

УДК 640

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ В КЛЕТКАХ НЕК293**А.В. Колосов, А.С. Волынкина, Л.Д. Тимченко***Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия**Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия*

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) – особо опасная трансмиссивная природно-очаговая арбовирусная инфекция, эндемичная для многих стран, в том числе юга европейской части России, характеризующаяся тяжелым течением болезни с высоким уровнем летальности (3–20 %). Возбудитель КГЛ – вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (вирус ККГЛ), принадлежащий к роду *Orthonairovirus* семейства *Nairoviridae* порядка *Bunyavirales* [1]. Вирус ККГЛ относится ко II группе патогенности и уровню биологической опасности BSL-4 по международной классификации [2].

Для серодиагностики КГЛ показана возможность применения в качестве антигена рекомбинантного белка нуклеопротеина (NP) вируса ККГЛ [4]. Нуклеопротеин вируса ККГЛ являющийся структурным белком, кодируется открытой рамкой считывания (ORF) малого (S) сегмента генома вируса ККГЛ, размером 1449 п.н., (482 аа), имеет молекулярную массу 53 кДа [3].

В большинстве случаев, для экспрессии белка NP используют прокариотические экспрессионные системы, но из-за отсутствия необходимых посттрансляционных модификаций эффективнее использовать другие экспрессионные системы [5]. Наиболее подходящими для исследования, на наш взгляд, являются клетки млекопитающих линии HEK293, обеспечивающие необходимый посттрансляционный процессинг для рекомбинантных белков.

Цель исследования – конструирование плазмиды для экспрессии рекомбинантного нуклеопротеина (NP) вируса ККГЛ в клетках эукариот.

На основе плазмидного вектора pcDNA3.1(+) (ThermoFisher Scientific, США), была сконструирована рекомбинантная плазида pcDNA3.1 CCHFV-NP-GFP (7619 п.н.) для экспрессии нуклеопротеина вируса ККГЛ в эукариотических клетках под контролем промотора цитомегаловируса CMV, содержащая кодирующую область гена нуклеопротеина, соединенную с последовательностью зеленого флуоресцентного белка (GFP) на С-конце. Дизайн конструкции выполняли в программе SnapGene 2.8.3.

Эффективность экспрессии рекомбинантного нуклеопротеина вируса ККГЛ оценивали при трансфекции клеточной линии HEK293 рекомбинантной плазмидой pcDNA3.1 CCHFV-NP-GFP.

Клеточные линии выращивали на среде ИГЛА MEM с добавлением FBS (бычья сыворотка крови) до концентрации 10 %. Клеточный монослой культивировали в CO₂-инкубаторе при относительной влажности 85 % и температуре 37° С и содержании CO₂ 5 %.

Трансфекцию клеточных линий HEK293, плазмидой pcDNA3.1 CCHFV-NP-GFP, проводили с использованием реагента Lipofectamine 2000, в соответствии с инструкцией производителя. После трансфекции клеточный монослой инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе, в течение 96 ч. В качестве положительного контроля проводили трансфекцию монослоя клеток HEK293 плазмидой pHMGFP, в качестве отрицательного – трансфекцию клеток HEK293 плазмидой pcDNA3.1(+).

При исследовании монослоя трансфицированных клеток методом люминисцентной микроскопии специфическое зеленое свечение наблюдалось в клетках монослоя, трансфицированных плазмидой pcDNA3.1 CCHFV-NP-GFP и плазмидой pHMGFP (положительный контроль) (рис. 1 и 2). Максимальное количество светящихся клеток при трансфекции плазмидой pcDNA3.1 CCHFV-NP-GFP составляло 3 %.

Таким образом, наличие специфического свечения зеленой флуоресцентной метки при трансфекции монослоя HEK293 плазмидой pcDNA3.1 CCHFV-NP-GFP подтверждает наличие в трансфицированных клетках продукта экспрессии целевого гена – рекомбинантного нуклеопротеина вируса ККГЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куличенко, А.Н. и др. Крымская геморрагическая лихорадка в Евразии в XXI веке: эпидемиологические аспекты. // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2012. – № 3. – С. 42–53.
2. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза // Вестник Российской академии наук. 2003. Т. 73, № 3. С. 195–204.
3. Lasecka L., Baron M.D. The molecular biology of nairoviruses, an emerging group of tick-borne arboviruses // Archives of virology. 2014. Vol. 159, № 6. P. 1249–1265.
4. Marriot A.C., et al. J. Gen. Virol. 1994. Vol. 75, Pt. 9, P. 2157–2161.;
5. Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. Biomolecules, 2014.