

*Дедюля К.Л., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В., Безручко А.А., Богуш З.Ф.,
Казинец О.Н.*

Использование рекомбинантного энтеровирусспецифического полипептида в качестве антигена при разработке диагностической тест-системы

РНПЦ «Эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Ключевые слова: энтеровирусы (ЭВ), энтеровирусная инфекция (ЭВИ), иммуноферментный анализ, антиген, рекомбинантный полипептид.
С учетом вероятной локализации кардиовирулентных детерминант был выбран и клонирован основной антигенный эпитоп СЕ/Е6 выделенного от больного миокардитом вируса ЕСНО 6. Полученный вектор рЕТ-24b(+)/СЕ/Е6 содержал участок, кодирующий 89 аминокислот N-терминальной части капсидного белка VP1. Путем трансформации был получен бактериальный штамм *E. coli* BL21(DE3)/рЕТ-24b(+)/СЕ/Е6, экспрессирующий рекомбинантный полипептид СЕ/Е6. Очищенный СЕ/Е6 обладает антигенной активностью, взаимодействует с антителами к широкому кругу серотипов ЭВ (Coxsackie 1-6, ЕСНО 1-9, 11-22, 24-27, 29, 30, 32) и может быть использован в качестве антигенного компонента при создании диагностических тест-систем в отношении ЭВИ, о чем свидетельствуют его высокая диагностическая специфичность (95%) и чувствительность (77%).

Basing on the putative localization of the Enteroviruses cardiovirulence determinants, the common antigen epitope СЕ/Е6 of an ЕСНО 6 virus isolated from a myocarditis patient was selected and cloned into the expression vector рЕТ-24b(+). The *E. coli* strain BL21(DE3) was transformed with the construction. The bacterial strain thus obtained, BL21(DE3)/рЕТ-24b(+)/СЕ/Е6, expressed СЕ/Е6 recombinant polypeptide representing the 89 amino acids long N-terminal part of the capsid protein VP1. The purified polypeptide interacted with antibodies to a wide range of the Enterovirus serotypes with high levels of specificity (95%) and sensitivity (77%), and can be used as the antigen component of an ELISA kit for diagnostics of Enteroviral infection.

Введение

Энтеровирусные инфекции (ЭВИ) человека остаются актуальной проблемой медицинской вирусологии. Энтеровирусы (ЭВ) относятся к семейству Picornaviridae, роду Enterovirus, который включает в себя пять видов неполиомиелитных энтеровирусов – Enterovirus A, B, C, D, E, а также отдельный вид Poliovirus [1].

ЭВ способны репродуцироваться в клетках практически всех тканей человека и могут поражать различные органы и системы, индуцируя в них разнообразные патологические процессы. ЭВ являются возбудителями полиомиелита, асептического менингита, гастроэнтерита, герпангины, эпидемической миалгии, заболеваний сердца (миокардитов) и поджелудочной железы (панкреатита, инсулин-зависимого диабета первого типа) [2].

Современные методы диагностики ЭВИ можно подразделить на несколько групп: классические вирусологические методы (выделение вируса в культуре

клеток), серологические (ИФА, нМФА и др.), и молекулярно-биологические (ПЦР, молекулярная гибридизация и др.). Из всех вышеперечисленных методов серологические и молекулярно-биологические можно отнести к экспресс-методам.

В настоящее время в практическом здравоохранении нашей страны наиболее востребованным рутинным методом экспресс-диагностики является иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющий исследовать сыворотки больных на наличие специфических иммуноглобулинов класса М (IgM) и присутствие антигенов ЭВ в исследуемых клинических образцах [3]. Это связано с простотой метода, возможностью одновременного исследования большого количества образцов и быстротой получения результата.

В РБ исследования методом ИФА в отношении ЭВ проводятся с использованием отечественных диагностических тест-систем производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Эти тест-системы основаны на взаимодействии специфичных к ЭВ сывороточных иммуноглобулинов с антигенсодержащим препаратом, в качестве которого выступает пул антигенов ЭВ, охватывающий основные серологические группы ЭВ. Вместе с этим, метод ИФА все же не может конкурировать с молекулярно-биологическими методами по широте спектра детектируемых ЭВ, и потому нуждается в совершенствовании.

Одним из подходов к повышению чувствительности диагностических ИФА тест-систем является модификация входящих в их состав антигенных препаратов методами генетической инженерии. В случае тест-систем для диагностики ЭВИ получают рекомбинантные белки, содержащие перекрестно реагирующие антигенные эпитопы структурных белков ЭВ.

Рекомбинантный белок представляет собой низкомолекулярный полипептид, содержащий ряд общих для всех представителей неполиомиелитных ЭВ антигенных детерминант с заданной степенью специфичности. Преимуществами такой технологии являются возможность создания более стандартизованных диагностических препаратов широкого спектра действия, исключающих неспецифические реакции, а также уменьшение экономических и ресурсных затрат на производство, способствующее их удешевлению.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования было получение рекомбинантного энтеровирусспецифического полипептида для создания диагностической тест-системы в отношении широкого круга ЭВ.

Материалы и методы.

Штаммы вирусов. В работе использовали штамм вируса ЕСНО 6 Е6-*F3094/2004* из коллекции музея вирусов РНПЦ «эпидемиологии и микробиологии».

Клинические образцы. Обнаружение антиэнтеровирусных IgM осуществляли в 120 сыворотках крови больных, в том числе, в сыворотках, в которых уже были выявлены IgM к энтеровирусу (44), к вирусу простого герпеса (14), к вирусу Эпштейна-Барр (22), к *Mycoplasma hominis* (25), к *Toxoplasma gondii* (10) и к *Chlamidia trachomatis* (5).

Стандартные препараты диагностических сывороток к ЭВ. Для установления спектра реактивности полученного ЭВ-специфического рекомбинантного белка и активности связывания им антител (АТ) к различным серотипам ЭВ, в работе использовали препараты стандартных диагностических групповых и

моноспецифических сывороток производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова (Россия)

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР фрагмента, кодирующего common epitope (CE). Выделение вирусной РНК осуществляли с использованием набора «РИБО-Сорб» (АмплиСенс). Полученная РНК была обратно транскрибирована при помощи набора «RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase» (Fermentas), а затем амплифицирована с праймерами к CE вируса ECHO 6 CE/E6-F (5'-AAAAACATATGCAAAACGC AATCGACCGTGCTGTAG-3'), CE/E6-R (5'-GGGGAAGCTTAGCTATCATACAT TTGTCTG-3'), содержащими сайты рестрикции для Nde I и Hind III. Амплификацию проводили в соответствии с расчетными температурами отжига праймеров. Результаты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием (10мкг/мл). Фрагмент ДНК, соответствующий региону CE/E6 (287 п.о.), вырезали из агарозного геля и очищали при помощи набора «GenElute Gel Extraction Kit» (Sigma).

Конструирование рекомбинантной плазмиды. Для экспрессии рекомбинантного полипептида в клетках E.coli использовали вектор pET-24b(+), позволяющий экспрессировать клонированный полипептид, несущий полигистидиновый «хвост» (His6Tag), а также содержащий многочисленные сайты клонирования и ген устойчивости к канамицину. После очистки клонируемый фрагмент и вектор Hind III . Лигирование осуществляли при помощи набора рестрицировали по Nde I «DNA Blunting and Ligation Kit» (Fermentas). Полученной векторной конструкцией трансформировали бактериальные клетки E.coli BL21(DE3). Трансформированные клетки отбирали на питательной среде LB, содержащей канамицин в концентрации 10 мкг/мл. Наличие вставки, соответствующей CE/E6, было подтверждено в ПЦР с соответствующими праймерами. Полученный бактериальный штамм обозначили как E. coli BL21(DE3)/pET24b(+)/CE/E6.

Оценка уровня экспрессии, выделение и очистка рекомбинантного полипептида CE/E6. Оценка уровня экспрессии рекомбинантного полипептида CE/E6 проводилась ПААГ-электрофорезом в 15% акриламидном геле. В качестве контроля использовали штамм E. coli BL21(DE3)/pET24b(+), трансформированный вектором pET24b(+) без вставки. Индукцию экспрессии осуществляли добавлением IPTG до конечной концентрации 1 mM и последующей инкубацией при температуре 37° C. После инкубации в течение 4 часов отбирали пробы опытной и контрольной культуры, клетки осаждали центрифугированием, проводили термическую денатурацию белков (100° C, 3 мин), после чего образцы вносили в гель. Наличие экспрессии CE/E6 определяли по сравнению полученных электрофоретических профилей опытной и контрольной культур. Уровень экспрессии определяли визуально, сравнивая интенсивность окрашивания полосы, соответствующей белку CE/E6 (~10 кДа) с маркером, содержащим известное количество белка той же молекулярной массы. Выделение рекомбинантного полипептида осуществляли при помощи набора «HisTrap HP Kit» фирмы AmershamBiosciences.

Установление спектра реактивности и оценка антигенной активности CE/E6. Оценку антигенной активности и спектра реактивности полученного рекомбинантного полипептида CE/E6 проводили методом ИФА. Постановку

реакции проводили по стандартному протоколу (концентрация СЕ/Е6 50-200 нг/лунку). Для оценки антигенной активности в качестве положительного контроля использовали стандартный препарат цельновирионного АГ ЭВ и сыворотку крови человека, содержащую IgM к энтеровирусам и входящую в состав коммерческой тест-системы в качестве положительного контроля. Отрицательным контролем служила нормальная сыворотка крови человека. Сыворотки исследовали в рабочих разведениях, рекомендуемых производителями соответствующих тест-систем (1:500). Для оценки спектра реактивности изучали взаимодействие полипептида СЕ/Е6 со стандартными диагностическими препаратами групповых сывороток, охватывающих абсолютное большинство серотипов рода Enterovirus (Коксаки А 1-6, 6-10, 11-15, 16-22, 20-24, Полиовирус 1-3, Коксаки В 1-6, ЕСНО 1-6, 7-13, 14-24, 15-22, 25-32), а также моноспецифических сывороток к основным серотипам, составляющим вид Enterovirus В.

Результаты и обсуждение

Антигенные эпитопы энтеровирусов, и в частности, вирусов ЕСНО, локализованы преимущественно в белках вирусного капсида. Белок VP1 считается основным капсидным белком и содержит в своей структуре целый ряд антигенных эпитопов [4]. Используя онлайн-программу «PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES» [5], разработанную специалистами Центра противораковых вакцин (Бостон), был проведен анализ аминокислотной последовательности белка VP1 кардиовирулентного штамма ЕСНО 6 Е6-F3094/2004 на наличие антигенных детерминант. Данная программа построена на базе алгоритма Kolaskar и Tongaonkar [6], разработанного для предсказания антигенных детерминант у белков, для которых известна только первичная структура. Для проверки достоверности полученных данных, был проведен анализ антигенных эпитопов белка VP1 прототипного штамма ЕСНО 6 Charles, при помощи базы данных «VirGen» [7].

База данных «VirGen», расположенная на сервере «Conformational Epitope Prediction Server» Центра биоинформатики Пуны [8], содержит информацию об антигенных эпитопах вирусных белков, для которых известна 3D структура, и, следовательно, такие данные считаются наиболее достоверными [9]. Полученные результаты для прототипного штамма ЕСНО 6 Charles хорошо согласовывались с данными о локализации обнаруженных антигенных эпитопов для белка VP1 штамма Е6-F3094/2004.

Из литературы известно, что один из основных антигенных сайтов, т.н. общий энтеровирусный антигенный эпитоп (common epitope, СЕ), расположен в пределах N-концевой области VP1 [10]. Клонирование и использование этого участка вирусного белка для иммунизации животных, позволило авторам получить сыворотку, обладающую способностью взаимодействовать с широким спектром серотипов ЭВ. На основании этого, а также опираясь на данные о локализации антигенных эпитопов вирусов ЕСНО 6, было выдвинуто предположение, что клонирование N-концевого фрагмента капсидного белка VP1 кардиовирулентного штамма вируса ЕСНО 6 Е6-F3094/2004, позволит получить рекомбинантный полипептид, обладающий антигенными свойствами и перекрестной реактивностью в отношении широкого спектра ЭВ.

Описанные Шин и соавторами исследования [10] проводились на вирусе ЕСНО 7. Наши исследования проводились с использованием вируса ЕСНО 6, штамм E6-F3094/2004, который был выделен от больного миокардитом в г. Минске. Для локализации общего антигенного эпитопа сравнивали аминокислотные последовательности белка VP1 вирусов ЕСНО 6 E6-F3094/2004 и ЕСНО 7 (код доступа AY302559). Установлено, что СЕ-участку вируса ЕСНО 7 (572–660 позиции в аминокислотной последовательности) соответствовал участок 572–660 аминокислотной последовательности вируса ЕСНО 6. Аминокислотная последовательность участка СЕ вируса ЕСНО 6 штамма E6-F3094/2004 состояла из 89 аминокислот:

QNAIDRAVVRVADTMPSGSPNSSESIPALTA AETGHTSQVVPSDTIQTRHVKNF
HVRSESSVENFLSRSACVYIVEYKTRDDTPDKMYDS

На основании установленной нуклеотидной последовательности гена VP1 штамма E6-F3094/2004 вируса ЕСНО 6, была разработана пара праймеров для накопления региона генома, кодирующего участок с общим энтеровирусным эпитопом. В праймеры изначально были заложены последовательности, отвечающие за сайты рестрикции рестриктаз Nde I и Hind III, для облегчения дальнейшего клонирования в экспрессирующий вектор.

В качестве вектора экспрессии была выбрана плазмида pET-24b(+) фирмы Novagen. Область клонирования/экспрессии данного вектора содержит сильный T7-промотор, сайты рестрикции для разных рестриктаз и С-терминальный полигистидиновый «хвост», необходимый для дальнейшего выделения и очистки рекомбинантного полипептида. Клонирование осуществляли по классической схеме: амплификация участка ДНК, рестрикция вектора и вставки, лигирование и трансформация бактериального штамма полученной конструкцией.

Полученной векторной конструкцией трансформировали бактериальные клетки *E. coli* DH-5 α .

Трансформированные клетки отбирали на питательной среде LB содержащей антибиотик канамицин в концентрации 20 мкг/мл. Наличие нужной вставки в векторе проверяли при помощи ПЦР с праймерами СЕ/Е6-F и СЕ/Е6-R и рестрикцией по Nde I -> Hind III, и секвенированием. Проверка показала наличие нужной вставки в векторе, и штамм был обозначен как *E. coli* DH-5 α /pET-24b(+)/СЕ/Е6.

Выделение полипептида СЕ/Е6 осуществляли методом аффинной металл-хелатной хроматографии при помощи набора «HisTrap HP Kit» (Amersham Biosciences). Электрофорез в полиакриламидном геле показал, что рекомбинантный полипептид СЕ/Е6 хорошо связывается с хроматографической колонкой и при элюции сходит с нее без примеси бактериальных белков. Максимальный выход белка при элюции с хроматографической колонки приходится на вторую фракцию (110 мкг/мл).

Антигенные свойства полипептида СЕ/Е6 оценивали по его взаимодействию с коммерческими препаратами диагностических сывороток для реакции нейтрализации различных серотипов ЭВ. В качестве положительного контроля использовали смешанный цельновирионный антиген ЭВ, входящий в состав ИФА тест-систем. В реакции использовали смесь вируснейтрализующих сывороток к различным серотипам ЭВ (группа Коксаки В и группа ЕСНО). В исследовании использовали четыре рабочих раствора полипептида СЕ/Е6 с

концентрацией 0,5, 1, 1,5 и 2 мкг/мл. Концентрация стандартного цельновирионного антигена ЭВ составляла 50 мкг/мл. Для сенсibilизации использовали 100 мкл раствора рекомбинантного полипептида и стандартного антигена на лунку. Наличие у рекомбинантного полипептида СЕ/Е6 антигенных свойств оценивали по результатам ИФА, на основании показателей оптической плотности (ПОП). Полученные результаты показали, что значения ПОП для рекомбинантного полипептида СЕ/Е6 находились в диапазоне от 0,963 до 1,788 ОЕ (Рисунок 1). Значение ПОП для цельновирионного антигена ЭВ составило 2,113 ОЕ, что соответствовало сходному уровню ПОП у СЕ/Е6 в концентрации, меньшей в 100 раз (50 нг/лунку) – 1,788 ОЕ. Таким образом, по активности связывания энтеровируснейтрализующих антител, рекомбинантный полипептида СЕ/Е6 не уступает, цельновирионному антигену, и при этом показатели ПОП сопоставимы при концентрации рекомбинантного белка в сто раз меньшей, чем стандартного антигена.

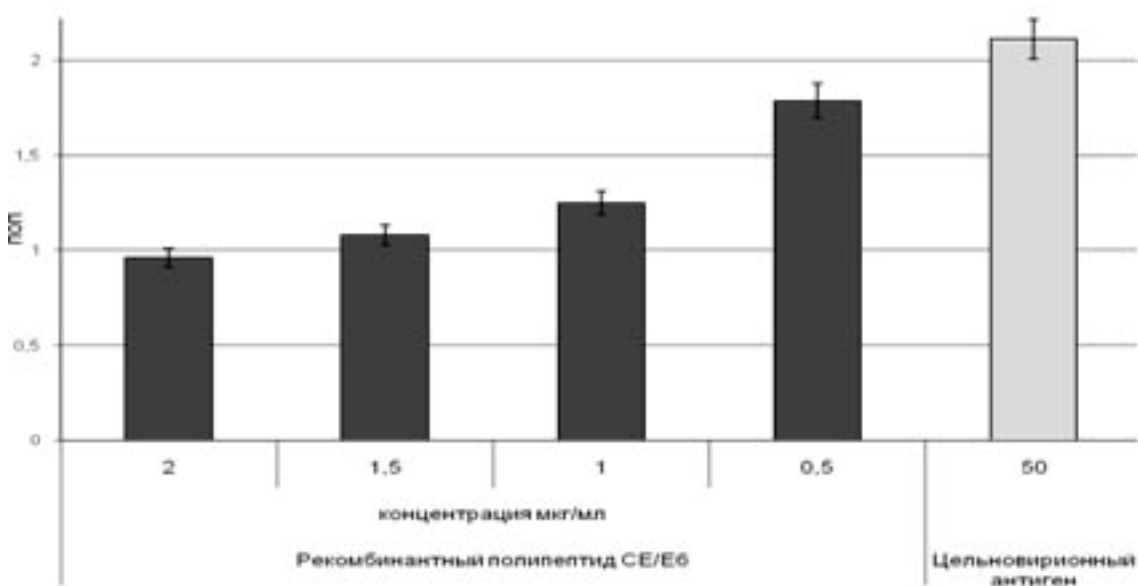


Рисунок 1 – Взаимодействие полипептида СЕ/Е6 и цельновирионного антигена ЭВ со смешанной стандартной вируснейтрализующей сывороткой к различным серотипам ЭВ

Как было отмечено ранее, род Enterovirus характеризуется значительным многообразием серотипов входящих в него вирусов. Поэтому рекомбинантный полипептид, который разрабатывается для использования в качестве антигенного компонента диагностических тест-систем, должен обладать перекрестной реактивностью с АТ к различным серотипам ЭВ. Оценку спектра реактивности полученного полипептида СЕ/Е6 проводили в реакции ИФА по взаимодействию с диагностическими препаратами групповых сывороток к 12 основным серогруппам ЭВ – Коксаки А 1-6, 6-10, 11-15, 16-22, 20-24, Полиовирус 1-3, Коксаки В 1-6, ЕСНО 1-6, 7-13, 14-24, 15-22, 25-32. На основании полученных данных была построена диаграмма, представленная на Рисунке 2.

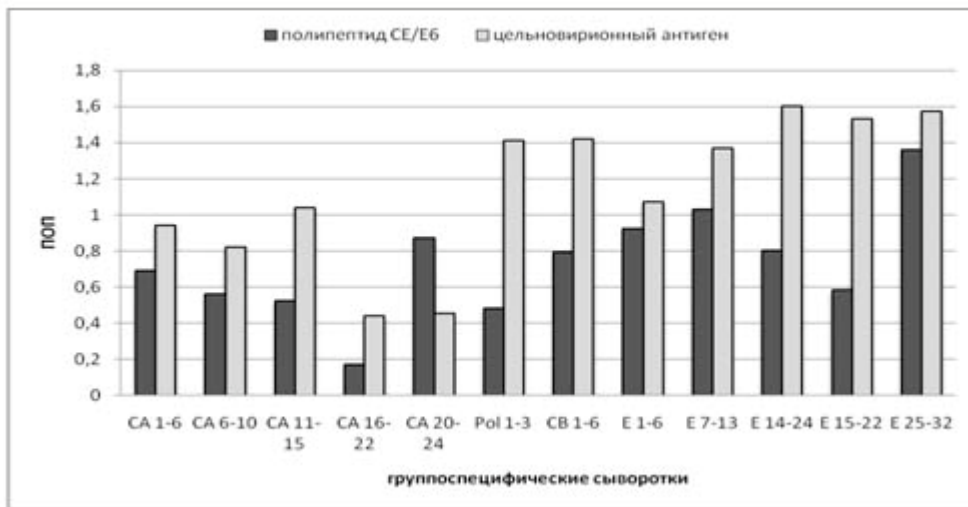


Рисунок 2 – Результаты изучения реактивности рекомбинантного полипептида CE/E6 с 12 группоспецифическими сыворотками к роду Enterovirus (CA – Coxsackievirus A, CB – Coxsackievirus B, E – Echovirus, Pol - Poliovirus) Из рисунка видно, что полученный нами рекомбинантный полипептид был способен специфически взаимодействовать с 11 из 12 исследованных группоспецифических сывороток, демонстрируя тем самым спектр реактивности, охватывающий все основные серотипы рода Enterovirus, за исключением вирусов Коксаки А 16–22 серотипов. Данный показатель следует рассматривать, как удовлетворительный, так как вирусы Коксаки А 16-22 достаточно редко обнаруживаются на территории нашей страны. При этом наиболее широко в Беларуси (как и в большинстве стран с умеренным климатом) циркулируют вирусы, относящиеся к виду Enterovirus B: вирусы серогрупп Коксаки В и ЕСНО.

Исходя из этого, способность белка CE/E6 перекрестно реагировать с антителами к этим серотипам вирусов была изучена наиболее детально. Для этого методом ИФА проводили сравнительные исследования активности взаимодействия CE/E6 и цельновирионного антигена с 34 моноспецифическими сыворотками к указанным серотипам ЭВ (Рисунок 3).



Рисунок 3 - Результаты сравнительных исследований активности взаимодействия СЕ/Е6 и цельновирионного антигена с 34 моноспецифическими сыворотками к различным серотипам ЭВ. (СВ – Coxsackievirus B, E – Echovirus) Полученные результаты указывают на широкий спектр перекрестной реактивности белка СЕ/Е6. Так, из рисунка видно, что положительный результат ИФА был получен для 31 из 34 моноспецифических сывороток.

Активность связывания белком СЕ/Е6 АТ к 11 серотипам ЭВ лишь незначительно уступала цельновирионному АГ, а к вирусу ЕСНО 14 – превосходила его. В качестве существенного недостатка полипептида следует отметить отрицательный результат, полученный при его взаимодействии с сыворотками к вирусам ЕСНО 9 и 11 серотипов, так как эти вирусы характеризуются значительной распространенностью на территории Беларуси. В тоже время, полипептид СЕ/Е6 показал хороший результат с теми серотипами ЭВ, которые традиционно считаются кардиовирулентными - вирусы Коксаки группы В.

Возможность использования рекомбинантного белка СЕ/Е6 для разработки ИФА тест-систем для детекции антиэнтеровирусных IgM оценивали также при проведении параллельных исследований сывороток крови 98 больных с использованием в качестве антигенной подложки для ИФА рекомбинантного полипептида СЕ/Е6 и цельновирионного энтеровирусного антигена. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результат исследования сывороток крови больных (n = 98) в ИФА с СЕ/Е6 и цельновирионным антигеном

Цельновирионный АГ	СЕЕ6		
	Положительный	Отрицательный	Всего
Положительный	24	7	31
Отрицательный	3	64	67
Всего	27	71	98

На основании этих данных, для рекомбинантного белка была получена диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность, составившие 95% и 77% соответственно.

Полученные результаты указывают на возможность использования рекомбинантного полипептида СЕ/Е6 в качестве антигенной подложки в диагностических ИФА тест-системах для выявления антиэнтеровирусных IgM в клиническом материале от больных с ЭВИ, а также для быстрой ИФА-диагностики больных ЭВИС.

Литература

1. Вирусология: в 3-х т. / под ред. Б. Филдса (гл. ред.) [и др.]. М.: Мир, 1989. 492 с.
2. Поклонская, Н. В. Индикация и генетические характеристики энтеровирусов у больных кардитами и кадиомиопатиями: диссертация на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.00.06 / Н. В. Поклонская. Минск, 2005. 26 л.
3. Казинец, О. Н. Серологическая диагностика энтеровирусных инфекций иммунохимическими методами / О. Н. Казинец [и др.] // Мед. новости. 2004. № 2. С. 74–75.

4. Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines. mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1 / M. Schmidtke [et al.] // J. Virol. 2000. Vol. 275. P. 77–88.
5. Predicted antigenic peptides [Electronic resource]. Cancer Vaccine Center, Boston, 2009. Mode of access: <http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>.
6. Kolaskar, A. S. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens / A. S. Kolaskar, P. C. Tongaonkar // FEBS Letters. 1990. Vol. 276, № 1, 2. P. 172–174.
7. VirGen: a comprehensive viral genome resource / U. Kulkarni-Kale [et al.] // Nucleic Acids Research. 2004. Vol. 32, P. 289–292.
8. VirGen: a comprehensive viral genome resource [Electronic resource]. Bioinformatics Centre, University of Pune, 2009. Mode of access: <http://202.41.70.51/virgen/virgen.html>.
9. Conformational Epitope Prediction Server [Electronic resource]. Bioinformatics Centre, University of Pune, INDIA, 2009. Mode of access: <http://202.41.70.74:8080/cgi-bin/cep.pl>.
10. Identification of enteroviruses by using monoclonal antibodies against a putative common epitope / S.Y. Shin [et al.] // J. Clin. Microb. 2003. Vol. 41. P. 3028–3034.