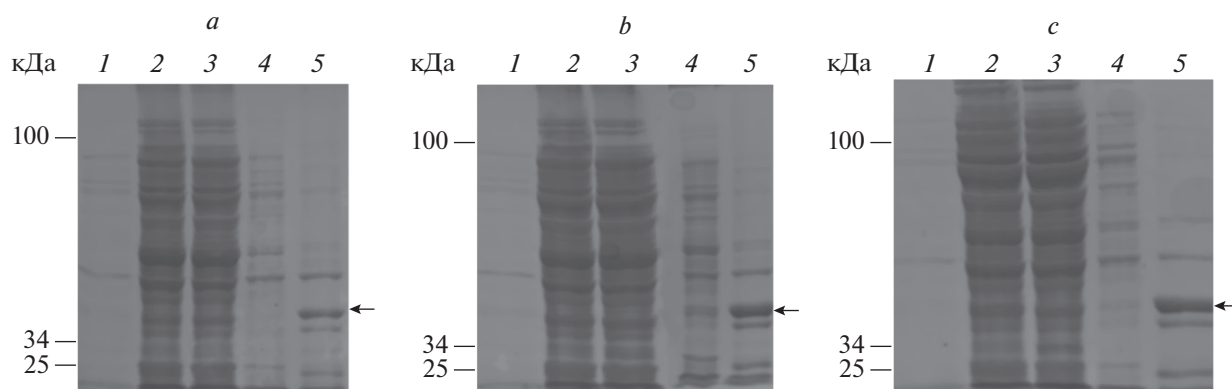


Рис. 3. Электрофоретический анализ продукции рекомбинантного белка sE в клетках *E. coli* после сонификации телец включения. Для экспрессии белка в клетках *E. coli* использована питательная среда LB (a), SOB (b) или ТВ (c). На дорожки нанесены: клеточный лизат до индукции (1), лизированные клетки (2), супернатант после первой (3), второй (4) и третьей (5) солюбилизации сонифицированных телец включения в 8 М мочевины. Гели окрашены Кумасси R-250. Стрелками указан целевой белок.

Fig. 3. Electrophoretic analysis of recombinant sE protein production in *E. coli* cells after sonification of inclusion bodies. LB (a), SOB (b), or TB (c) nutrient mediums were used for protein expression in *E. coli* cells. Lanes were loaded with: cell lysate before induction (1), lysed cells (2), supernatant after the first (3), second (4), and third (5) solubilization of sonified inclusion bodies in 8 M urea. The gels are stained with Coomassie R-250. The target protein is indicated by arrows.

Полученные ампликоны клонировали по сайтам рестрикции *Bgl*II и *Nco*I FD для sE и dI+II, используя вектор pQE-60, и по сайтам рестрикции *Hind*III и *Sac*I FD для dIII, используя вектор pQE-30. Фрагменты ДНК получали после обработки плазмид рестриктазами и очистки в 1.5%-ном агарозном геле. Лигазной смесью, содержащей вектор и вставку в эквимольном соотношении, трансформировали клетки *E. coli* TOP10. Из полученных клонов выделенную плазмидную ДНК проверяли на наличие вставки методом ПЦР. Получили конструкции для экспрессии рекомбинантных белков в бактериальной системе. Отсутствие замен подтверждено методом секвенирования по Сэнгеру.

Подбор среды для экспрессии целевых белков

Одним из факторов, оцениваемых при экспрессии белка, была питательная среда. Для этого при трансформации компетентных клеток и их росте использовали среды: LB, SOB и ТВ (табл. 2). Клетки растили на малом объеме, затем наращивали на большем, индуцировали и осаждали. Полученную клеточную массу обрабатывали ультразвуком, центрифугировали и в полученном супернатанте оценивали продукцию целевых белков, используя электрофорез в 12%-ном ПААГ-SDS (рис. 3).

Как видно из приведенных результатов, наибольший выход целевого белка, рекомбинантно-

го sE, получен при использовании среды ТВ для культивирования клеток-продуцентов.

Подбор условий сонификации

Один из факторов, оцениваемых при извлечении рекомбинантных белков из телец включения в растворимую фракцию, — концентрация мочевины. Для каждого целевого белка провели сонификацию в градиенте концентраций мочевины (рис. 4a–4c). При использовании 6 М мочевины выход белка в раствор достигал максимума.

Используя оптимальный режим сонификации телец включения для извлечения из них целевых белков, далее мы проводили их очистку методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе и анализировали в 12%-ном ПААГ-SDS. Фракции с каждым из целевых продуктов объединяли и проводили рефолдинг путем смены буфера. Относительные концентрации целевых белков определяли в ПААГ с использованием в качестве стандарта BSA в известных концентрациях и программы Genesys Tool (табл. 4).

Анализ связывания рекомбинантных белков с антителами к ВКЭ

Способность рекомбинантных белков связываться с антителами, специфичными к ВКЭ, определяли методами иммуноблотинга и ИФА. Все полученные рекомбинантные домены связыва-

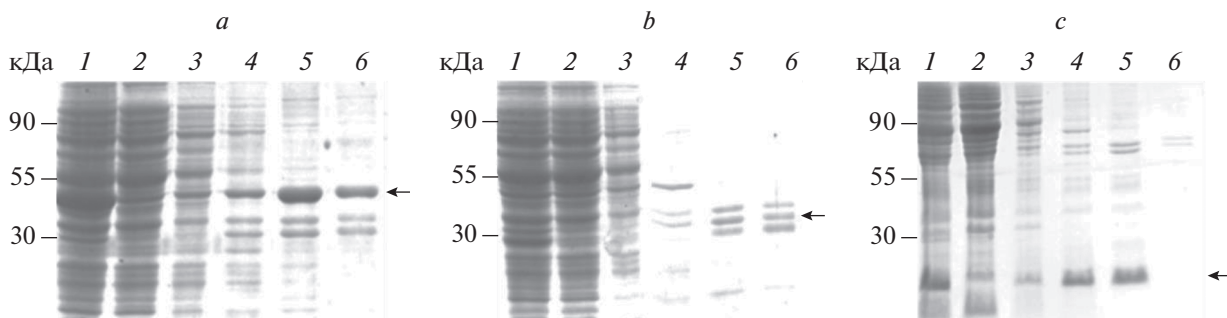


Рис. 4. Подбор концентрации мочевины для извлечения целевых белков из телец включения при сонификации. Представлены результаты электрофоретического анализа рекомбинантных белков sE (a), dI+II (b) и dIII (c). На дорожки нанесены: суспензия индуцированных клеток (1), супернатант после первой солюбилизации (2) и после солюбилизации с 2 (3), 4 (4), 6 (5) и 8 (6) М мочевиной.

Fig. 4. Selection of urea concentration for extraction of target proteins from inclusion bodies during sonification. The results of electrophoretic analysis of recombinant proteins sE (a), dI+II (b), and dIII (c) are presented. Lanes were loaded with suspension of induced cells (1), supernatant after the first solubilization (2) and after solubilization with 2 (3), 4 (4), 6 (5) and 8 (6) M urea.

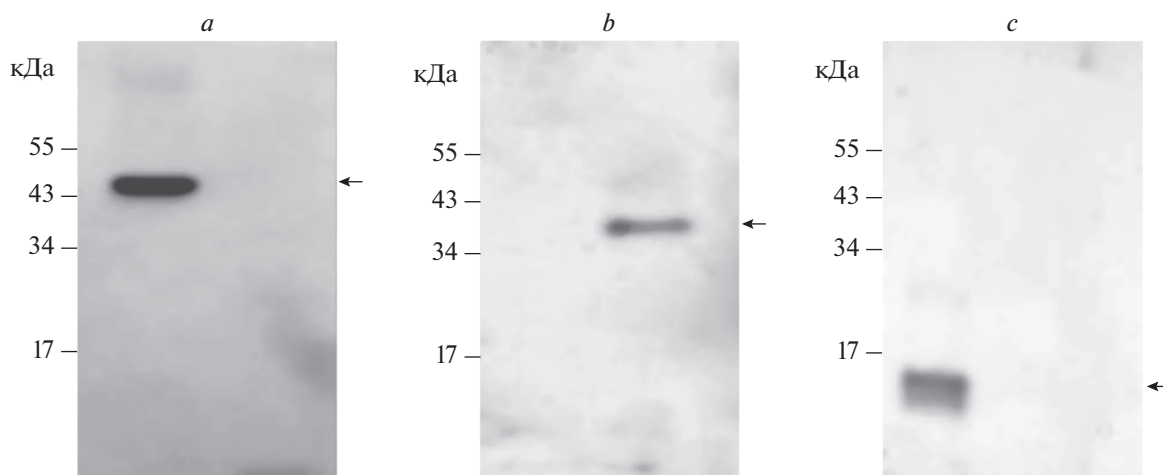


Рис. 5. Результаты иммуноблотинга рекомбинантных белков sE (a), dI+II (b) и dIII (c) с сывороткой мыши, трижды иммунизированной ВКЭ (штамм Абсеттаров) и содержащей анти-ВКЭ-антитела в титре 2.95 по реакции нейтрализации. Для детекции использованы HRP-меченые антитела против IgG мыши (Abcam, Великобритания).

Fig. 5. The results of immunoblotting of recombinant proteins sE (a), dI+II (b), and dIII (c) with mouse anti-TBEV antibodies are presented. Mouse serum contains antibodies in titer of 2.95 by neutralization reaction. Animals were thrice immunized with TBEV (Absettar strain). HRP-labeled anti-mouse IgG antibodies (Abcam, UK) were used for detection.

лись с антителами мышинной сыворотки, содержащей антитела к ВКЭ (рис. 5a–5c).

При анализе сывороток людей методом ИФА использовали образцы целевых белков в концентрации 0.62 мг/мл, отрицательный контроль – лизат клеток СПЭВ – имел ту же концентрацию по общему белку. Как видно из рис. 6, белки dIII и sE проявляли высокую антителосвязывающую активность, в то время как dI+II был менее активен.

Доступные наборы для ИФА, используемые в рутинной серодиагностике антител к ВКЭ, не обладают достаточной специфичностью [10–12]. Логично предположить, что использование отдельных доменов поверхностного гликопротеина Е ВКЭ

позволит снизить риск ложноположительных результатов [14, 15].

Нами показано, что при использовании среды ТВ в клетках *E. coli* эффективно экспрессируются рекомбинантные белки sE, dI+II и dIII поверхностного гликопротеина Е ВКЭ. Сонификация с 6 М мочевиной позволяет достигнуть максимального выхода белка из телец включения в растворимую фракцию. Способность полученных белков взаимодействовать с антителами к ВКЭ продемонстрирована методами иммуноблоттинга и ИФА. Для рекомбинантного белка dI+II зарегистрирована низкая антителосвязывающая активность в использованном формате ИФА,

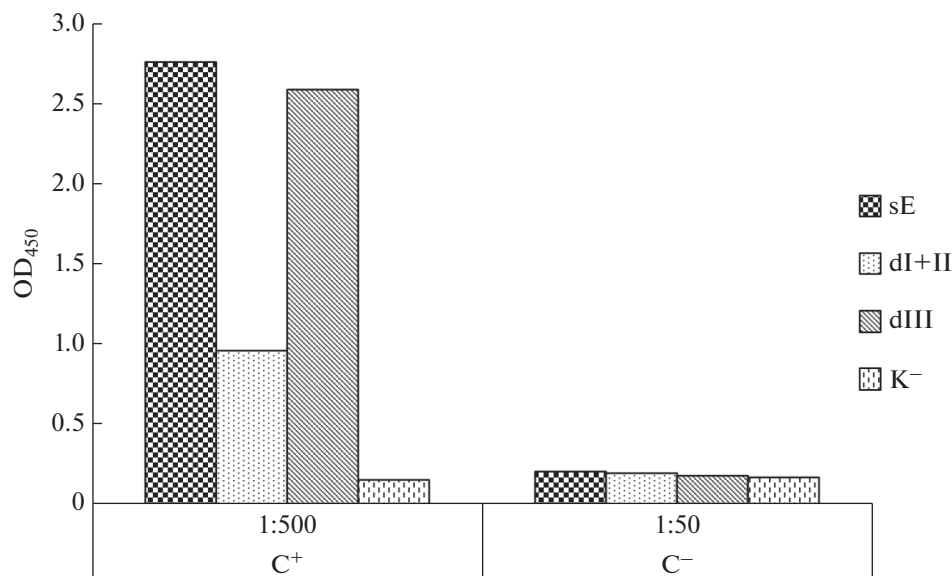


Рис. 6. Анализ способности рекомбинантных доменов белка Е ВКЭ связываться с анти-ВКЭ-антителами человека. Лунки 96-луночного планшета сенсibilizировали растворами белков sE, dI+II или dIII в концентрации 12 нг/лунка; лизатом клеток СПЭВ в концентрации 12 нг общего белка/лунка (отрицательный контроль, K⁻). В анализе использована сыворотка человека, дважды иммунизированного вакциной Клещ-Э-Вак (C⁺), и сыворотка невакцинированного (C⁻) в указанных на рисунке разведениях. Для детекции использованы HRP-меченые антитела против IgG человека (Abcam, Великобритания).

Fig. 6. Analysis of the ability of recombinant domains of the TBEV E protein to bind to human anti-TBEV antibodies in ELISA. Wells of a 96-well plate were sensitized with sE, dI+II or dIII protein at a concentration of 12 ng/well; SPEV cell lysate at a concentration of 12 ng of total protein/well (negative control, K⁻) was used. Sera from people, twice immunized with Tick-E-Vac vaccine (C⁺) and unvaccinated sera (C⁻) at the dilutions shown in the figure were used in the assay. HRP-labeled anti-human IgG antibodies (Abcam, UK) were used for detection.

что может быть обусловлено либо низким уровнем антител к этим доменам гликопротеина Е в сыворотке человека, либо отсутствием гликозилирования рекомбинантного белка, синтезируемого в бактериальной системе экспрессии.

Таким образом, использование разработанной нами методики позволяет получить рекомбинантные домены sE, dI+II и dIII гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита, которые могут найти применение для использования в качестве антигенов в тест-системах для дифференциальной серодиагностики клещевого энцефалита от других флавивирусных инфекций.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Государственное исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России (№ 0564-2019-0001 “РНК-содержащие вирусы: фундаментальные аспекты взаимодействия с клеткой, репликации, эволюции и молекулярной эпидемиологии”).

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Животных содержали в соответствии с Международными рекомендациями по обращению с лабораторными животными (Рекомендации Совета международ-

ных организаций медицинских наук (CIOMS) 1985 года, Директива 2010/63/ЕС и Приложение А к Европейской конвенции ETS № 123). Комитет по биоэтике ФГБНУ “ФНЦ НИЦ им. М.П. Чумакова ИБФ” РАН одобрил все эксперименты, проводимые на животных (протокол № 17 от 01.09.2016).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dobler G., Gniel D., Petermann R., Pfeiffer M. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wien Med. Wochenschr.*, 2012, 162, 230–238. <https://doi.org/10.1007/s10354-012-0100-5>
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: *Государственный доклад*. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022, 340 с.
3. Deviatkin A.A., Karganova G.G., Vakulenko Y.A., Lukashov A.N. TBEV subtyping in terms of genetic distance. *Viruses*, 2020, 12(11), 1240. <https://doi.org/10.3390/v12111240>
4. Mansfield K.L., Horton D.L., Johnson N., Li L., Barrett A.D.T., Smith D.J., Galbraith S.E., Solomon T., Fooks A.R. Flavivirus-induced antibody cross-reactivi-

- ty. *J. Gen. Virol.*, 2011, 92, 2821–2829.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.031641-0>
5. Roy S.K., Bhattacharjee S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Can. J. Microbiol.*, 2021, 67(10), 687–702.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572>
 6. Heinz F.X., Roggendorf M., Hofmann H., Kunz C., Deinhardt F. Comparison of two different enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin M antibodies against tick-borne encephalitis virus in serum and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 1981, 14(2), 141–146.
<https://doi.org/10.1128/jcm.14.2.141-146.1981>
 7. Roggendorf M., Heinz F., Deinhardt F., Kunz C. Serological diagnosis of acute tick-borne encephalitis by demonstration of antibodies of the IgM class. *J. Med. Virol.*, 1981, 7, 41–50.
<https://doi.org/10.1002/jmv.1890070105>
 8. Hofmann H., Heinz F.X., Dippe H., Kunz C. Tick-borne encephalitis: a simple method for detection of antibody production in the brain. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.*, 1985, 260, 132–138.
[https://doi.org/10.1016/s0176-6724\(85\)80109-7](https://doi.org/10.1016/s0176-6724(85)80109-7)
 9. Pazdiora P., Januska J., Kubátová A. [Determination of antibodies after immunization with the FSME-Immun vaccine]. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 2000, 49, 110–114 (in Czech).
 10. Niedrig M., Vaisviliene D., Teichmann A., Klockmann U., Biel S.S. Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies. *J. Clin. Virol.*, 2001, 20, 179–182.
[https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(00\)00178-5](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(00)00178-5)
 11. Weissbach F.H., Hirsch H.H. Comparison of two commercial tick-borne encephalitis virus IgG enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2015, 22, 754–760.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00096-15>
 12. Ackermann-Gäumann R., Tritten M.L., Hassan M., Lienhard R. Comparison of three commercial IgG and IgM ELISA kits for the detection of tick-borne encephalitis virus antibodies. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2018, 9, 956–962.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.031>
 13. Lindenbach B.D., Thiel H.-J., Rice C.M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: *Fields Virology*, 5th edition. Eds D.M. Knipe & P.M. Howley, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 2011, 1101–1151.
 14. Oliphant T., Nybakken G.E., Engle M., Xu Q., Nelson C.A., Sukupolvi-Petty S., Marri A., Lachmi B.E., Olshevsky U., Fremont D.H., Pierson T.C., Diamond M.S. Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile virus envelope protein. *J. Virol.*, 2006, 80, 12149–12159.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01732-06>
 15. Jarmer J., Zlatkovic J., Tsouchnikas G., Vraskikh O., Strauß J., Aberle J.H., Chmelik V., Kundi M., Stiasny K., Heinz F.X. Variation of the specificity of the human antibody responses after tick-borne encephalitis virus infection and vaccination. *J. Virol.*, 2014, 88, 13845–13857.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02086-14>
 16. Ludolfs D., Reinholz M., Schmitz H. Highly specific detection of antibodies to tick-borne encephalitis (TBE) virus in humans using a domain III antigen and a sensitive immune complex (IC) ELISA. *J. Clin. Virol.*, 2009, 45, 125–128.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.03.016>
 17. Ikawa-Yoshida A., Yoshii K., Kuwahara K., Obara M., Kariwa H., Takashima I. Development of an ELISA system for tick-borne encephalitis virus infection in rodents. *Microbiol. Immunol.*, 2011, 55, 100–107.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00296.x>
 18. Sanina N., Chopenko N., Mazeika A., Davydova L., Leonova G., Stenkova A., Uversky V.N., Kostetsky E. Immunogenicity and protective activity of a chimeric protein based on the domain III of the tick-borne encephalitis virus E protein and the OmpF porin of *Yersinia pseudotuberculosis* incorporated into the TI-complex. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19, 2988.
<https://doi.org/10.3390/ijms19102988>
 19. Jääskeläinen A., Han X., Niedrig M., Vaeheri A., Vapalahti O. Diagnosis of tick-borne encephalitis by a mucapture immunoglobulin M-enzyme immunoassay based on secreted recombinant antigen produced in insect cells. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, 4336–4342.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4336-4342.2003>
 20. Levanov L., Vera C.P., Vapalahti O. Prevalence estimation of tick-borne encephalitis virus (TBEV) antibodies in dogs from Finland using novel dog anti-TBEV IgG MAb-capture and IgG immunofluorescence assays based on recombinant TBEV subviral particles. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2016, 7, 979–982.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.05.002>
 21. Inagaki E., Sakai M., Hirano M., Muto M., Kobayashi S., Kariwa H., Yoshii K. Development of a serodiagnostic multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2016, 7, 723–729.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.002>
 22. Girtl P., Bestehorn-Willmann M., Zange S., Borde J.P., Dobler G., von Buttler H. Tick-borne encephalitis virus nonstructural protein 1 IgG enzyme-linked immunosorbent assay for differentiating infection versus vaccination antibody responses. *J. Clin. Microbiol.*, 2020, 58(4), e01783-19.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01783-19>
 23. Salat J., Mikulasek K., Larralde O., Pokorna Formanova P., Chrdele A., Haviernik J., Elsterova J., Teislerova D., Palus M., Eyer L., Zdrahal Z., Petrik J., Ruzek D. Tick-borne encephalitis virus vaccines contain non-structural protein 1 antigen and may elicit NS1-specific antibody responses in vaccinated individuals. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8, 81.
<https://doi.org/10.3390/vaccines8010081>
 24. Rizzo S., Mora-Cárdenas E., Faoro V., D'Agaro P., Edomi P., Marcello A., Sblattero D. A method for rapid and high-yield production of the tick-borne encephalitis virus E and DIII recombinant proteins in *E. coli* with preservation of the antigenic properties. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2019, 10, 935–941.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.021>
 25. McKeating J. Neutralization of virus. *Methods Mol. Biol.*, 1992, 8, 89–93.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-191-8:89>
 26. Tuchynskaya K., Volok V., Illarionova V., Okhezin E., Polienko A., Belova O., Rogova A., Chernokhaeva L., Karganova G. Experimental assessment of possible factors associated with tick-borne encephalitis vaccine failure. *Microorganisms*, 2021, 9(6), 1172.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9061172>

Recombinant Glycoprotein E of Tick-Borne Encephalitis Virus for a Developing Differentiated Test System

V. S. Baryshnikova^{a, #, ##}, Yu. V. Turchenko^a, A. A. Shishova^{a, b},
A. S. Klimentov^a, K. K. Tuchynskaya^a, and G. G. Karganova^{a, c}

^a*Federal State Autonomous Scientific Institution “Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819 Russia*

^b*Institute of Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 117418 Russia*

^c*Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education “Russian Medical Academy of Continuous Professional Education” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, 125445 Russia*

[#]*e-mail: baryshnikova_vs@chumakovs.su*

^{##}*e-mail: baryshnikova.vs@bk.ru*

Abstract—Several representatives of the *Flavivirus* genus circulate on the territory of the Russian Federation, among which the tick-borne encephalitis virus is the most common. The combined foci of flavivirus infections in Russia and expanding tourist flows to regions endemic for other flaviviruses raise the question of differential diagnosis. Existing commercial test systems based on surface glycoprotein E do not provide reliable differentiation between flaviviruses. It is believed that domains I and II of the E protein contain cross-reactive epitopes, and the immunoglobulin-like domain III is species-specific. It is possible to increase the differentiating ability of test systems by using individual domains of this protein. We have searched for and optimized a method for obtaining recombinant domains of the glycoprotein E of the tick-borne encephalitis virus.

Keywords: glycoprotein E, tick-borne encephalitis virus, recombinant proteins