



УДК 547.963.320.57:577.214.622

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ ИММУНОГЕННЫХ ЭПИТОПОВ ВИРУСА ЯЩУРА В СОСТАВЕ ГИБРИДОВ С ФАКТОРОМ НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ И КОР-АНТИГЕНОМ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

© 1997 г. О. В. Некрасова[#], В. Е. Бойченко, Е. Ф. Болдырева, Г. П. Борисова*, П. Пумпен*, Н. А. Перевозчикова**, В. Г. Коробко

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

* Биомедицинский центр Латвийского университета, Рига, Латвия

** Всероссийский институт защиты животных, Владимир

Поступила в редакцию 22.05.96 г.

Осуществлено генно-инженерное конструирование и бактериальная экспрессия рекомбинантных генов, кодирующих гибриды фактора некроза опухолей человека и кор-антигена вируса гепатита В с антигенными детерминантами двух штаммов вируса ящура – A₂₂ и O₁₋₁₉₄. Установлено, что гибриды антигенных детерминант с фактором некроза опухолей вызывают защиту лабораторных животных от заражения гомологичным вирусом ящура, причем гибридный белок, содержащий иммуногенные эпитопы двух подтипов, A₂₂ и O₁₋₁₉₄, защищает животных от заражения вирусом ящура обоих серотипов. Показано, что гибридные белки на основе кор-антигена сохраняют способность к самосборке в капсидоподобные частицы.

Ключевые слова: вирус ящура, антигенные детерминанты; фактор некроза опухолей человека, кор-антиген вируса гепатита В; рекомбинантные ДНК, бактериальная экспрессия, гибридные белки.

Один из подходов к созданию биосинтетической вакцины против вируса ящура основан на использовании пептидных фрагментов, представляющих собой поверхностные антигены вируса [1]. Ранее было показано, что иммунизация лабораторных животных синтетическими пептидами (аминокислотные последовательности 141–160 и 200–213 вирусного белка VP1) в виде конъюгатов с гемоцианином улитки индуцирует синтез вируснейтрализующих антител и оказывает защитное действие в отношении последующего заражения животных вирусом ящура [2, 3]. Наиболее иммуногенный из этих пептидов, соответствующий последовательности 141–160 белка оболочки VP1, проявляет собственную Т-клеточную активность, что позволяет использовать его также и в свободном, неконъюгированном виде [4, 5]. Вместе с тем по сравнению с целым вирусом иммуногенность этого пептида в 10–1000 раз ниже, а результаты, полученные в лабораторных условиях, не воспроизводятся на природно восприимчивых к ящуру животных.

Защитный эффект в отношении сельскохозяйственных животных удалось получить лишь с помощью синтетического пептида, включающего последовательности 200–213 и 141–158, соеди-

ненные трипептидным мостиком и фланкированные концевыми остатками цистеина [6]. Высокая иммуногенная активность составного пептида может объясняться как пространственным сближением двух антигенных сайтов, так и наличием концевых цистеиновых остатков, создающих возможность циклизации или олигомеризации пептида для более адекватного представления антигенных эпитопов клеткам иммунной системы.

Вместе с тем при иммунизации крупного рогатого скота были обнаружены качественные отличия иммунного ответа, полученного на синтетический пептид и на целый вирус. В случае целых вирусных частиц существует корреляция между защитным эффектом и титром вируснейтрализующих антител [7]. При иммунизации пептидом защитный эффект проявляется только у тех животных, у которых уровень нейтрализующих антител в 10 раз выше получаемого при обычной иммунизации. Лишь часть образовавшихся антител способна нейтрализовать вирусную инфекцию *in vivo*; кроме того, эти антитела обладают меньшей специфичностью и аффинностью к вирусному антигену [8, 9]. В связи с тем что синтез вируснейтрализующих антител является основным эффекторным механизмом подавления вирусной инфекции, низкая иммуногенность пептидных фрагментов может объясняться как пространственными ограничениями в представлении В-эпитопов, так и генетической рестрикцией по отношению к заключенному в составе пептида Т-клеточному эпитопу,

Сокращения: hTNF – фактор некроза опухолей человека; НВсAg – кор-антиген вируса гепатита В; IPTG – изопропил-β-тиогаляктопиранозид.

[#] Автор для переписки (факс: (095) 335-71-03; e-mail: genchem@ibch.siohc.ras.ru).

обусловленной структурой главного комплекса гистосовместимости животных. Возможность преодоления генетической неотвечаемости на этот пептид была продемонстрирована на мышшиной линии Н-2^d путем присоединения к пептиду чужеродной по отношению к вирусу Т-хелперной последовательности [10]. Значительное усиление иммунного ответа на пептид при иммунизации крупного рогатого скота наблюдалось при использовании составного пептида, содержащего последовательность В-эпитопа и специфического вирусного Т-эпитопа, соответствующего участку 21–40 белка VP1 [11].

Повышение иммуногенности пептида 140–160 как за счет улучшения пространственной организации В-клеточных эпитопов, так и вследствие увеличения числа и разнообразия Т-клеточных эпитопов может быть достигнуто с помощью генно-инженерного конструирования гибридных белков, при котором происходит направленное воспроизводимое соединение антигенного участка с молекулой белка-носителя путем биосинтеза единой аминокислотной последовательности. В качестве такого носителя для синтеза антигенных детерминант вируса ящура были использованы β-галактозидаза, а также некоторые мембранные белки бактерий [12–14]. Наибольшую иммуногенную активность пептид 142–160 проявлял в составе гибрида с кор-антигеном вируса гепатита В [15]. Важным преимуществом использования этого белка в качестве носителя иммуногенных эпитопов является его способность к самосборке с образованием капсидоподобных частиц размером 27 нм. Это свойство характерно и для генно-инженерного НВсАg, выделенного из клеток *E. coli* [16]. Вставки пептидных фрагментов как в N-, так и в C-концевую часть этого белка не нарушают процесса самосборки и оказываются экспонированными на поверхности частиц [15, 17, 18]. Кроме того, НВсАg обладает высокой иммуногенной активностью, которая основана на его способности активировать Т-хелперные клетки, а также напрямую взаимодействовать с В-клетками, индуцируя образование антител к НВсАg [19]. Получение N-концевого гибрида НВсАg с участком 142–160 VP1 вируса ящура привело к образованию хорошо различимых в электронном микроскопе частиц с высокой поверхностной плотностью антигенных детерминант [15]. В опытах на морских свинках было показано, что иммуногенность этих гибридов в 500 раз превышала иммуногенность соответствующих синтетических пептидов и приближалась к уровню активности целого вируса ящура. Вместе с тем низкий выход гибридных белков с НВсАg, полученных путем экспрессии соответствующих генов в вирусе осповакцины, ограничивает проведение интенсивных иммунологических исследований как на лабораторных, так и на сельскохозяйственных животных.

В предыдущей работе [20] мы описывали конструирование рекомбинантных генов, кодирующих гибриды фактора некроза опухолей человека (TNF) с антигенными детерминантами вируса ящура подтипа А₂₂. Полученные плазмиды р7FMD–р10FMD обеспечивают высокий уровень биосинтеза гибридных белков hTNF в клетках *E. coli* под контролем промоторов А2 и А3 бактериофага Т7. С помощью иммуноферментного анализа было показано, что гибридные белки специфически взаимодействуют с поликлональными антителами против целого вируса ящура подтипа А₂₂. В настоящей работе мы продолжаем исследования по конструированию и экспрессии искусственных генов, кодирующих гибриды TNF с антигенными детерминантами вируса ящура двух штаммов, А₂₂ и О₁₋₁₉₄, эндемичных для территории России и имеющих большое практическое значение для животноводства. Кроме того, мы описываем первые эксперименты по созданию системы бактериальной экспрессии антигенных детерминант в виде гибридов с НВсАg, а также исследование иммуногенных свойств полученных химерных белков.

В недавно опубликованных работах по иммунизации животных синтетическими пептидами, включающими участки иммунодоминантной области белка VP1 вируса ящура подтипа А₂₂, положение главной антигенной детерминанты для этого штамма вируса было определено в районе 135–159 белка VP1 [21]. Поэтому для конструирования генов, кодирующих гибриды с антигенной детерминантой штамма О₁₋₁₉₄, в качестве главной антигенной детерминанты для этого штамма мы выбрали, по аналогии со штаммом А₂₂ и штаммами подтипа О_{1К} [5, 22], аминокислотную последовательность 130–160 белка оболочки VP1 [23]. При этом в качестве вектора была использована полученная нами ранее плазида р10FMD [20], детерминирующая синтез гибрида TNF и составной антигенной детерминанты штамма А₂₂.

На начальном этапе конструирования в полимеразной цепной реакции (ПЦР) был получен фрагмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность 130–160 белка VP1 штамма О₁₋₁₉₄ (рис. 1). В качестве матрицы была использована плазида рBRVP1–O194, содержащая ген *vp1*; праймерами для ПЦР служили синтетические олигонуклеотиды (I) и (II) (таблица), содержащие сайты узнавания рестриктаз *KpnI* и *HindIII*. Затем амплифицированный фрагмент после гидролиза эндонуклеазами *KpnI* и *HindIII* был клонирован по тем же сайтам в плазмиду р10FMD (рис. 2). В результате получили плазмиду рFMD150, кодирующую гибридный белок, в котором последовательность hTNF соединена через константную антигенную детерминанту с иммуногенным эпитопом штамма О₁₋₁₉₄.

Значительный интерес представляет конструирование таких гибридных белков, которые



Рис. 1. Структура фрагментов ДНК, кодирующих: (а) – антигенную детерминанту вируса ящура штамма O_{1-194} в составе плазмиды pVP1-O194; (б) – составную антигенную детерминанту штамма A_{22} в составе плазмиды p10FMD. Нумерация аминокислотных остатков соответствует таковой белка VP1 для каждого штамма вируса. Подчеркнуты нуклеотидные последовательности, входящие в состав олигонуклеотидных праймеров для амплификации (I)–(VI).

содержали бы в составе одной молекулы антигенные эпитопы различных штаммов вируса ящура и могли быть использованы в качестве поливалентной субъединичной вакцины. С этой целью мы решили клонировать в плазмиду p10FMD ген предполагаемой антигенной детерминанты штамма O_{1-194} , не удаляя при этом ген главной антигенной детерминанты штамма A_{22} . Необходимый для этого фрагмент ДНК был получен при помощи ПЦР на матрице pBRVP1-O194 с использованием олигонуклеотидных праймеров (III) и (IV) (таблица), содержащих сайты рестриктаз *Bam*HI и *Bgl*II. После расщепления соответствующими рестриктазами амплифицированный фрагмент клонировали в плазмиду p10FMD по уникальному сайту *Bam*HI (рис. 2). Отбор рекомбинантных клонов проводили анализом рекомбинантных ДНК при помощи совместного гидролиза рестриктазами *Bam*HI и

*Hind*III. При этом были обнаружены плазмиды, содержащие мономерные, димерные и тримерные вставки *Bam*HI/*Bgl*II-фрагмента. Таким образом, были получены плазмиды, кодирующие гибридные белки, в которых аминокислотная последовательность hTNF через последовательность 130–160 белка VP1 штамма O_{1-194} в виде мономера (плазмида pFMD151), димера (плазмида pFMD152) или тримера (плазмида pFMD153) соединена с аминокислотной последовательностью составной антигенной детерминанты белка VP1 штамма A_{22} (рис. 2).

Исследование экспрессии искусственных генов, кодирующих гибридные белки с антигенной детерминантой штамма O_{1-194} , с помощью электрофореза в SDS-ПААГ показало, что все содержащие их плазмиды (pFMD150–pFMD153) обеспечивают в клетках *E. coli* SG 20050 высокий уровень

биосинтеза гибридов с заметным снижением в случае олигомерных детерминант (рис. 3а). Способность гибридных белков взаимодействовать с антителами против hTNF, а также против двух штаммов вируса – A₂₂ и O₁₋₁₉₄ – была изучена методом иммуноблоттинга (рис. 3б–г). В качестве контроля была использована плазмида p10FMD, кодирующая С-концевой гибридом hTNF с составной антигенной детерминантой штамма A₂₂, а также плазмида rTNF3314, содержащая мутантный ген *tnf* [20]. Анализ показал, что все гибридные белки, как и ожидалось, взаимодействуют с поликлональными сыворотками против hTNF и против целого вируса ящера. При этом белок, кодируемый плазмидой pFMD150 и не содержащий последовательности главной антигенной детерминанты штамма A₂₂, не взаимодействует с антителами против вируса ящера штамма A₂₂. Наряду с этим белок, кодируемый плазмидой p10FMD и не содержащий главной антигенной детерминанты штамма O₁₋₁₉₄, не реагирует с антителами против O₁₋₁₉₄. Таким образом, специфичность взаимодействия этих белков с антителами против вируса ящера серотипов А и О, скорее всего, определяется природой главной антигенной детерминанты вируса.

Следует отметить, что все гибридные белки оказались нерастворимыми в клетках бактерий, образуя, по всей видимости, тела включения. Гибридные белки, биосинтез которых в клетках *E. coli* SG 20050 осуществляется под контролем плазмид pFMD150 и pFMD151, а также исходной плазмиды p10FMD, были выделены с помощью общепринятых методик [24] и использованы для иммунизации экспериментальных животных. Было обнаружено, что однократная иммунизация морских свинок каждым из гибридных белков обеспечивает образование вируснейтрализующих антител, а также защиту от вирусной инфекции. Для белков, содержащих составную антигенную детерминанту штамма A₂₂ (плазмида p10FMD) и O₁₋₁₉₄ (плазмида pFMD150), доза белка, обеспечивающая 50% защиту животного от инфекции, составила соответственно 37 и 50 мкг. Гибридный белок, содержащий

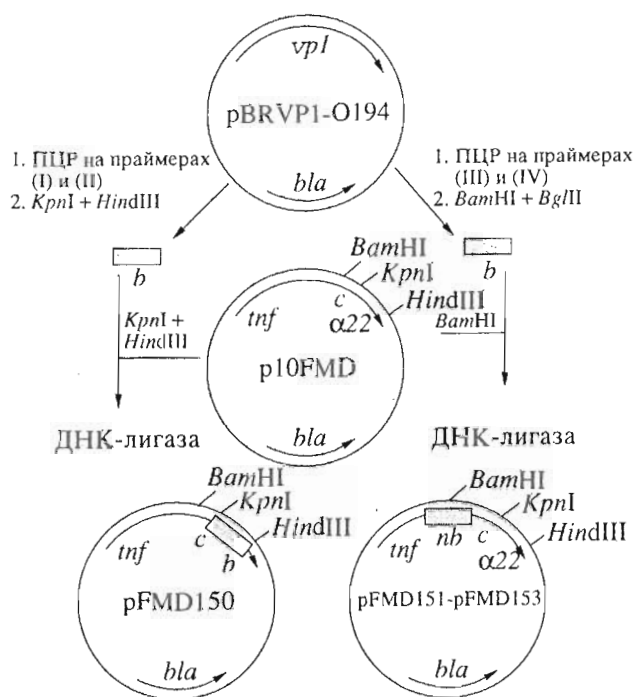


Рис. 2. Схема конструирования плазмид pFMD150–pFMD153. *bla* – ген β-лактамазы; *tnf* – ген фактора некроза опухолей человека; *vp1* – ген белка штамма O₁₋₁₉₄; *c* – константная антигенная детерминанта – участок ДНК, кодирующий последовательность 200–213 белка VP1 штамма A₂₂; α₂₂ – ген главной антигенной детерминанты штамма A₂₂; *b* – ген главной антигенной детерминанты штамма O₁₋₁₉₄; *n* – число клонированных фрагментов, равное 1, 2 и 3 (плазмиды pFMD151, pFMD152 и pFMD153 соответственно).

антигенные участки штаммов A₂₂ и O₁₋₁₉₄, при однократной иммунизации дозой 125 мкг защищал морских свинок от заражения как вирусом ящера штамма A₂₂, так и O₁₋₁₉₄. Таким образом, была показана принципиальная возможность получения на основе гибридных белков рекомбинантной субъединичной вакцины против двух серотипов вируса ящера.

На следующем этапе работы проводили конструирование плазмид, кодирующих гибриды

Структура синтетических олигонуклеотидов, использованных в качестве праймеров для амплификации*

Олигонуклеотид	Структура	Сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции
(I)	<u>CACACGGTACCCCTACAACGGAAACTGCAAGTA</u>	<i>KpnI</i>
(II)	CAACCAAGCTTAGGGCAGCGTTCTCGCCGCC	<i>HindIII</i>
(III)	CACACGGATCCTTTACAACGGAAACTGCAAGTA	<i>BamHI</i>
(IV)	CAACCAAGATCTGGGGGCAGCGTTCTCGGGGCC	<i>BglII</i>
(V)	CCTCCGGATCCAACGGTACCGGTAA	<i>BamHI</i>
(VI)	CAATACGTAAGTCGGAAGCTGAGCAGC	<i>SnaBI</i>
(VII)	CAGGAATYGGCCATGGAC	<i>NcoI</i>
(VIII)	GCATCGGTCCGACGTTAAT	<i>SalGI</i>

* Жирным шрифтом отмечены сайты узнавания рестриктаз; подчеркнуты нуклеотидные последовательности, комплементарные соответствующим участкам фрагментов ДНК (рис. 1).

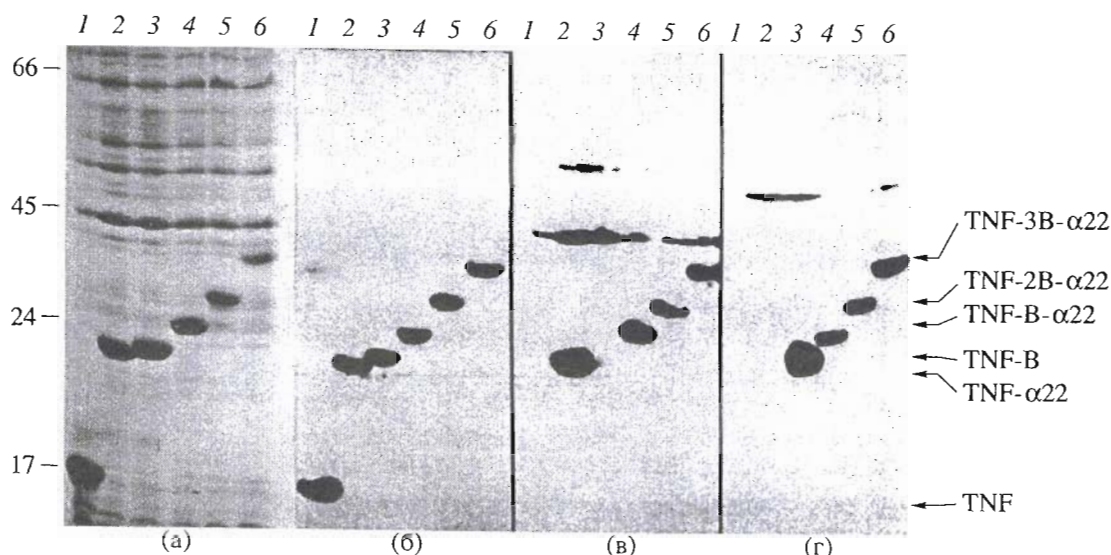


Рис. 3. Электрофорез (а) и иммуноблоты с поликлональными антителами к TNF (б) и вирусу ящура штамма A₂₂ (в) и O₁₋₁₉₄ (г) лизатов *E. coli* SG 20050 с плазмидами pTNF 3314 (1), p10FMD (2), pFMD150 (3), pFMD151 (4), pFMD152 (5), pFMD153 (6). Справа указаны положения гибридных белков, слева – молекулярные массы (кДа) белковых маркеров.

кор-антигена вируса гепатита В и антигенных детерминант вируса ящура. В качестве вектора для клонирования использовали плазмиду pCT78-2, экспрессирующую под контролем промотора триптофанового оперона *E. coli* ген рекомбинантного кор-антигена длиной 150 а.о., лишенного С-концевого аргининбогатого участка. Ко времени начала

данного исследования были получены гибридные белки, в которых чужеродные аминокислотные последовательности были встроены как в С-концевую область полноразмерного кор-антигена, так и по положению Pro¹⁴⁴ его укороченного с С-конца аналога [25]. Все полученные гибриды сохраняли способность к самосборке, а образуемые ими капсиды, по данным электронной микроскопии, были практически неотличимы от исходного НВсАг. Кроме того, гибридные белки, сохраняя антигенные и иммуногенные свойства исходного кор-антигена, приобретали иммуногенные свойства внедренных эпитопов.

Для выделения фрагмента ДНК, кодирующего составную антигенную детерминанту, была использована плазмида p10FMD. Полученный в результате гидролиза этой плазмиды рестриктазами *Bam*HI и *Hind*III фрагмент величины 169 п.о. после дотройки фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I лигировали с плазмидой pCT78-2, гидролизованной рестриктазой *Eco*RV (рис. 4). Полученная плазмида pCT78-2FMD-01 кодирует гибридный белок кор-антигена вируса гепатита В, несущий на С-концевом участке вблизи Pro¹⁴⁴ составную антигенную детерминанту вируса ящура подтипа A₂₂.

Этой плазмидой мы трансформировали штамм *E. coli* K802. Как показывает гель-электрофорез, клетки *E. coli* способны к синтезу значительного количества гибридного НВсАг (рис. 5а). Гибридный белок продуцируется в бактериальных клетках в растворимой форме, что позволило нам сравнительно легко очистить его из клеточного лизата гель-фильтрацией на колонке с сефарозой CL-4В. Мы провели предварительные иммунологические исследования этого белка методом иммуноблоттинга. Для этого были использованы кроличьи

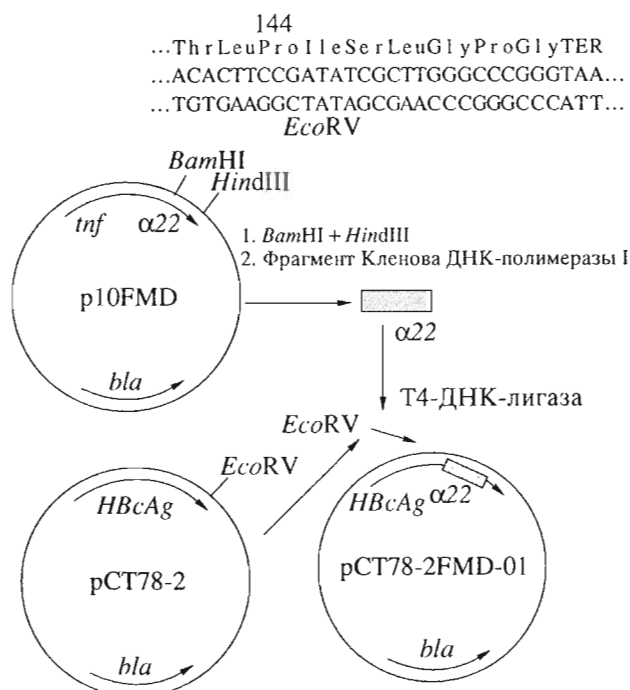


Рис. 4. Схема конструирования плазмиды pCT78-2FMD-01. α22 – ген антигенной детерминанты вируса ящура A₂₂; HBcAg – ген кор-антигена вируса гепатита В; *tnf* – ген фактора некроза опухолей человека. Приведена 3'-концевая последовательность гена HBcAg в плазмиде pCT78-2 и кодируемая ею аминокислотная последовательность.

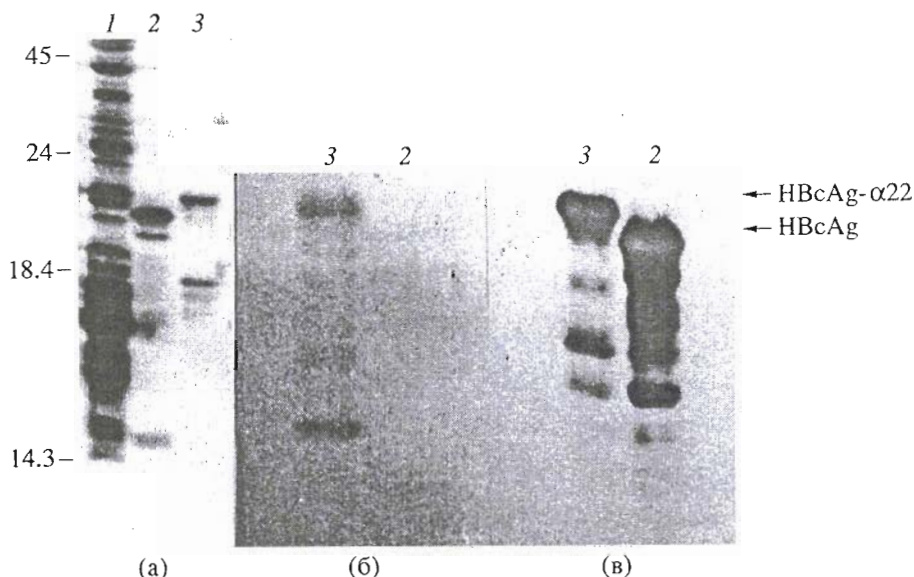


Рис. 5. Электрофорез (а) и иммуноблоты с поликлональными антителами к вирусу ящура штамма А₂₂ (б) и с моноклональными антителами к НВсАg (в) лизата клеток *E. coli* К802 с плазмидой рСТ78-2FMD-01 (1), а также очищенного из клеточного лизата белка НВсАg, кодируемого плазмидой рСТ78-2 (2), и гибридного белка, кодируемого плазмидой рСТ78-2FMD-01 (3). Справа указаны положения гибридных белков, слева – молекулярные массы (кДа) белковых маркеров.

поликлональная сыворотка против целого вируса ящура А₂₂ и моноклональные антитела МАК14 против кор-антигена вируса гепатита В. Видно, что гибридный белок взаимодействует как с антителами против кор-антигена, так и с антителами против целого вируса ящура подтипа А₂₂, в то время как сам кор-антиген не реагирует с противоящурными антителами (рис. 5б, в). Исследование полученного гибрида с помощью электронной микроскопии показало, что белок выделяется из клеток *E. coli* в виде частиц, по размеру (25 нм) и форме не отличимых от частиц НВсАg (рис. 6).

На основании данных о поверхностной локализации участка 78–83 кор-антигена [26], а также принимая во внимание, что фрагмент белка VP1 риновируса человека, встроенный в последовательность кор-белка между 80-м и 81-м а.о., оказался экспонированным на поверхности образовавшихся частиц [27], мы решили исследовать возможность получения срединных гибридов НВсАg, содержащих вставку иммуногенных эпитопов вируса ящура после 78-го а.о. Чтобы уменьшить длину вставки, для клонирования был выбран участок главной антигенной детерминанты штамма А₂₂, соответствующий последовательности 131–160 белка VP1 (рис. 1). Фрагмент ДНК, кодирующий этот участок в плазмиде р10FMD, был амплифицирован в ПЦР с помощью олигонуклеотидных праймеров (V) и (VI) (таблица) и после выделения из ПААГ гидролизован рестриктазами *Vam*HI и *Sna*BI для лигирования с гидролизованной этими же ферментами плазмидой рСТ78-2 (рис. 7). В результате была получена плаزمида рСТ78-2FMD-02, кодирующая гибридный белок НВсАg с срединной вставкой иммуногенного эпитопа А₂₂.

В связи с тем что уровень экспрессии полученного рекомбинантного гена оказался недостаточным, этот ген был переклонирован в плазмиду рTrc99A под контроль сильного регулируемого промотора trc. Для этого фрагмент плазмиды рСТ78-2FMD-02, содержащий рекомбинантный ген *НВсАg* длиной 594 п.о., был амплифицирован с помощью олигонуклеотидов (VII) и (VIII) (таблица) и после гидролиза рестриктазами *Nco*I и *Sal*GI лигирован с соответствующим векторным фрагментом

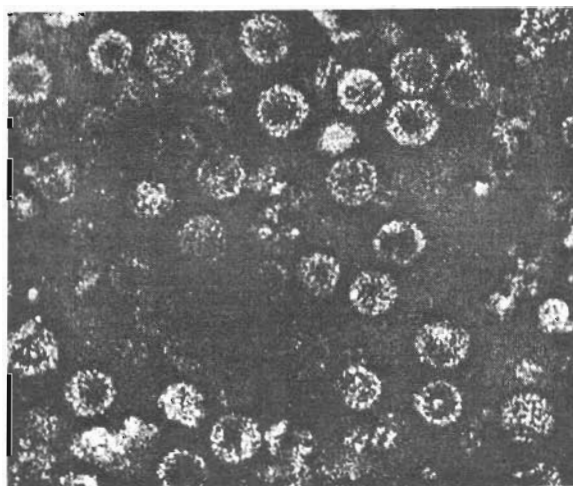


Рис. 6. Электронная микрофотография частиц, образованных гибридным кор-антигеном, содержащим на С-конце антигенную детерминанту вируса ящура штамма А₂₂. Препараты готовили методом негативного контрастирования 2% раствором фосфорновольфрамовой кислоты и исследовали в электронном микроскопе “JEM 100” (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении в 100000 раз.

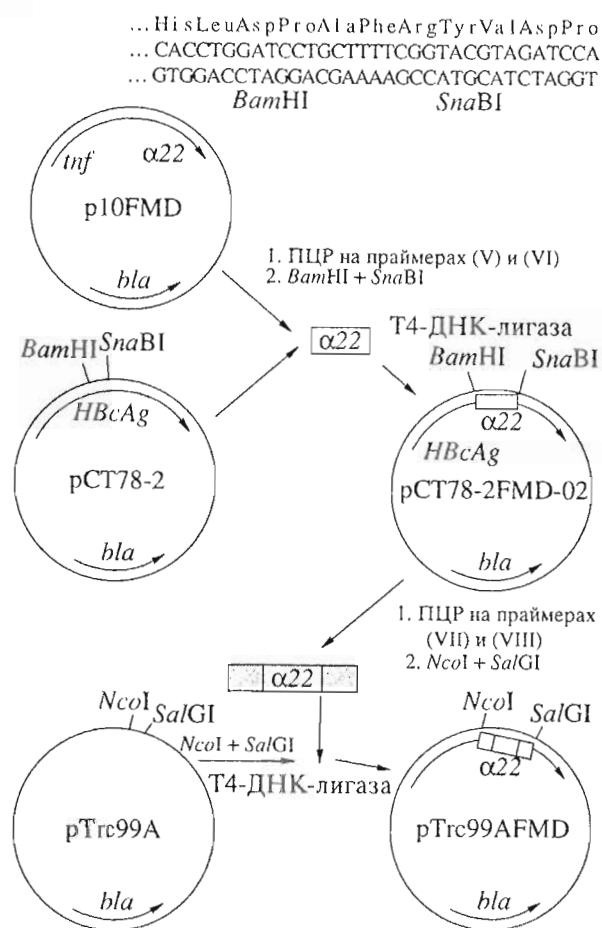


Рис. 7. Схема конструирования плазмиды pTrc99AFMD. Обозначения см. рис. 4 и 5. Приведена частичная структура гена HBcAg и кодируемая ею аминокислотная последовательность.

плазмиды pTrc99A с образованием плазмиды pTrc99AFMD (рис. 7).

Клетки *E. coli* XL-Blue с плазмидой pTrc99AFMD после индукции 1 mM IPTG продуцировали значительное количество гибридного белка (рис. 8а). Предварительные иммунологические исследования гибридного белка методами иммуноблоттинга (рис. 8б, в) показали его способность специфически взаимодействовать как с поликлональной сывороткой против кор-антигена вируса гепатита В, так и с поликлональными антителами против вируса ящура серотипа A₂₂.

Таким образом, сконструирован ряд рекомбинантных плазмид, несущих гены гибридов фактора некроза опухолей человека или кор-антигена вируса гепатита В и антигенных детерминант вируса ящура серотипов A₂₂ и O₁₋₁₉₄, и исследована их экспрессия в клетках *E. coli*. Иммунохимический анализ показал, что полученные гибриды специфически взаимодействуют с антисыворотками против hTNF, HBcAg, а также против целого вируса ящура двух серотипов – A₂₂ и O₁₋₁₉₄. Методом электронной микроскопии установлено, что гибридные белки на основе HBcAg обладают способностью к самосборке. Гибриды hTNF с антигенными детерминантами вируса ящура при иммунизации лабораторных животных индуцируют образование вируснейтрализующих антител и защищают животных от последующего заражения вирусом ящура. Гибридный белок, кодируемый плазмидой pFMD151 и содержащий иммуногенные эпитопы двух штаммов вируса (A₂₂ и O₁₋₁₉₄), защищает животных от заражения вирусом обоих серотипов.

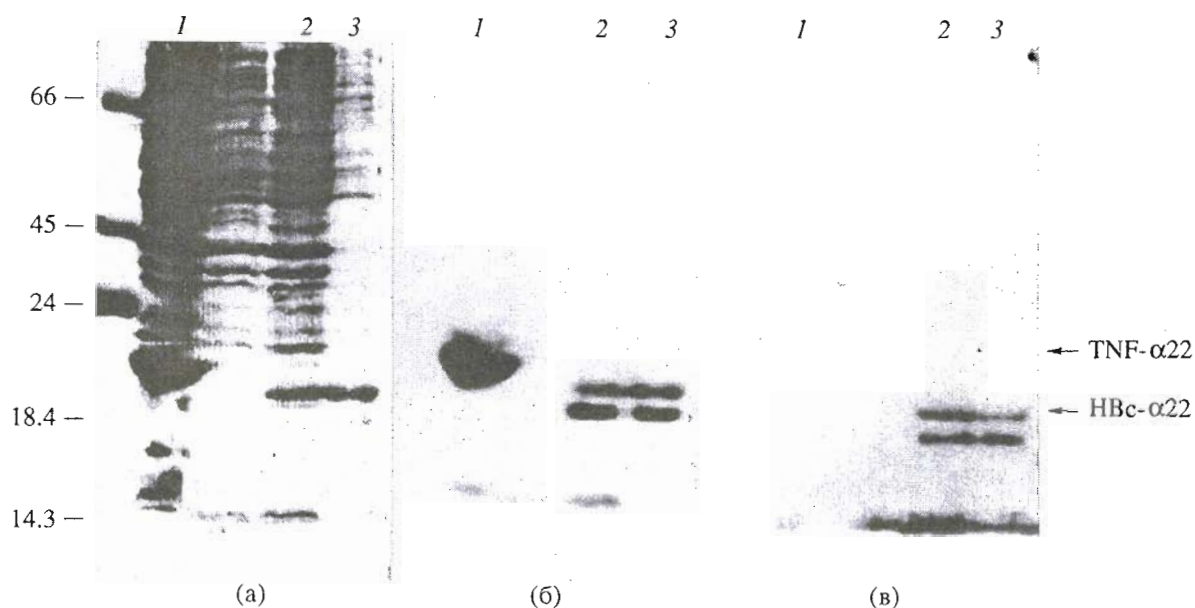


Рис. 8. Электрофорез (а) и иммуноблоты с поликлональными антителами к вирусу ящура A₂₂ (б) и с поликлональными антителами к HBcAg (в) лизатов клеток *E. coli* XL-1 с плазмидами p10FMD (1), pTrc99AFMD (2), а также гибридного белка, очищенного из клеточного лизата (3). Справа указаны положения гибридных белков, слева – молекулярные массы (кДа) белковых маркеров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: акриламид, трис, бис-акриламид, TEMED (Merck, Германия); EDTA, агарозу, дитиотреит, глицерин, бромистый этидий (Sigma, США); триптон, дрожжевой экстракт (Difco, Англия); глицин, персульфат аммония, додецилсульфат натрия (Serva, Германия); легкоплавкую агарозу (FMC, США); дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты (Pharmacia-PL, Швеция); эндонуклеазы рестрикции *Bgl*II, *Sal*GI, *Nco*I, *Bam*HI, *Sna*BI, *Eco*RV, *Bsp*I, *Kpn*I, *Hind*III и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (НПО "Фермент", Литва). ДНК-лигаза и полинуклеотидкиназа фага T4 выделены в лаборатории химии генов. [α - 33 P]dATP приготовлен в ИБХ РАН. Были использованы: поликлональная сыворотка против рекомбинантного hTNF (предоставлена Н.П. Берковой, ИБХ РАН), поликлональные антитела против целого вируса ящюра подтипов A₂₂ и O₁₋₁₉₄ (Институт защиты животных, г. Владимир), поликлональная сыворотка против кор-антигена вируса гепатита В (предоставлена В.И. Офицеровым, НПО "Вектор", Новосибирск), конъюгат иммуноглобулинов лошади против иммуноглобулинов кролика с пероксидазой хрена (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея, Москва). Моноклональные антитела МАК14 были предоставлены К. Платцер.

Бактериальные штаммы: *E. coli* XL-1 Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, Δ (*lac-proAB*)), {F' *proAB*, *lacI*^q Δ M15, Tn10 (*tet*^r)} фирмы Stratagene; *E. coli* K802 (*gal*⁻, *met*⁻, *supE*); SG 20050 (F⁻, *araD139*, Δ (*arg-lac*)U169, *deoC1*, *rpsL150*, *relA1*, Δ lon-100).

Плазмида pCT78-2 сконструирована в Биомедицинском центре Латвийского университета (Рига), pTc99A – продукт Pharmacia (Швеция). Приготовление компетентных клеток, трансформацию бактерий, выделение плазмидной ДНК, ферментативную обработку и электрофорез ДНК проводили согласно стандартным методикам [28].

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием набора для ПЦР по методике фирмы Perkin-Elmer Cetus (США). Для амплификации использовали дезоксирибонуклеотидные праймеры, приведенные в таблице.

Строение полученных плазмидных конструкций подтверждали рестриктным анализом и определением нуклеотидной последовательности участков ДНК, для чего использовали набор с ДНК-полимеразой фага T7 фирмы USB (США). Подготовку плазмидной матрицы и проведение реакции осуществляли согласно рекомендации фирмы.

Индукцию транскрипции осуществляли как описано в работе [29]. 100 мкл ночной культуры инокулировали в 150 мл LB, содержащего 100 мкг/мл ампициллина, и растили до мутности A₆₀₀ 0.3, добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Культуру выращивали при 37°C в течение 4–12 ч.

Денатурирующий электрофорез белков проводили по методу Лэммли [30]. Иммуноблоттинг

осуществляли с помощью прибора для полусухого переноса (Biotech, Дания) по методу [31].

При выделении гибридных белков TNF из клеточного лизата *E. coli* использовали следующие растворы: буфер А: 50 мМ трис-HCl (pH 8.0), 100 мМ NaCl, 10 мМ EDTA; буфер Б: 20 мМ трис-HCl (pH 9.2), 10 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 8 М мочевины; буфер В: 20 мМ K-NaPO₄ (pH 7.0), 10 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 8 М мочевины.

Биомассу, полученную из 0.5 л культуры, суспендировали в буфере А, озвучивали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т и центрифугировали 15 мин при 10000 об./мин. Осадок промывали 1% тритоном X-100 и 0.5 М NaCl в буфере А, а затем гибридный белок экстрагировали из осадка 2 мл буфера А, содержащего 8 М мочевины и 50 мМ дитиотреит, в течение 3 ч при 37°C. После отделения нерастворимого материала центрифугированием при 18000 об./мин в течение 20 мин раствор белка диализовали против буфера Б и пропускали через колонку (2 мл) целлюлозы DE-52, уравновешенной этим же буфером. Растворы, полученные после нанесения и промывки колонки буфером Б, объединяли и диализовали против буфера В, а затем наносили на колонку (2 мл) фосфоцеллюлозы, уравновешенной этим же буфером. Колонку промывали 50 мМ NaCl в буфере В, а затем элюировали гибридный белок 0.1 М NaCl. Раствор гибридного белка диализовали против буфера В, содержащего 2 М мочевины. Выход гибридного белка составил 20 мг из 1 л культуры.

Иммунизацию морских свинок проводили однократно с неполным адьювантом Фрейнда. Для определения протективного эффекта на 21-е сут после иммунизации 5 привитых и 5 контрольных животных заражали путем введения 1000 LD₅₀ вируса ящюра в объеме 0.1 мл. Эффективность защиты определяли по числу животных, не затронутых генерализованной формой ящюра.

Выделение гибридных белков HBcAg. После разрушения биомассы клеток *E. coli* ультразвуком растворимый белок, продуцируемый плазмидой pCT78-2FMD-01, очищали гель-фильтрацией на колонке (1.5 × 80 см) с сефарозой CL-48, уравновешенной Na-фосфатным буфером, содержащим 0.15 М NaCl (pH 8.0). Нерастворимый белок, продуцируемый плазмидой pTc99AFMD, растворяли в том же буфере, содержащем 8 М мочевины, и очищали гель-фильтрацией на колонке с сефариллом S-300.

Авторы выражают благодарность М.С. Щепинову (ИБХ РАН, Москва) за синтез олигонуклеотидов и В.И. Офицерову (ГНЦ вирусологии "Вектор", Новосибирск) за поликлональную сыворотку против кор-антигена вируса гепатита В.

Работа финансировалась грантом № 0.3.0004-357 в рамках ГНТП "Новейшие методы биотехнологии", раздел "Белковая инженерия".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barteling S.J., Vreeswijk J. // *Vaccine*. 1991. V. 9. P. 75–88.
2. Bittle J.L., Houghten R.A., Alexander H., Shinnik T.M., Suttcliffe J.G., Lerner R.A., Rowlands D.J., Brown F. // *Nature*. 1982. V. 298. P. 30–33.
3. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H.O., Schulz C.E., Shaller H. // *EMBO J.* 1982. V. 1. P. 869–874.
4. Francis M.G., Fry C.M., Rowlands D.J., Bittle J.L., Houghten R.A., Lerner R.A., Brown F. // *Immunology*. 1987. V. 61. P. 1–6.
5. Francis M.G., Hastings G.Z., Clarke B.E., Brown A.L., Beddell C.R., Rowlands D.J., Brown F. // *Immunology*. 1990. V. 69. P. 171–176.
6. DiMarchi R., Brook G., Gale C., Craknell V., Doel T., Mowat N. // *Science*. 1986. V. 232. P. 639–641.
7. Pay W.T., Hingley P.G. // *Vaccine*. 1987. V. 5. P. 65–70.
8. Francis M.F., Fry C.M., Rowlands D.J., Brown F. // *J. Gen. Virol.* 1988. V. 69. P. 2483–2491.
9. Mulcahy G., Pullen L.A., Gale C., DiMarchi R., Doel T.R. // *Vaccine*. 1991. V. 9. P. 19–24.
10. Francis M.J., Hastings G.Z., Syred A.D., McGinn B., Brown F. // *Nature*. 1987. V. 330. P. 168–170.
11. Collen T., DiMarchi R., Doel T.R. // *J. Immunol.* 1991. V. 146. P. 749–755.
12. Broekhuijsen M.P., van Rijn J.M., Blom A.J.M., Pouwels P.H., Enger-Valk B.E., Brown F., Francis M.J. // *J. Gen. Virol.* 1987. V. 68. P. 3137–3144.
13. Agterberg M., Adriaanse H., Lankhof H., Meloen R., Tomassen J. // *Vaccine*. 1990. V. 8. P. 85–91.
14. Ruppert A., Arnold N., Hobom G. // *Vaccine*. 1994. V. 12. P. 492–498.
15. Clarke B.E., Newton S.E., Carrol A.R., Francis M.J., Appleyard G., Syred A.D., Highfield P.E., Rowlands D.J., Brown F. // *Nature*. 1987. V. 330. P. 381–384.
16. Stahl S., MacKay P., Magazin M., Bruce S.A., Murray K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. P. 1606–1610.
17. Stahl S., Murray K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 6283–6287.
18. Clarke B.E., Brown A.L., Grace K.G., Hastings G.Z., Brown F., Rowlands D.J., Francis M.J. // *J. Gen. Virol.* 1990. V. 71. P. 1109–1117.
19. Milich D.R., McLachlan A. // *Science*. 1986. V. 234. P. 1398–1401.
20. Коробко В.Г., Болдырева Е.Ф., Некрасова О.В., Миккульскис А.В., Филиппов С.А., Добрынин В.Н. // *Биоорганическая химия*. 1991. Т. 17. С. 461–469.
21. Яров А.В., Гельфанов В.М., Гречанинова Л.А., Сыровой А.Ю., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Чепуркин А.В., Дрягалин Н.Н., Иванющенко В.Н. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. С. 1313–1317.
22. Kitson J.D., McCahon D., Belsham G.J. // *Virology*. 1990. V. 179. P. 26–34.
23. Онищенко А.М., Петров Н.А., Мамаева Н.В., Калашиникова Т.И., Гринев А.А., Сосновцев С.В., Дегтярев С.Х., Карпышев Н.Н., Перевозчикова Н.А., Иванющенко В.Н., Бурдов А.Н., Василенко С.К. // *Молекулярная генетика, микробиол. и вирусол.* 1990. № 4. С. 22–24.
24. Martson F.A.O. // *Biochem. J.* 1986. V. 260. P. 1–12.
25. Borisova G.P., Berzins I., Pushko P.M., Pumpen P., Gren E.J., Tsibinogin V.V., Loseva V., Ose V., Ulrich L., Siakkou H., Rosenthal H. // *FEBS Lett.* 1989. V. 259. P. 121–124.
26. Pushko P., Sallberg M., Borisova G., Ruden U., Bichko V., Wahren B., Pumpens P., Magnius L. // *Virology*. 1994. V. 202. P. 912–920.
27. Brown A.L., Francis M.J., Hastings G.Z., Parry N.R., Barnett P.V., Rowlands D.J., Clarke B.E. // *Vaccine*. 1991. V. 9. P. 595–601.
28. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование*. М.: Мир, 1984.
29. Amann E., Ochs B., Abel K.-J. // *Gene*. 1988. V. 69. P. 301–315.
30. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
31. Towbin H., Strahelin T., Gordon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. P. 4350–4354.

Bacterial Synthesis of Immunogenic Epitopes of Foot-and-Mouth Disease Virus Fused Either to Human Tumor Necrosis Factor or Hepatitis B Virus Core Antigen

O. V. Nekrasova, V. E. Boichenko, E. F. Boldyreva, G. P. Borisova*, P. Pumpens*,
N. A. Perevozchikova**, and V. G. Korobko

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow GSP-7, 117871 Russia;*

**Biomedical Research and Study Center, University of Latvia, Riga, Latvia;*

***All-Russian Research Institute for Animal Health, Vladimir, Russia*

Abstract—Using recombinant DNA technology, construction and bacterial expression of genes was carried out which code for hybrid proteins, human tumor necrosis factor and hepatitis B core protein fused to immunogenic epitopes of foot-and-mouth disease virus, strains A₂₂ and O₁₋₁₉₄. Hybrids of tumor necrosis factor with foot-and-mouth disease antigenic determinants protected laboratory animals against the experimental challenge with a homologous strain of foot-and-mouth disease virus. Hybrid protein that contained immunogenic regions of two strains, A₂₂ and O₁₋₁₉₄, protected animals against infection with both A and O serotypes. Hybrid proteins based on hepatitis B virus core antigen retained the ability to assemble into core-like particles.

Key words: foot-and-mouth disease virus, antigenic determinants, human tumor necrosis factor, hepatitis B virus core antigen, recombinant DNA, bacterial expression, hybrid proteins.