

УДК 577.29

**ПОЛУЧЕНИЕ ФРАГМЕНТА ACE2 ЧЕЛОВЕКА В ПРЕПАРАТИВНЫХ КОЛИЧЕСТВАХ
ДЛЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ****Т.В. Яковлева, С.В. Никонов, Е.Ю. Никонова**

ФГБУН Институт белка РАН – лаборатория структурных исследований аппарата трансляции, Пуцзино, Россия

Введение

Коронавирусы поражают как животных, так и людей; они способны вызывать патологические процессы разнообразного клинического течения и различной степени тяжести, от бессимптомных и легких форм до крайне тяжелых; некоторые представители вызывают эпидемические и пандемические процессы. В настоящее время для 7 видов семейства обозначено медицинское значение, их можно подразделить на 2 группы: классические коронавирусы человека (HCoV OC43, HCoV 229E, HCoV HKU1, HCoV NL63) и наиболее опасные коронавирусы человека (SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS-CoV).

COVID-19 – опасное, эпидемическое инфекционное заболевание, вызванное инфицированием клеток организма одноцепочечным РНК-содержащим вирусом SARS-CoV-2, который имеет высокую степень контагиозности и способность к высоковероятному развитию нарушений функции систем органов. Среди таковых выделяется острая дыхательная недостаточность, полиорганные поражения, острый респираторный дистресс-синдром, системный васкулит и другие тяжелые осложнения [1]. Как правило, коронавирусная инфекция распространяется воздушно-капельным путем. В роли участка локализации возбудителей выступает слизистая оболочка дыхательных путей.

Для проникновения в организм человека на поверхности вируса располагается S-белок, содержащий рецептор-связывающий домен (RBD) и мембрано-связывающий домен (RBM). Связывание RBD домена S-белка с ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент 2) является начальным этапом для проникновения SARS-CoV-2 в клетки мишени. Таким образом, детальное изучение взаимодействия RBD с ACE2 является важным этапом в борьбе с коронавирусной инфекцией. На данный момент нами предложены границы минимального фрагмента ACE2, способного связывать S-белок коронавируса, получена генетическая конструкция, несущая фрагмент гена ACE2 человека и разработана схема выделения такого минимального фрагмента.

Цель исследования – получение минимального фрагмента ACE2, способного специфически связываться с S-белком коронавируса.

Для достижения поставленной цели мы провели ряд следующих экспериментов: Разработка олигонуклеотидных праймеров (чтобы повысить эффективность синтеза белка и вероятность его правильного сворачивания, нами были убраны все редкие для бактерий кодоны). Фланкирующие праймеры содержали сайты рестрикции для эндонуклеазы BsaI; Клонирование гена фрагмента ACE2 в плазмидный вектор. Мы выбрали плазмиду Pet32a_GG, т. к. плазида содержит последовательность для последующего выделения белка с помощью аффинной хроматографии на Ni-сефарозе. Клонирование гена осуществляли по методике Golden Gate [2]; Клетки *E.coli*. XL1-blue трансформировали лигазной смесью. Проверку выросших клонов на наличие вставки и отсутствие в ней мутаций осуществляли с помощью секвенирования; Клетки BL21(DE3) трансформировали целевой плазмидой, клеточную биомассу наращивали на среде LB с селекцией по антибиотикам Amp и Cm; Выделение белка осуществляли с помощью аффинной и гель-фильтрационной хроматографий.

Для решения насущных медицинских пробелам, связанных с пандемией COVID-19, было начато изучение комплекса белка ACE2 человека с S-белком коронавируса. Был получен штамм-суперпродуцент фрагмента ACE2; подобраны условия наработки и выделения рекомбинантного RBD домена и фрагмента ACE2 в препаративных количествах с чистотой, пригодной для кристаллизации. В ближайшее время будет проверена способность полученного фрагмента связывать S-белок коронавируса.

Литература

1. Патогенез COVID-19 / А.Б. Хайтович // Таврический медико-биологический вестник. 2020. Том 23. № 4. С. 113–132.
2. New England Biolabs, Inc. (2020). Golden Gate Assembly. Multiple DNA fragment assembly with high efficiency and accuracy. *New England Biolabs GmbH*.
3. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis / M. Mohamadian [et al] // Journal of Gene Medicine. 2021. Vol. 23. № 2.