

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-282

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ  
И РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА МУТАНТНОГО ВАРИАНТА ПРОТЕАЗЫ ВИЧ-1,  
ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА\***

**DETERMINATION OF THE AMINO ACID SEQUENCE AND DEVELOPMENT  
OF A PRODUCER FOR THE MUTANT VARIANT OF HIV-1 PROTEASE CIRCULATING  
IN THE SIBERIAN FEDERAL DISTRICT**

В. О. Труфанов, С. В. Беленькая

*Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН  
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

V. O. Trufanov, S. V. Belenkaya

*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS  
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*

✉ trufano8@mail.ru

**Аннотация**

В мире зарегистрировано около 38 млн людей, живущих с ВИЧ, более 1,4 млн — в России. Антитретовирусная терапия позволяет контролировать развитие заболевания, но из-за высокой изменчивости возникают субтипы вируса [1], устойчивые к существующим лекарствам. Выявлены мутантные формы PRS17 и PRS5B, резистентные к клиническим ингибиторам протеазы ВИЧ-1 [2], что обуславливает необходимость дальнейшего мониторинга циркулирующих субтипов ВИЧ-1.

**Abstract**

Approximately 38 million people worldwide are living with HIV, with over 1.4 million cases registered in Russia. The use of antiretroviral therapy controls disease progression, but high variability of HIV-1 leads to new viral subtypes [1], some of which exhibit resistance to medications. Mutant forms PRS17 and PRS5B have been identified as resistant to clinical protease inhibitors [2] underscoring the need for monitoring circulating HIV-1 subtypes.

Цель работы — установить нуклеотидные и аминокислотные замены последовательности протеазы ВИЧ-1 в образцах, циркулирующих на территории Сибирского федерального округа, а также получить штаммы-продуценты и разработать протокол выделения и рефолдинга мутантного варианта протеазы ВИЧ-1.

Для достижения поставленной цели были взяты 267 образцов вирусной РНК (предоставлены лабораторией иммунохимии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), выделенных из сывороток крови людей, зараженных ВИЧ и проживающих на территории Сибирского федерального округа. Для амплификации нуклеотидной последовательности протеазы ВИЧ-1 проводили ОТ-ПЦР на матрице вирусной РНК ВИЧ- с использованием праймеров HIV-F (5'-aaaaaaggatccagtggttttagaaaaatggcattcc-3'), HIV-R (5'-aaaaaagcggccgctaaccgctaccaccgctctgaaaggtaaccgctacactg-3'). Полученные последовательности были проанализированы на наличие нуклеотидных и аминокислотных замен.

После выявления характерных аминокислотных замен последовательности протеазы ВИЧ-1, представленной на территории Сибирского федерального округа, ее нуклеотидная последовательность была оптимизирована под экспрессию в системе *E. coli* и клонирована по методу Гибсона в составе экспрессионного вектора pET28-HIV, синтезирующего белок SUMO и рекомбинантную протеазу ВИЧ-1 в единой рамке считывания. Амплификацию вектора и последовательности синтезированной протеазы ВИЧ-1 проводили с использованием праймеров pET28-F/pET28-R (5'-TGATAACTCGAGCACCACCAC -3'/5'-GCCACCAATCTGCTCACGATG -3') и SUMO-HIV-F/SUMO-HIV-R (5' TGAGCAGATTGGTGGCCCGCAGATTACCCTGTGGAAAC -3'/5'-GTGGTGTCTCGAGTTATCAAAAAGTTTCAGGGTTGCACCAATCT -3') соответственно. В результате был получен вектор pET28-HIV. Так же была получена плазмида, содержащая глицин-сериновый линкер между белком SUMO и рекомбинантной протеазой ВИЧ-1, — pET28\_GS\_HIV.

Посредством трансфекции клеток *E. Coli* BL21 codon plus описанными плазмидами были получены штаммы-продуценты мутантной формы вирусной протеазы. Был произведен сравнительный анализ способности полученных белков к рефолдингу и переходу в функциональную форму. Анализ показал, что белок, полу-

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-75-00117).

© В. О. Труфанов, С. В. Беленькая, 2025

ченный из продуцентов, трансформированных плазмидой pET28-HIV и pET28 \_GS\_HIV, подвергается рефолдингу, переходя в растворимую форму. Однако штамм, трансформированный плазмидой pET28-HIV, в отличие от штамма, трансформированного плазмидой pET28 \_GS\_HIV, не образует зрелую протеазу при обработке протеазой SUMO.

### **Литература**

1. Buonaguro L., Tornesello M. L., Buonaguro F. M. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the world-wide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications // J. Virology. 2007. Vol. 81, No. 19. P. 10209–10219.
2. Park J. H. et al. Binding of clinical inhibitors to a model precursor of a rationally selected multidrug resistant HIV-1 protease is significantly weaker than that to the released mature enzyme // Biochem. 2016. Vol. 55, No. 16. P. 2390–2400.