

Получение рекомбинантного аналога гликопротеина Е вируса *Varicella zoster*: клонирование, экспрессия и исследование антигенных свойств

Г.И. Алаторцева¹ (alatortseva@gmail.com), А.В. Сидоров¹ (sashasidorov@gmail.com), Л.Н. Нестеренко¹ (Innesterenko@pochta.ru), Л.Н. Лухверчик¹ (lexx294@yandex.by), И.И. Амиантова¹ (amianti@yandex.ru), В.В. Доценко¹ (VerraMal@gmail.com), Хыу Фонг Фам¹ (graecumestnonlegiturhp2004@gmail.com), А.В. Милованова¹ (rose_48@mail.ru), О.Б. Выливанная² (Vylivannaya@dcli.ru), А.С. Казанова¹ (pendelbus@gmail.com), В.В. Лавров^{1,3} (v.f.lavrov@inbox.ru), В.В. Зверев¹ (vitalyzverev@outlook.com)

¹ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва

²ГБУЗ «Диагностический центр лабораторных исследований» Департамента здравоохранения города Москвы

³ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, Москва

Резюме

Получен рекомбинантный антиген GE, содержащий слитый с β -галактозидазой *E. coli* фрагмент (Gly48 – Glu135) гликопротеина Е (gE) вируса *Varicella zoster* (VZV). Антигенная специфичность рекомбинантного антигена подтверждена с помощью вестерн-блоттинга и конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) в сравнении с его коммерческими аналогами и натуральными вирусными антигенами. Выявлено взаимодействие рекомбинантного белка GE с IgG кроликов, иммунизированных вакцинным штаммом вируса. Методом ИФА показано взаимодействие белка GE с 66% сывороток крови больных опоясывающим лишаем и 35% сывороток лиц из групп сравнения, в том числе, сывороток, содержащих антитела к другим вирусам герпеса, сывороток здоровых доноров, а также пациентов с различными формами кишечной патологии. Таким образом, экспериментально обоснована возможность применения полученного нами рекомбинантного GE VZV, в качестве антигена в диагностических и исследовательских целях.

Ключевые слова: вирус *Varicella zoster*, ORF68, гликопротеин Е, рекомбинантный антиген, иммуноферментный анализ

Recombinant Analogue of Varicella Zoster Virus Glycoprotein E: Cloning, Expression and Studying of AntigEn Properties

G.I. Alatorseva¹ (alatortseva@gmail.com), A.V. Sidorov¹ (sashasidorov@gmail.com), L.N. Nesterenko¹ (Innesterenko@pochta.ru), L.N. Luhverchik¹ (lexx294@yandex.by), I.I. Amiantova¹ (amianti@yandex.ru), V.V. Docenko¹ (VerraMal@gmail.com), Pham Huy Phong¹ (graecumestnonlegiturhp2004@gmail.com), A.V. Milovanova¹ (rose_48@mail.ru), O.B. Vylivannaya² (Vylivannaya@dcli.ru), A.C. Kazanova¹ (pendelbus@gmail.com), V.V. Lavrov^{1,3} (v.f.lavrov@inbox.ru), V.V. Zverev¹ (vitalyzverev@outlook.com)

¹Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow

²State Budgetary Institution of Public Health «Diagnostic center of laboratory researches», Department of health of Moscow

³State Educational Institution of Additional Professional Education «Medical Academy of Postgraduate Studies», Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Abstract

We made recombinant antigen GE containing fragment of VZV glycoprotein E (Gly48 – Glu135) fused to *E. coli* beta-galactosidase and confirmed its antigen specificity by Western blotting and competitive-inhibition enzyme immunoassay (EIA) in comparison with commercial analogues and natural viral antigens. We showed interaction of recombinant GE protein with IgG antibodies from rabbits immunized by vaccine viral strain. GE protein also specifically reacted in ELISA with 66% of sera from zoster patients and 35% of sera from control groups including sera containing antibodies to other herpes viruses, sera from healthy donors, and sera from patients with different forms of intestinal disorders. Consequently, we demonstrated possibility of application of our recombinant GE VZV as antigen for diagnostics and research use.

Key words: Varicella Zoster Virus, VZV; open reading frame 68, ORF 68; glycoprotein G; recombinant antigen; enzyme immunoassay

Введение

Выявление в сыворотке крови больного VZV (вирус *Varicella zoster*)-инфекцией с помощью ИФА

и иммуноблоттинга специфических противовирусных антител является основным диагностическим «маркером» заболевания ветряной оспой или опо-

ясывающим герпесом. При этом часто возникающие трудности с интерпретацией результатов лабораторной диагностики VZV-инфекции с помощью серологических тестов связаны, главным образом, с использованием в качестве компонентов тест-систем цельновирионных препаратов, обладающих высокой перекрестной реактивностью с другими представителями семейства *Herpesviridae*. Например, гликопротеин В VZV и, по-видимому, некоторые другие белки данного вируса имеют общие эпитопы с антигенами вируса простого герпеса (ВПГ) [1]. Подходом, решающим проблему перекрестного реагирования с антителами специфичными к другим вирусам герпеса, является включение в состав иммуноферментных тест-систем (ИФТС), выявляющих антитела к VZV, гликопротеина Е (gE) – структурного белка оболочки этого вируса и одного из основных антигенов VZV [2]. Гликопротеин Е – продукт гена *orf68*, синтезируется в зараженных клетках в больших количествах и является высокоиммуногенным [3, 4]. В отличие от других вирусных антигенов этот белок имеет низкую степень генетического родства с белками вируса простого герпеса и поэтому его применение помогает повысить специфичность серологических тестов [5]. В настоящее время в ИФТС для выявления антител к VZV в качестве антигенной основы могут быть использованы натуральные вирусные антигены, рекомбинантные белки или синтетические пептиды. Преимущества применения рекомбинантных антигенов связаны с возможностью иметь в распоряжении свободные от примесей других вирусных антигенов аналоги индивидуальных вирусных белков в количествах, недоступных в случае применения натуральных и синтетических антигенов.

Изучение антигенных свойств рекомбинантных или синтетических аналогов природных вирусных антигенов является основополагающим этапом создания на их основе диагностических ИФТС.

Цель работы – получение рекомбинантного аналога полипептида Е VZV и сравнение его антигенных свойств с коммерческими аналогами и натуральными вирусными антигенами.

Материалы и методы

Ферменты и реактивы

Вода, очищенная на приборе «Simplicity UV» Merck Millipore, Франция) до конечного удельного сопротивления 18 мегаОм/см. Высокоточная ДНК-полимераза Phusion (кат. № F-530S, компания «Finnzymes», Финляндия). Эндонуклеазы рестрикции фирмы «Ферментас» (подразделение компании «Thermo Fisher Scientific», США). Смеси нуклеотидтрифосфатов, буферные растворы для проведения работ по клонированию, синтезу и очистке праймеров, а также определение нуклеотидных последовательностей ДНК плазмид заказывали в компаниях ЗАО «Синтол» и ООО «Евроген»,

Россия. Для неспецифической ДНК-амплификации использовали набор «GE nomi-Phi DNA Amplification Kit» (кат. № 25-6600-31, компания «GE Healthcare Biosciences, США»).

Бактериальные штаммы, культуры клеток

Клетки штамма *E. coli* PLT90: F⁺ lon: Tn10 (Tet^R) endA1 malPpa: [PR, c1857] Mal⁺, imm) thi hsdR17) [6], трансформированные векторной плазмидой pEL5c [7].

Выделение тотальной и плазмидной ДНК

Тотальную ДНК из вакцинных и лабораторных образцов выделяли с помощью набора для выделения ДНК «Diatom DNA Prep 100» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) согласно рекомендациям производителя. ПЦР-продукты, фрагменты ДНК, используемые при клонировании, очищали на колонках «QIAquick® PCR Purification Kit» (кат. 281040, Qiagen, Германия). Плазмидную ДНК отдельных бактериальных клонов выделяли из 5 мл ночной культуры на колонках «PureYield™ Plasmid Miniprep System» (кат. A1220, «Promega», США) по протоколу производителя.

Иммунореагенты

Рекомбинантный антиген gE VZV, любезно предоставленный ООО «НПО Диагностические системы», Россия (кат.№ АТАГ 100), живые аттенуированные вакцины против ветряной оспы «Varilrix» (GlaxoSmithKline Biologicals, Бельгия) и «Okavax» (Biken Institute, Япония). Рекомбинантный антиген gp41 из коллекции рекомбинантных антигенов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (НИИВС им. И.И. Мечникова). «Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к гликопротеину Е вируса Варицелла-Зостер в сыворотке (плазме) крови «ВектоVZV-gE-IgG» (ПУ № РЗН 2014/1438, кат № D-2186, ЗАО «Вектор-Бест», Россия). «Набор реагентов для выявления антител класса G к вирусу ветряной оспы методом иммуноферментного анализа «ИФА-Ветряная оспа-IgG» (ПУ № 2007/28641с, кат. № 27.03, ЗАО «ЭКОлаб», Россия). «Набор реагентов для выявления низкоавидных IgG-антител к вирусу простого герпеса «Биопрайм-ВПГ» (ПУ № РЗН 2013/672, ЗАО БТК «Биосервис», Россия).

Серологический материал

Образцы сывороток крови, содержащие IgG-антитела к вирусу Эпштейн-Барр (ВЭБ), ВПГ-1,2 и цитомегаловирусу (ЦМВ), аттестованные на содержание специфических антител с помощью наборов реагентов и анализаторов BioPlex 2200 TORC (США), Abbott Architect (США), Liason («DiaSorin», Италия) и наборов реагентов производства «Euroimmune» (Германия) из Диагностического центра лабораторных исследований, Москва. Образцы сывороток крови больных опоясывающим лишаем и здоровых лиц из клинко-консультацион-

ного отделения НИИВС им. И.И. Мечникова. Образцы сывороток пациентов с кишечной патологией из Государственного научного центра колопроктологии Росмедтехнологий.

Вирусы

Вакцина для профилактики ветряной оспы «Varilrix» (ПУ № ЛСП-001354/08, GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Бельгия). Вакцина против ветряной оспы живая «Okavax» (ПУ № ЛСП-001306/10, Biken Institute, Япония). ЦМВ, ВПГ- 1, VZV из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова.

Выделение и очистка рекомбинантных полипептидов

Ночные культуры клеток *E. coli*, содержащие векторную или рекомбинантную плазмиду, разводили в 100 раз средой LB с 100 мкг/мл ампициллина и выращивали при постоянной аэрации при температуре +30 °С. После достижения культурой оптической плотности 0,5 о.е./мл при $\lambda = 550$ нм, экспрессию гибридных генов индуцировали повышением температуры культивирования до +39 °С в течение 2 часов. Клетки разрушали добавлением хлороформа, фракцию телец-включений выделяли центрифугированием и обрабатывали ультразвуком в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl pH 8,0 и 10 мМ Na-ЭДТА. Дальнейшую процедуру выделения и очистки проводили по ранее описанному методу [8, 9].

Иммунизация лабораторных животных

Кроликам-самцам породы «Шиншилла» массой 2,5 – 3,0 кг в подколенные лимфатические узлы задних конечностей, подкожно и в подушечки стоп задних конечностей, вводили по 0,3 мл эмульсии, содержащей 10 мкг/мл вакцинного штамма VZV Varilrix с полным адъювантом Фрейнда. Через 8 недель проводили повторную иммунизацию путем подкожного введения в каждую конечность по 5 мкг антигена с неполным адъювантом Фрейнда. Подкожные инъекции антигена в физиологическом растворе повторяли с недельным интервалом, контролируя нарастание титра антител с помощью ИФА. Забор крови осуществляли через 1 неделю после последней иммунизации.

Выделение и очистка фракции IgG из сывороток крови животных

Гамма-глобулиновую фракцию сывороток крови иммунизированных и неиммунизированных кроликов осаждали сульфатом аммония. Затем фракцию иммуноглобулинов класса G подвергали дополнительной очистке методами ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе и аффинной хроматографии на сефарозе «Cibacron Blue» [10, 11].

Электрофорез белков

Проводили по методу Лэммли [12] в полиакриламидном геле.

Твердофазный непрямой иммуноферментный метод

Рекомбинантные полипептиды или β -галактозидазу *E. coli* в концентрации 4 мкг/мл в 10 мМ карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,6 сорбировали в лунки 96-луночных полистироловых планшетов («Биомедикал», Россия) в течение 16 часов при температуре +4 °С. Сыворотки крови людей или иммунизированных кроликов разводили в 100 раз в растворе 0,1 М фосфатно-солевого буфера pH 7,5, содержащем 0,1% Твин 20 и лизат культуры *E. coli*, и вносили в лунки планшетов с иммуносорбентом. Связывание антител с рекомбинантным белком выявляли с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена моноклональных антител к IgG человека («Сорбент-Сервис», Россия), антител козы к IgG кролика (Sigma Aldrich, Кат № 6154). В качестве хромогена использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Оптическую плотность раствора в каждой лунке измеряли с помощью спектрофотометра Multiscan Ascent («ThermoLabsystems», США).

Конкурентный твердофазный непрямой метод иммуноферментного анализа с натуральным VZV

Предварительно пул сывороток разводили в 160 раз в 0,05 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,5. Готовили ряд последовательных разведений от 1:10 до 1:10 000 натурального вируса в 0,05 М ФСБ, pH 7,5. В лунках дополнительного планшета смешивали по 150 мкл разведенной сыворотки и жидкости, содержащей в соответствующем разведении натуральный вирус. Эту смесь инкубировали в течение 60 минут при +37 °С, а затем по 100 мкл смеси из каждой лунки переносили в соответствующие лунки другого планшета с адсорбированным на их дне рекомбинантным белком gE. Планшет инкубировали в течение 60 минут при +37 °С. Все остальные операции проводили по схеме непрямого ИФА, описанной выше:

- с рекомбинантным белком gE VZV (НПО «Диагностические системы») и рекомбинантным антигеном VZV, используемым для серийного производства иммуносорбента в ИФТС «ВектоVZV-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест»). Предварительно пул сывороток разводили в 160 раз в ФСБ, pH 7,5. Готовили ряд разведений полученного рекомбинантного GE в ФСБ, pH 7,5, в концентрации 1,8 мкг/мл до 0,2 нг/мл с шагом разведения 1:5. В лунках дополнительного планшета смешивали по 150 мкл разведенных сывороток и соответствующие разведения рекомбинантного GE и инкубировали эту смесь в течение 60 минут при температуре +37 °С. По окончании инкубации по 100 мкл содержимого лунок переносили в соответствующие лунки планшетов с предварительно адсорбированным рекомбинантным gE VZV (НПО «Диагностические системы») в концентрации 1 мкг/мл или в лунки планшета из набора «ВектоVZV-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест»). Планшеты инкубировали в течение 60 минут

при +37 °С. Все остальные операции проводили по схеме непрямого ИФА, описанной выше.

- с натуральными антигенами ЦМВ, ВПГ-1 и β -галактозидазой *E. coli*. Пул сывороток разводили в 160 раз в ФСБ, pH 7,5. Предварительно все препараты вирусных белков были приведены к одинаковой оптической плотности $A_{280} = 1,0$ ЕОП/мл путем разведения в 0,05М ФСБ, pH 7,5. Готовили ряд последовательных разведений исследуемых антигенов в ФСБ, pH 7,5, от 1/10 до 1/10000 с шагом разведения 1:10. Для сравнения параллельно ставили конкурентную реакцию, используя раствор полученного рекомбинантного GE, разведенного до оптической плотности $A_{280} = 1,0$ ЕОП/мл, в разведениях от 1/10 до 1/10000 с шагом 10. В лунках дополнительного планшета, смешивали по 150 мкл разведенных сывороток, последовательных разведений β -галактозидазы *E. coli*, натуральных антигенов ВПГ-1 и ЦМВ, инкубируя эту смесь в течение 60 минут при +37 °С. По окончании инкубации по 100 мкл содержимого лунок переносили в соответствующие лунки планшета с предварительно адсорбированным рекомбинантным gE в концентрации 5 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 60 минут при температуре +37 °С. Все остальные операции проводили по схеме непрямого ИФА, описанной выше.

Вестерн-блоттинг

Иммунизацию белков на нитроцеллюлозной мембране проводили по ранее описанному методу [13] на оборудовании и в соответствии с рекомендациями компании Bio-Rad, США. Нитроцеллюлозную мембрану с иммобилизованными белками инкубировали в течение 1 часа в блокирующем растворе, содержащем 5% сухого обезжиренного молока в буфере (20 мМ TrisHCl pH7,5, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин 80), затем мембрану с сывороткой крови человека в 100-кратном разведении в том же буфере с добавлением лизата бактерий *E. coli* инкубировали в течение 1 часа при температуре +37 °С. Связывание антител с иммобилизованными белками выявляли с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена моноклональных антител к IgG человека (фирма Сорбент-Сервис, Россия, Кат. № CH1). В качестве хромогена использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Результат учитывали визуально.

Биоинформационные методы

Для анализа и обработки нуклеотидных последовательностей, дизайна ДНК-праймеров для амплификации, ДНК-пробы для оценки количества матричной ДНК вируса при ПЦР-амплификации использовали пакет программ Vector NTI.

Выбор матричной ДНК для клонирования

Из препаратов вакцин Varilrix и Okavax была выделена тотальная ДНК. Количество вирусной ДНК в образцах оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в

модификации TaqMan. С этой целью были рассчитаны и синтезированы ДНК-праймеры и ДНК-проба к последовательности фрагмента гена orf38. Оказалось, что в выделенных образцах вирусная ДНК содержится в следовых количествах, определяемых на пределе чувствительности метода ПЦР-РВ. Для повышения содержания вирусной ДНК в общем пуле тотальной ДНК был применен метод неспецифической амплификации ДНК со случайными праймерами с использованием набора Genomi-Phi DNA Amplification Kit (GE Healthcare Biosciences). После неспецифической амплификации у образца наблюдалось снижение порогового цикла ПЦР-РВ не менее, чем на 10 значений. Поскольку наиболее воспроизводимые результаты были получены при использовании в качестве исходного источника ДНК вакцинного препарата Varilrix, он был выбран как источник получения матричной ДНК для клонирования фрагментов гена orf68.

Клонирование фрагмента генов orf67 и BBO

Фрагмент гена VZV, содержащий открытые рамки считывания 67 и 68, был клонирован с помощью ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Phusion и ДНК-праймеров, фланкирующих выбранный участок генома вируса. ПЦР-продукт обрабатывали Taq ДНК-полимеразой, очищали на колонках Qiagen и вставляли в вектор pGEM-Teasy (Promega) с помощью А/Т-клонирования в клетках *E. coli* CC001 (XL Blue, Евроген, Россия). Нуклеотидную последовательность клонированного фрагмента верифицировали с помощью секвенирования.

Субклонирование вирусной ДНК, кодирующей фрагмент белка gE, в прокариотической системе экспрессии

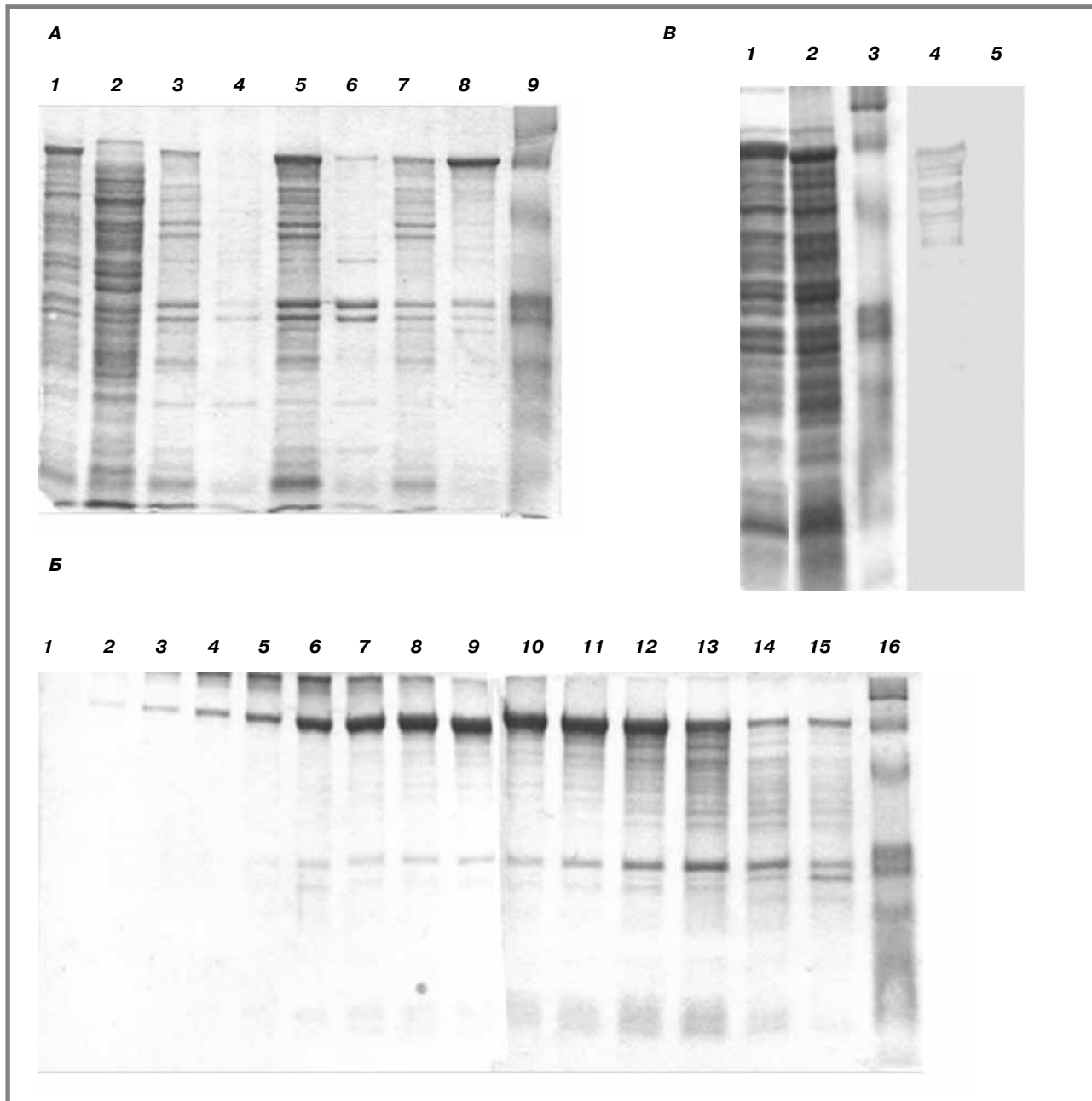
Полученная плазмида pGEM67-68 была использована в качестве матричной ДНК в экспериментах по субклонированию диагностически значимого фрагмента гена orf68 в экспрессирующей системе *E. coli*. С этой целью были сконструированы специфические праймеры, содержащие на 5'-концах сайты рестрикции эндонуклеаз *Bam*HI и *Pst*I. Искомый фрагмент ДНК амплифицировали с помощью ДНК-полимеразы Phusion, ПЦР-продукт обрабатывали рестриктазами *Bam*HI и *Pst*I и клонировали по соответствующим сайтам рестрикции в вектор pEL5c с последующей трансформацией клеток *E. coli* PLT90, селекцией клонов на устойчивость к ампициллину, выделением плазмидной ДНК и определением нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента.

Выделение рекомбинантного белка

Степень очистки рекомбинантного антигена GE и β -галактозидазы *E. coli* контролировали на отдельных стадиях процесса выделения с помощью электрофореза в 10 % SDS-полиакриламидном геле. В результате проводимых манипуляций в получаемых препаратах последовательно повышалось содержание целевого продукта по отношению

Рисунок 1.

Электрофорез в 10% SDS-полиакриамидном геле: А) дорожки № 1 – 8 – фракции белка GE по стадиям выделения, № 9 – маркеры молекулярных масс; Б) дорожки №№ 1-15 – фракции белка GE после хроматографической очистки; В) электрофорез (№ 1 – 3) и Вестерн-блоттинг с положительной сывороткой (№ 4, 5): дорожки № 1, 4 – лизат телят включений, содержащих рекомбинантный белок GE, дорожки № 2, 5 – лизат клеток *E.coli* PLT90, трансформированных векторной плазмидой pEL5с, 3 – маркеры молекулярных масс



к остальным клеточным белкам (рис. 1, А). При исследовании фракций белка, получаемых на этапе хроматографической очистки, происходило отделение рекомбинантных полипептидов от основной массы примесных белков (рис. 1, Б).

Результаты и их обсуждение

В результате клонирования фрагмента генов *orf67* и *orf68* вируса ветряной оспы была получена плазмида pGEM67-68, содержащая фрагмент генома вируса, кодирующего С-концевой участок белка ORF67 и полноразмерный белок ORF68.

Плазмида pEL5с-68 для экспрессии диагностически значимого фрагмента гена *orf68* в виде слитного с β -галактозидазой *E. coli* белка была получена в процессе субклонирования в прокариотической системе экспрессии вирусной ДНК, кодирующей фрагмент белка gE

Анализ антигенной специфичности рекомбинантного белка gE методами ИФА и вестерн-блоттинга

Первичный анализ антигенной активности рекомбинантного полипептида GE, содержащего

слитный с β -галактозидазой *E. coli* фрагмент (Gly48 – Glu135) белка gE VZV, проводили с использованием содержащих IgG-антитела к VZV образцов сывороток крови пациентов больных опоясывающим лишаем. Были отобраны образцы, взаимодействующие с рекомбинантным полипептидом в ИФА. Исследование в иммуноблоттинге показало взаимодействие этих образцов с иммобилизованными на нитроцеллюлозной мембране белками лизата телец включений из биомассы штамма-продуцента рекомбинантного белка. Окрашивание происходило в зоне соответствующей молекулярной массы и отсутствовало в лизате клеток *E. coli*, трансформированных векторной плазмидой без вставки вирусоспецифической последовательности ДНК (рис. 1, В).

Из гипериммунных сывороток кроликов, иммунизированных вакциной Varilrix, методами гель-фильтрации, ионнообменной и аффинной хроматографии выделены фракции IgG. Степень очистки на этапах выделения антител контролировали с помощью электрофореза в 10% SDS-полиакриламидном геле и с помощью исследования фракций после хроматографической очистки методом непрямого ИФА.

Методом ИФА показана специфичность взаимодействия очищенных IgG кроликов, иммунизированных вакцинным штаммом Varilrix, с полученным рекомбинантным полипептидом GE, вакцинным штаммом Окавак и рекомбинантными полипептидами сравнения. Титры гипериммунной сыворотки составили 1:1600 в реакции с натуральным антигеном и 1:400 – с рекомбинантными антигенами. С рекомбинантным белком gp41 ВИЧ-1, использованным в качестве отрицательного контрольного антигена, антитела кроликов, иммунизированных вакцинным штаммом VZV, не взаимодействовали.

Антигенную специфичность рекомбинантного полипептида GE исследовали конкурентным методом ИФА в сравнении с его коммерческими аналогами – рекомбинантным полипептидом gE (ООО «Диагностические системы», Россия) и рекомбинантным антигеном из набора «ВектоVZV-gE-IgG» а также с натуральным антигеном VZV из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова. В качестве отрицательных контрольных антигенов использовали β -галактозидазу *E. coli*, натуральные антигены ВПГ-1 и ЦМВ. При проведении анализа применяли смесь сывороток крови больных опоясывающим лишаем, в которых были выявлены антитела к полученному рекомбинантному полипептиду GE, рекомбинантным полипептидам сравнения, натуральным антигенам VZV из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова, натуральным антигенам ЦМВ, ВПГ-1 из набора ЗАО «ЭКОлаб». Анализ результатов конкурентного ИФА показал, что с увеличением количества натурального антигена VZV происходит практически полное подавление связывания сывороточных антител с адсорбированным рекомбинантным белком GE, что указывает на взаимодействие антител с идентичными эпитопами на натуральном и рекомбинантном антигенах (рис. 2,

А). Увеличение количества рекомбинантного антигена GE снижало связывание сывороточных антител с адсорбированными коммерческими рекомбинантными белками gE VZV (рис. 2, Б). Конкурентный анализ с различными количествами β -галактозидазы *E. coli* и натуральных антигенов других вирусов герпеса продемонстрировал отсутствие их влияния на связывание сывороточных антител с рекомбинантным белком GE, адсорбированным на полистироле (рис. 2, В), что свидетельствует об отсутствии общих эпитопов у данного рекомбинантного белка и антигенов ВПГ-1 и ЦМВ. Таким образом, в реакциях с коммерческими аналогами и натуральным антигеном VZV показана антигенная специфичность рекомбинантного полипептида GE, что свидетельствует о подобии антигенных детерминант полученного нами антигена и антигенов сравнения (натурального и рекомбинантного). По-видимому, ответственные за это взаимодействие эпитопы являются конформационно стабильными и представлены линейной структурой как в составе вирусного белка, так и в составе его рекомбинантного аналога, так как методы выделения рекомбинантных белков, накапливающихся в составе телец-включений в биомассах штаммов-продуцентов *E. coli*, включают обработку денатурирующими агентами.

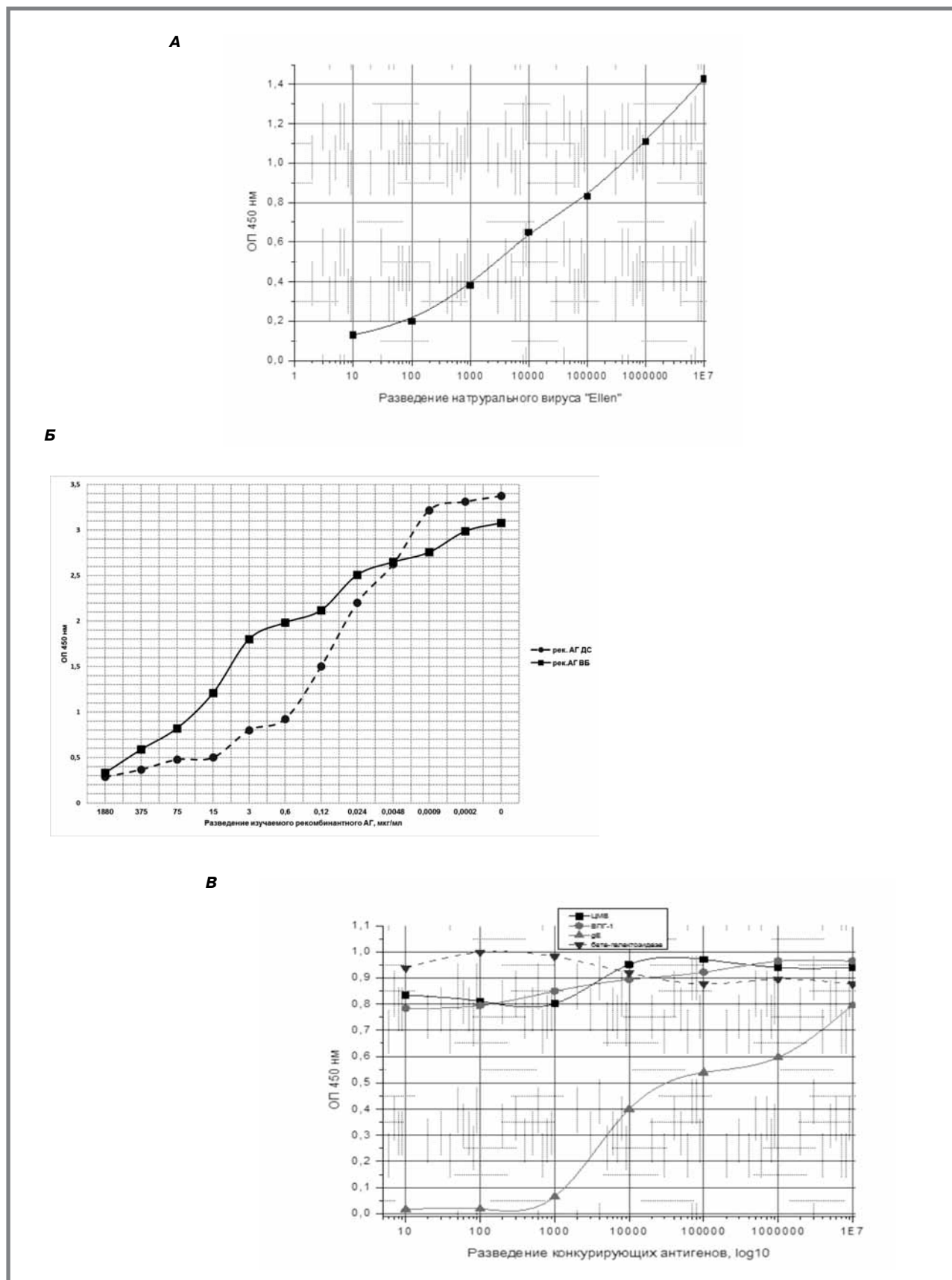
Тестирование клинических образцов

Для оценки диагностической значимости полученного рекомбинантного белка было отобрано 38 образцов сыворотки крови от лиц старше 30 лет с клиническими признаками опоясывающего лишая. Данные образцы были аттестованы как положительные в тест-системе «ИФА – Ветряная оспа – IgG» (ЗАО «ЭКОлаб»). Все позитивные образцы были исследованы на взаимодействие с полученным рекомбинантным антигеном GE методом непрямого ИФА. Полученные результаты показали, что 25 из 38 исследованных сывороток (66%) взаимодействовали с изучаемым рекомбинантным антигеном, что согласуется с данными о частоте обнаружения антител к данному белку у больных VZV-инфекциями, которая у разных исследователей составляет от 66 до 94%. [14, 15].

В качестве группы сравнения исследовали сыворотки крови 65 больных с различными формами кишечной патологии, не имевших признаков VZV-инфекции, 32 здоровых доноров, а также сыворотки крови, содержащие IgG к ВПГ-1 и ВПГ-2 (n = 20), ВЭБ (n = 5) и ЦМВ (n = 15). С помощью ИФА IgG к рекомбинантному антигену GE выявлены в 35% образцов сывороток крови пациентов из групп сравнения. Поскольку исследуемый полипептид является гибридным белком, содержащим в своем составе β -галактозидазу *E. coli*, было проведено исследование взаимодействия GE-позитивных и GE-негативных образцов с β -галактозидазой *E. coli*. В реакциях с β -галактозидазой значения оптической плотности не превышали порогового значения.

Рисунок 2.

Конкурентный иммуноферментный анализ с натуральным антигеном VZV (А), рекомбинантными белками gE VZV различных производителей (Б), и лизатными вирусными антигенами ЦМВ, ВПГ-1 и β -галактозидазой *E. coli* (В)



Несовпадение результатов, полученных при использовании натурального антигена (набор «ИФА –

Ветряная оспа – IgG») и полученного нами рекомбинантного антигена GE, можно объяснить серологиче-

скими перекрестными реакциями между ВПГ-1 и VZV. Так, по данным Grahn A. с соавт. [5] причиной перекрестных реакций между антителами, реагирующими с VZV и ВПГ-1 при использовании цельновирионного антигена VZV, является наличие общих эпитопов с белками ВПГ-1 у некоторых белков, в том числе и у иммунодоминантного белка VZV гликопротеина gB, являющегося вторым по значимости после gE [16]. При использовании gE VZV в качестве антигена для ИФА, проблема перекрестной реактивности становится менее актуальной из-за относительно низкой степени его гомологии с gE ВПГ-1. Сравнительный анализ двух белков – gE ВПГ-1 и gE VZV [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi] показал только 33% гомологии аминокислотных последовательностей у данных антигенов и полное отсутствие общих антигенных детерминант у gE VZV и других белков ВПГ-1.

Учитывая вышеизложенное, нами была проведена оценка содержания антител к ВПГ-1 в исследуемых сыворотках больных опоясывающим лишаем методом ИФА с использованием тест-системы «БиоПрайм-ВПГ» (ЗАО БТК «Биосервис») на основе натурального антигена ВПГ-1. Анализ полученных результатов показал, что все исследованные сыворотки содержали IgG к ВПГ-1. При этом в 8 из 13 сывороток, содержащих антитела к натуральному антигену VZV и не содержащих антител к рекомбинантному GE, выявлены высокоавидные антитела к ВПГ-1. В трех GE-положительных образцах обнаружены низкоавидные антитела к ВПГ-1, что может свидетельствовать о наличии у этих пациентов смешанной инфекции, вызванной VZV и ВПГ-1. Полученные результаты подтверждают данные о перекрестной реактивности между белками VZV и ВПГ-1 и ее влиянии на результаты лабораторной диагностики VZV-инфекции и инфекции, вызываемой ВПГ.

Можно заключить, что специфичность рекомбинантного белка GE VZV, значительно выше, чем других антигенов, присутствующих в составе исследованных цельновирионных препаратов VZV, и перекрестной реактивности с антителами к ВПГ-1 у него нет. Исходя из этого, рекомбинантный GE является перспективным объектом при изучении особенностей гуморального иммунитета к VZV.

Выводы

1. В бактериальной системе экспрессии был получен рекомбинантный антиген, содержащий фрагмент гликопротеина gE VZV (Gly48 – Glu135).
2. Экспериментально обоснована возможность применения рекомбинантного полипептида GE для детекции антител к VZV. Использование данного антигена при конструировании диагностических ИФТС, а также при отборе и анализе различных биоматериалов (гипериммунных сывороток, моноклональных антител и т.д.) с целью решения исследовательских и прикладных задач является весьма перспективным.

Так как полипептид, содержащий антигенные детерминанты белка gE, является одним из иммунодоминантных белков VZV, определение специфических антител к нему может найти применение не только в диагностике и оценке иммунного статуса при VZV-инфекции, но и при изучении эффективности проведения массовой вакцинопрофилактики ветряной оспы.

Благодарим руководство ООО НПО «Диагностические системы» за любезно предоставленный для исследований рекомбинантный антиген gE вируса варицелла зостер.

Литературы

1. Kuhn J. E., Klaffke K., Munk K., Braun R.W. HSV-1 gB and VZV gp-II crossreactive antibodies in human sera. Arch. Virol. 1990; 112: 203 – 213.
2. Kutinova L., Hainz P., Ludvikova V., Maresova L., Nemeckova S. Immune response to vaccinia virus recombinants expressing glycoproteins gE, gB, gH, and gL of varicella-zoster virus. Virology. 2001; 280: 211 – 220.
3. Montalvo E.A., Parmley R.T., Grose C. Structural analysis of the varicella-zoster virus gp98-gp62 complex: posttranslational addition of N-linked and O-linked oligosaccharide moieties. J. Virol. 1985; 53: 761 – 770.
4. Haumont M., Jacquet A., Massar M., Deleersnyder V., Mazzu P., Bollen A. et al. Purification, characterization and immunogenicity of recombinant varicella-zoster virus glycoprotein gE secreted by Chinese hamster ovary cells. Virus Res. 1996; 40: 199 – 204.
5. Grahn A., Studahl M., Nilsson S., Thomsson E., Backström M., Bergström T. Varicella-Zoster Virus (VZV) Glycoprotein E is a Serological Antigen for Detection of Intrathecal Antibodies to VZV in Central Nervous System Infections, without Cross-Reaction to Herpes Simplex Virus 1. Clinical and vaccine immunology. 2011; 18 (8): 1336 – 1342.
6. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Штамм бактерий *Escherichia coli*, используемый для получения рекомбинантных белков. Патент РФ, № 2043409, 1995.
7. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Вектор pEL5c, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК. Патент РФ, 2071503, 1997.
8. Новое в клонировании ДНК. Методы. Пер. с англ. Гловер Д., ред. Москва; 1989: 122 – 128.
9. Sameh Magdeldin and Annette Moser. Affinity Chromatography: Principles and applications, affinity chromatography Ed.: dr. S. Magdeldin. In Tech. 2012: 70 – 75.
10. Virca G.D., Travis J., Hall P.K., Roberts R.C. Purification of γ -2-Macroglobulin by chromatography on Cibacron Blue sepharose. Analytical Biochemistry. 1978; 8: 274 – 276.
11. Rattana Wongchuphan, Beng Ti Tey, Wen Siang Tan, Senthil Kumar Subramanian, Farah Saleena Taip, Tau Chuan Ling. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G using anion exchangers. Process Biochemistry 2011; 46: 101 – 107.
12. Практическая химия белка. Пер. с англ. Дарбре А., ред. Москва; 1989: 1 – 621.
13. Towbin H., Staehelin T., Gordon Y. Proc. nat. Acad. Sci. USA. 1979; 76: 4350 – 4359.
14. Ceroni A., Sibani S., Baiker A., Pothineni V.R., Bailer S.M., LaBaer J. et al. Systematic analysis of the IgG antibody immune response against *Varicella zoster virus* (VZV) using a self-assembled protein microarray. Mol Biosyst. 2010; 6 (9): 1604 – 1610. Doi: 10.1039/c003798b. Epub 2010 Jun 1.
15. Vizoso Pinto M. G., Pfeiffer K.-I., Janke T., Noetting C., Sander M., Lueking A. et al. A systematic approach for the identification of novel, serologically reactive recombinant Varicella-Zoster Virus (VZV) antigens. Virology Journal 2010, 7:165
16. Park R., Hwang J.Y., Lee K.I., Namkoong S., Choi S.K., Park S. et al. Measurement of antibodies to varicella-zoster virus using a virus-free fluorescent-antibody-to-membrane-antigen (FAMA) test Microbiol Biotechnol. 2015; 25 (2): 268 – 273

References

1. Kuhn J. E., Klaffke K., Munk K., Braun R.W. 1990. HSV-1 gB and VZV gp-II crossreactive antibodies in human sera. Arch. Virol. 112: 203 – 213.
2. Kutinova L., Hainz P., Ludvikova V., Maresova L., Nemeckova S. Immune response to vaccinia virus recombinants expressing glycoproteins gE, gB, gH, and gL of varicella-zoster virus. Virology. 2001; 280: 211 – 220.
3. Montalvo E.A., Parmley R.T., Grose C. Structural analysis of the varicella-zoster virus gp98-gp62 complex: posttranslational addition of Nlinked and O-linked oligosaccharide moieties. J. Virol. 1985; 53: 761 – 770.
4. Haumont M., Jacquet A., Massaer M., Deleersnyder V., Mazzu P., Bollen A. et al. Purification, characterization and immunogenicity of recombinant varicella-zoster virus glycoprotein gE secreted by Chinese hamster ovary cells. Virus Res. 1996; 40: 199 – 204.
5. Grahn A., Studahl M., Nilsson S., Thomsson E., Bäckström M., Bergström T. Varicella-Zoster Virus (VZV) Glycoprotein E Is a Serological Antigen for Detection of Intrathecal Antibodies to VZV in Central Nervous System Infections, without Cross-Reaction to Herpes Simplex Virus 1. Clinical and vaccine immunology. 2011; 18 (8): 1336 – 1342.
6. Alatorsev V.E., Alatorseva G.I. Strain of bacterium *Escherichia coli* used for recombinant proteins preparing. Patent RF, № 2043409; 1995 (in Russian)
7. Alatorsev V.E., Alatorseva G.I. Vector pEl5c designated for foreign DNA expression. Patent RF, № 20715031; 1997 (in Russian).
8. News in DNA cloning. A practical approach. Ed.: Glover D.M. Moscow; 1989: 122 – 128 (in Russian).
9. Sameh Magdeldin and Annette Moser. Affinity Chromatography: Principles and applications, affinity chromatography Ed.: dr. S. Magdeldin. In Tech. 2012: 70 – 75.
10. Virca G.D., Travis J., Hall P.K., Roberts R.C. Purification of γ -2-Macroglobulin by chromatography on Cibacron Blue sepharose. Analytical Biochemistry. 1978; 8: 274 – 276.
11. Rattana Wongchuphan, Beng Ti Tey, Wen Siang Tan, Senthil Kumar Subramanian, Farah Saleena Taip, Tau Chuan Ling. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G using anion exchangers. Process Biochemistry. 2011; 46: 101 – 107.
12. Practical Protein Chemistry. Ed. Darbre. A. 1989: 1 – 621 (in Russian).
13. Towbin H., Staehlin T., Gordon Y. Proc. nat. Acad. Sci. USA. 1979; 76: 4350 – 4359.
14. Ceroni A., Sibani S., Baiker A., Pothineni V.R., Bailer S.M., LaBaer J. et al. Systematic analysis of the IgG antibody immune response against *Varicella zoster virus* (VZV) using a self-assembled protein microarray. Mol Biosyst. 2010; 6 (9): 1604 – 1610. Doi: 10.1039/c003798b. Epub 2010 Jun 1.
15. Vizoso Pinto M. G., Pfrepper K.-I., Janke T., Noelting C., Sander M., Lueking A. et al. A systematic approach for the identification of novel, serologically reactive recombinant Varicella-Zoster Virus (VZV) antigens Virology Journal. 2010; 7: 165.
16. Park R., Hwang J.Y., Lee K.I., Namkoong S., Choi S.K., Park S. et al. Measurement of antibodies to varicella-zoster virus using a virus-free fluorescent-antibody-to-membrane-antigen (FAMA) test Microbiol Biotechnol. 2015; 25 (2): 268 – 273.

ИНФОРМАЦИЯ ВОЗ

Всемирная неделя иммунизации 2016 года: Ликвидировать пробелы в иммунизации

Целью Всемирной недели иммунизации, которая проводится в последнюю неделю апреля (24 – 30 апреля 2016 г.), является содействие использованию вакцин для защиты людей всех возрастов от болезней. Иммунизация спасает миллионы жизней и признается в качестве одной из наиболее успешных и экономически эффективных профилактических мер в мире.

Второй год проводится кампания «Ликвидировать пробелы в иммунизации», в рамках которой достигнуты огромные успехи в обеспечении охвата детей во всем мире жизненно важными вакцинами, при этом отмечаются проблемы, с которыми приходится сталкиваться.

При проведении кампании 2016 года особо подчеркивается необходимость иммунизации подростков и взрослых людей на протяжении всей жизни. Она призвана привлечь внимание всего мира к жизненной важности обеспечения охвата уязвимых групп населения, проживающих в условиях конфликтов или чрезвычайных ситуаций.

За первый год кампании достигнуты впечатляющие успехи:

- находится на пути к выполнению во всем мире задача по внедрению новых и недостаточно используемых вакцин в 86 странах с низким и средним уровнем дохода с 2010 года внедрены 128 вакцин;
- разработана и протестирована в рекордно короткие сроки перспективная кандидатная вакцина против вируса Эбола;

- в странах Африки с августа 2014 года не было зарегистрировано ни одного случая дикого полиовируса;
- Индия объявлена страной, свободной от столбняка матерей и новорожденных, что демонстрирует возможности элиминации этой болезни даже в трудных условиях;
- Страны Северной и Южной Америки стали первыми, где была достигнута элиминация краснухи и синдрома врожденной краснухи.

В некоторых странах темпы работ по достижению необходимого уровня охвата вакцинацией замедлились в результате отсутствия доступа к услугам здравоохранения, нехватки достоверной информации об иммунизации, недостаточной политической и финансовой поддержки, а также неадекватных поставок вакцин в ряде районов.

ВОЗ призывает правительства и партнеров в области здравоохранения присоединиться к кампании 2016 года и оказывать содействие в повышении уровня информированности о важном значении иммунизации, усилении приверженности к вакцинации со стороны местных сообществ и улучшении работы служб по проведению прививок с тем, чтобы преимущества иммунизации были доступны на справедливой основе для всех людей.

Источник: www.who.int