

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-107

РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ХАСЕКИ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ***DEVELOPMENT OF A PLATFORM FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEINS OF THE HASEKI TICK VIRUS SUITABLE FOR STRUCTURAL RESEARCH**

И. А. Осинкина, А. В. Гладышева

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

I. A. Osinkina, A. V. Gladysheva

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ osinkinai_ia@vector.nsc.ru

Аннотация

Изучение новых вирусов, одним из которых является вирус Хасеки, — важная часть системы противодействия вирусным угрозам. При этом рентгеноструктурный анализ (РСА), хотя и способен помочь в изучении неизвестных белков новых вирусов, требует особого подхода в их получении. В данном исследовании был разработан комплекс биотехнологических решений, позволяющий получить рекомбинантные белки вируса Хасеки, пригодные для проведения структурных исследований.

Abstract

The study of new viruses, one of which is the Haseki tick virus, is an important part of the system for preventing viral threats. However, X-ray crystallography, while useful for studying unknown proteins from new viruses, requires a specific approach for obtaining them. In this study, a set of biotechnological solutions was developed to produce recombinant Haseki virus proteins suitable for X-ray structural analysis.

Изучение новых вирусов, потенциально патогенных для человека, — важный этап противодействия вирусным угрозам. Вирус Хасеки, отнесенный к семейству *Flaviviridae*, — недавно обнаруженный вирус с показанными случаями заражения людей. Строение его генома отличается от типичных представителей семейства, что затрудняет его изучение методами молекулярно-генетического анализа, в связи с чем до настоящего момента геном вируса оставался неаннотированным [1].

В ходе выполнения работы посредством построения скрытой марковской модели с помощью HMMER v3.1b2, а также моделирования с применением AlphaFold3 участков полипротеина вируса Хасеки были впервые обнаружены домены неструктурных белков: NS3 протеазы и геликазы (1598–1801 и 1802–2291 а. о.) и NS5 RdRp (3999–4709 а. о.), а также неизвестные высокоструктурированные домены SP1 и SP2 в позициях 1–173 и 672–831 а. о., предположительно связанные с белком Eгns и гликопротеином оболочки. Однако все обнаруженные домены имеют уровень гомологии ниже 30 % с белками представителей семейства, что исключает возможность их точной идентификации [2].

РСА способен помочь в идентификации и изучении этих белков, однако требует их получения в нативной конформации, большой концентрации с чистотой более 95 %, что вызвало необходимость разработки технологической платформы для получения рекомбинантных белков вируса Хасеки, пригодных для структурных исследований.

ПЦР-сборкой с перекрытием были *de novo* собраны ДНК-копии последовательностей, кодирующих белки SP1 (474 н. п.), SP2 (450 н. п.), NS3 (2082 н. п.), NS3pro (612 н. п.) и NS3hel (1470 н. п.) вируса Хасеки. На их основе получены устойчивые генетические конструкции pJET1.2/SP1, -SP2, PUC19/SP1, -SP2, -NS3, -NS3pro и -NS3hel, для хранения ДНК-копий последовательностей белков. Путем переклонирования были созданы рекомбинантные плазмидные ДНК pET/SP1; 14x-His-Tev-SP1; pEASY/SP1, -SP2; pET28b/SP1, -SP2, -NS3pro, -NS3hel, предназначенные для продукции рекомбинантных химерных белков в системе *E. coli*. Конструкции содержат аффинную метку, метки для повышения растворимости и сайт протеолиза пикорнаином 3с риновируса A28, что обеспечивает возможность получения высокоочищенных белков, пригодных для структурных исследований (см. рисунок).

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2025-452 от 30.05.2025).

© И. А. Осинкина, А. В. Гладышева, 2025

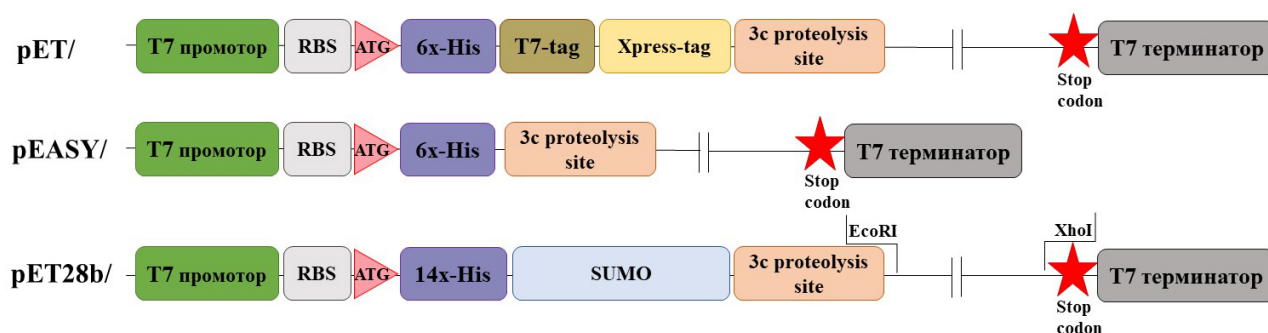


Схема строения экспрессионных кассет полученных плазмидных ДНК

Мы использовали различные штаммы клеток *E. coli* — BL-21(DE3), KRX, HyperStable, LysTech и T7EvoPro — для сравнения эффективности наработки в них рекомбинантных белков вируса Хасеки. Были получены штаммы-продуценты BL/pET/SP1, KRX/pET/SP1, BL/pEASY/SP1, KRX/pEASY/SP1, HS/pEASY/SP1, BL/Tev-SP1, KRX/Tev-SP1, HS/Tev-SP1, T7Evo/Tev-SP1, LT/Tev-SP1, BL/pEASY/SP2, KRX/pEASY/SP2, HS/pEASY/SP2, BL/pET28b/SP2, KRX/pET28b/SP2, HS/pET28b/SP2, обеспечивающие синтез рекомбинантных химерных белков SP1 и SP2.

При культивировании штаммов BL/pET/SP1 и KRX/pET/SP1 в течение 20–22 ч при 20 °C и 180 об/мин с индукцией 1 mM ИПТГ (+0,1 % L-рамнозы для штамма KRX/) наблюдался высокий уровень наработки рекомбинантного белка SP1 (26 кДа), в растворимой форме в периплазме бактериальных клеток. Удалось получить до 12,7 г биомассы клеток с 1 л культуры. При культивировании штаммов, содержащих конструкции на основе pEASY/ и pET28b/ в описанных ранее условиях, а также при варьировании температуры от 16 до 37 °C и концентрации ИПТГ от 0,1 до 2 mM не наблюдалась наработка целевых белков; в штаммах, содержащих конструкции 14x-His-Tev-SP1, наработка белка происходила в тельцах включения, что неприменимо для работ по кристаллизации белка и проведении PCA.

Рекомбинантный белок SP1 был выделен из лизата клеток BL/pET/SP1 и KRX/pET/SP1 и очищен с помощью ионообменной (в градиенте pH) и эксклюзионной хроматографии. Чистота препарата белка составила < 95 % по SDS-PAGE с концентрацией 32 мг/мл. Соответствие требуемым параметрам подтверждается успешно проведенными экспериментами по измерению малоуглового рентгеновского рассеяния и динамического рассеяния света.

Таким образом, разработанная технологическая платформа позволяет получать рекомбинантные белки вируса Хасеки, пригодные для проведения структурных и функциональных исследований, что может в дальнейшем способствовать разработке вакцин и иммунобиологических препаратов.

Литература

1. Kartashov M. Y., Gladysheva A. V., Shvalov A. N. et al. Novel Flavi-like virus in ixodid ticks and patients in Russia // Tick Borne Diseases. 2023. No. 14 (2). P. 70.
2. Gladysheva A. V., Osinkina I. A., Radchenko N. S. et al. Tertiary Structures of Haseki Tick Virus Nonstructural Proteins Are Similar to Those of Orthoflaviviruses // Int. J. Mol. Sci. 2024. No. 25 (24). P. 13654.