

УДК 57.083.3:616.578.7:616.579.61

СУПЕРСИНТЕЗ РОЗЧИННОГО ПРОТЕЇНУ — ПРОДУКТУ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА, ЩО МІСТИТЬ ІМУНОДОМІНАНТНІ ДІЛЯНКИ ГЛІКОПРОТЕЇНУ G ВІРУСУ ГЕРПЕСУ 2-ГО ТИПУ, У БАКТЕРІЙНІЙ СИСТЕМІ *Escherichia coli*

Л. М. Коршун¹
Л. М. Мойса¹
Г. В. Ковтонюк¹
Л. О. Ганова^{1,2}
О. К. Кисельова¹
М. Я. Співак²

¹АТЗТ НВК «Діапроф-Мед», Київ

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ

E-mail: KL2004@ukr.net

На сьогодні в усьому світі значно зросла розповсюдженість інфекцій, спричинених вірусами простого герпесу типів 1 та 2. Захворювання, спричинені вірусом герпесу 2-го типу, проходять у більш тяжкій формі, з частішими рецидивами та ускладненнями порівняно з тими, які зумовлені збудником 1-го типу. Тому при проведенні клініко-лабораторних досліджень важливого значення набуває диференційна діагностика між цими двома типами вірусу.

Мета роботи полягала в оптимізації умов бактеріальної експресії рекомбінантного протеїну, що містить імунодомінантні ділянки глікопротеїну G вірусу простого герпесу 2 типу, в клітинах *Escherichia coli* та отримання високоочищеного препарату, придатного для використання у складі імуносорбенту при розробленні діагностичних тест-систем.

Встановлено, що рекомбінантний поліпептид накопичується у клітинах бактерій як у розчинній формі, так і у вигляді тілець включень. Показано вплив складу живильного середовища, температури експресії та концентрації ППТГ на рівень накопичення гетерологічного протеїну та його імунохімічні властивості. Зменшення концентрації ППТГ до 0,1 мМ за температури культивування продуцента при 37 °С із використанням середовища ТВ (1,2% бактотриптон, 2,4% дріжджового екстракту, 55 мМ гліцеролу, 17 мМ KH_2PO_4 , 72 мМ K_2HPO_4 , рН 7,2) дає змогу досягти найвищого показника біосинтезу розчинного протеїну.

Цільовий продукт очищали з використанням технологій афінної хроматографії. Питомий вихід очищеного протеїну із клітинного супернатанта за оптимізованих умов становив 78,74% від загальної кількості рекомбінантного протеїну в клітині.

Імунохімічні властивості протеїну GST-HSV2gG оцінювали за допомогою імуноензимної тест-системи. Результати досліджень свідчать про перспективність його використання при розробленні тест-систем для діагностики вірусу герпесу 2-го типу.

Ключові слова: рекомбінантні протеїни, експресуючі вектори, вірус простого герпесу людини 2-го типу, імуноензимний аналіз, *Escherichia coli*.

На сьогодні в усьому світі значно зросла розповсюдженість інфекцій, спричинених вірусами простого герпесу типів 1 та 2 (ВПГ-1 та ВПГ-2, відповідно). Згідно зі звітами ВОЗ, у дорослого населення ВПГ-1 виявляється в 98–99%, а ВПГ-2 — у 20–25% [1]. Як свідчать епідеміологічні дослідження, проведені за останні 30 років, поширеність герпетичної інфекції залежить від віку, соціально-економічного статусу досліджуваних осіб, географічного розташування країни тощо [2].

Більшість людей інфіковані одним або двома типами ВПГ, який зберігається в організмі впродовж усього життя. Слід зауважити, що захворювання, спричинені вірусом герпесу 2-го типу, мають більш тяжкий перебіг, з частішими рецидивами та ускладненнями порівняно з тими, які зумовлені збудником 1-го типу [2–4]. Особливу загрозу інфекція становить для вагітних жінок, оскільки в результаті трансплацентарної передачі ВПГ-2 смертність у новонароджених у разі розвитку герпетичних енцефалітів та

менінгітів становить близько 70% [5]. Тому під час проведення клініко-лабораторних досліджень важливого значення набуває диференційна діагностика між цими двома типами вірусу.

Встановлено, що геноми ВПГ-1 та ВПГ-2 мають 83% гомології ДНК, що призводить до ідентичності 85% амінокислотної послідовності деяких протеїнів. Так, ВПГ-1 та ВПГ-2 містять у складі оболонки 11 глікопротеїнів [6, 7], що дають перехресну реактивність, яка ускладнює серологічну діагностику захворювань. Відкриття глікопротеїну G (gG) у середині 1980-х років дозволило вирішити цю проблему завдяки типоспецифічним розбіжностям у структурі цього протеїну для ВПГ-1 та ВПГ-2 [6–8].

Сучасна діагностика ВПГ ґрунтується на прямому виділенні вірусу з клінічного матеріалу, а також на серологічних методах. Ідентифікацію вірусу проводять з використанням культур клітин або лабораторних тварин. Однак останні методи є досить трудомісткими, високовартісними та тривалими і не завжди можуть бути типоспецифічними щодо ВПГ-1 та ВПГ-2. Серед рутинних лабораторних досліджень найпоширенішим є метод твердофазного імуноензимного аналізу (ІЕА), що дає змогу виявляти вірусоспецифічні антигени або вірусоспецифічні антитіла класів М та G залежно від виду біологічного матеріалу [9].

У процесі розроблення комерційних ІЕА-діагностичних тест-систем як антигени застосовують отримані з лізатів заражених культур нативні протеїни ВПГ або їхні рекомбінантні аналоги [10–12]. Використання лізатних протеїнів забезпечує високу чутливість методу, проте не є високоспецифічним і, крім того, пов'язане з багатьма біологічними ризиками. У сучасному біотехнологічному виробництві для одержання рекомбінантних протеїнів застосовують різні біологічні системи: мікроорганізми, клітинні лінії комах, рослин та ссавців, багатоклітинні організми тощо. Одне з провідних місць серед зазначених об'єктів належить бактеріям *Escherichia coli*. Це зумовлено тим, що генетичні, молекулярно-біологічні, біохімічні та фізіологічні властивості цього мікроорганізму досить детально вивчено, а в разі використання таких штамів-продуцентів рівень біосинтезу цільового протеїну може становити десятки відсотків від сумарних клітинних протеїнів.

Мета роботи полягала в оптимізації умов бактеріальної експресії рекомбінантного протеїну, що містить імунодомінантні

ділянки глікопротеїну G вірусу простого герпесу 2-го типу, у клітинах бактерій *Escherichia coli* та отримання високоочищеного препарату, придатного для використання у складі імуносорбенту при розробленні діагностичних ІЕА тест-систем.

Матеріали і методи

Бактеріальні культури та експресуючі вектори. Штам-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG було створено на основі вектора pET28a (Novagen) клонуванням послідовності глутатіон-S-трансферази (GST) та фрагментів імунодомінантних ділянок глікопротеїну G ВПГ-2 з використанням експресуючої системи реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3) [*E. coli* B F⁻ dcm ompT hsdS (*r_B m_B*) gal λ (DE3)]. В одержаній генно-інженерній конструкції транскрипція клонованого гена контролюється промотором гена 10 фага T7, а біосинтез цільового продукту індукується за допомогою ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозиду (ІПТГ).

Готували компетентні клітини та здійснювали їх трансформацію рекомбінантною плазмідною згідно зі стандартними протоколами [13]. Отриману суміш бактерій висівали на агаризоване середовище LB (1% бактотриптон, 0,5% дріжджового екстракту, 1% NaCl, 1,5% агару «Дифко»), що містило селективний антибіотик канаміцин в кінцевій концентрації 25 мкг/мл. Для відбору найбільш продуктивного клону зразки біомас аналізували за допомогою електрофорезу в денатуруючих умовах з використанням 12% ПААГ у присутності 1% SDS з наступним забарвленням гелю розчином Кумасі R-250 за методом Леммлі [14].

Культивування штаму-продуцента. Бактеріальну культуру, вирощену з найпродуктивнішого клону впродовж 16–18 год за температури 30 °C з використанням середовища LB у присутності селективного антибіотика, пересівали на свіже живильне середовище в розведенні 1:30. Подальшу інкубацію клітин проводили при температурі 25 °C і 37 °C в умовах інтенсивного перемішування (220 об/хв) та аерації. Для одержання біомаси продуцента застосовували такі живильні середовища: LB (1% бактотриптон, 0,5% дріжджового екстракту, 1% NaCl, рН 7,2), ТВ (1,2% бактотриптон, 2,4% дріжджового екстракту, 55 мМ гліцеролу, 17 мМ КН₂РО₄, 72 мМ К₂НРО₄, рН 7,2) та середовище № 3 оригінального складу (сольова основа М9 з додаванням 1% гідролізату казеїну, 0,5% дріжджового

екстракту та 1% глюкози, рН 7,4). Динаміку росту бактеріальної культури контролювали, вимірюючи оптичну густину (ОГ) на спектрофотометрі (Ultrospec 2000) за довжини хвилі 600 нм, і на фазі експоненційного росту клітин у живильне середовище додавали ІПТГ для індукції біосинтезу цільового протеїну. Після завершення культивування бактеріальну суспензію збирали центрифугуванням при 8 000 g протягом 10 хв.

Отримання очищеного препарату рекомбінантного протеїну. Для виділення рекомбінантного протеїну осад бактеріальних клітин ресуспендували в лізуючому буфері, що містив 0,1 мг/мл лізоциму, 0,1% Тритону Х-100, 1 мМ PMSF, 0,2 М NaCl, рН 8,0. Клітинну суспензію тричі заморожували-відтаювали, додавали ДНК-азу (Sigma, США) в кінцевій концентрації 6 од/мл у присутності 20 мМ MgSO₄. Після інкубації протягом 1 год бактеріальну суспензію обробляли ультразвуком на дезінтеграторі УЗДН-А (6 разів по 10 с). Надосадову рідину та тільця включень розділяли центрифугуванням при 11 000 g упродовж 25 хв за 10 °С. Тільця включень, попередньо відмиті в буферних розчинах, що містили детергенти (0,5% Тритону Х-100, 0,1% Твін-20), розчиняли в буфері, що містив 8 М сечовини, 20 мМ натрій-фосфату та 0,2 М NaCl, рН 8,0.

Хроматографічне очищення рекомбінантного протеїну здійснювали за допомогою хроматографічної системи Bio-Rad (США) із застосуванням методів іммобілізованої металоафінної хроматографії (IMAX) з використанням сорбенту IDA-toyoperl (TOSOH, Японія), попередньо активованим іонами нікелю згідно з інструкцією фірми-виробника. Елюцію протеїну проводили способом ступінчастої хроматографії з різними концентраціями імідазолу (40–200 мМ). У разі накопичення протеїну в клітинах *E. coli* в розчинному вигляді його подальше доочищення здійснювали методом афінної хроматографії з використанням сорбенту глутатіон-сефарози (Amersham, США), а елюцію — за допомогою розчину 10 мМ відновленого глутатіону і 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Концентрацію протеїну вимірювали біуретовим методом, а якість очищення оцінювали за допомогою електрофорезу в 12%-му ПААГ-SDS.

Оцінювання імунохімічних властивостей протеїнових фракцій. Для тестування застосовували внутрішньовиробничу панель сироваток крові (ВВП, «Діапроф-Мед»), зразки якої містять (16 сироваток) і не містять (14 сироваток) антитіла класів G до

ВІП-2. Усі зразки панелі було попередньо досліджено та підтверджено в імуноензимних тест-системах Herpes Simplex Virus HSV-Type 2 IgG-ELISA (Ltd. Nova Tec, Німеччина) та HSV 2-IgG (Ltd. Immulite, США).

Якісні характеристики рекомбінантного протеїну оцінювали за допомогою тест-системи у форматі непрямого ІЕА. Для приготування імуносорбенту використовували полістиролові 96-лункові планшети (Nunc, Данія), в лунки яких сорбували досліджувані зразки в 50 мМ карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9,6). Специфічні імунні комплекси антиген-антитіло виявляли з використанням мишачих моноклональних антитіл, мічених пероксидазою, що розпізнають IgG людини.

Як проявник імуноензимної реакції використовували хромоген тетраметилбензидин (ТМБ), розведений у цитратному буфері з додаванням перексиду водню. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 М сірчаної кислоти. ОГ визначали на спектрофотометрі Labsystems Multiskan (Фінляндія) у двоххвильовому режимі 492/620 нм.

Результати ІЕА розраховували за формулою (1):

$$A = (cp.O\Gamma^+) / (cut\ off),$$

де в числівнику показник $(cp.O\Gamma^+)$ — середнє значення позитивних сироваток, а в знаменнику величина $cut\ off = (cp.O\Gamma^-) + 0,2$, де $(cp.O\Gamma^-)$ — середнє значення негативних сироваток. Кожну досліджувану сироватку тестували в чотирьох повторах.

Статистичне оцінювання одержаних результатів виконували стандартними методами з використанням *t*-критерію Стьюдента за допомогою програмного забезпечення *Microsoft Excel*.

Результати та обговорення

На основі використання вектора рЕТ28а раніше нами було створено рекомбінантну плазмиду рЕТ28-GST-HSV2gG, продуктом експресії якої в клітинах штаму-реципієнта *E. coli* BL21(DE3) є гібридний поліпептид, що містить афінний тег у вигляді шести гістидинових залишків *His6-tag* та амінокислотну послідовність глутатіон-S-трансферази, зливу з імунодомінантними ділянками глікопротеїну G ВІП-2 (GST-HSV2gG).

На початковому етапі досліджень проводили скринінг трансформованих бактеріальних клітин для відбору найбільш продуктивного клону. Дані електрофореграми (рис. 1) наочно свідчать, що лише у 25% трансфор-

мантів спостерігали суперсинтез цільового продукту. Відібрані клони було перевірено на плазмідну стабільність та величину рівня експресії в ході декількох пересівів культури продуцента.

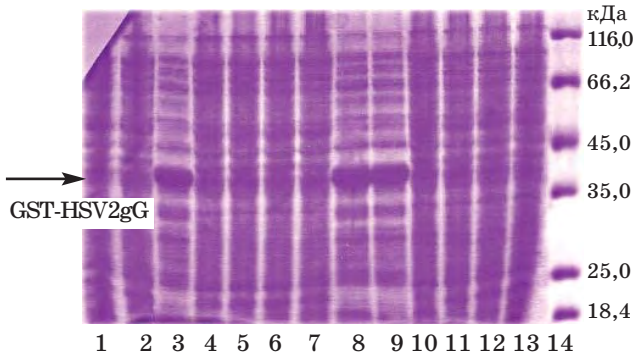


Рис. 1. Електрофореграма зразків біомас клонів-трансформантів *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG, отриманих після індукції 1 мМ IPTG протягом 3,5 год: зразок № 10 — лізат вихідних клітин штаму-реципієнта *E. coli* BL21(DE3); зразок № 14 — протеїни-маркери молекулярної маси (Fermentas)

Відомо, що клітини бактерій *Escherichia coli* широко застосовують для одержання рекомбінантних протеїнів як для наукових досліджень, так і з комерційною метою. Проте, незважаючи на велику кількість отриманих знань щодо механізмів біосинтезу та нагромадження гетерологічних протеїнів, а також відомостей про те, що утворення вторинних метаболітів залежить від складу середовища, яке використовують для росту культур мікроорганізмів [15], на думку деяких авторів, ще недостатньо уваги приділяється дослідженням впливу складу живильних середовищ на процес накопичення рекомбінантних протеїнів [16]. У своїх роботах вони переконливо довели, що склад середовища може суттєво впливати як на вихід біомаси і рівень накопичення рекомбінантних протеїнів, так і на їхні якісні характеристики. Тому моніторинг складу середовищ слід розглядати як рутинну частину оптимізації біотехнологічних процесів.

Таблиця 1. Загальний вихід біомаси та очищеного препарату протеїну GST-HSV2gG залежно від типу живильного середовища, використаного для культивування штаму-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG

Тип живильного середовища	Загальний вихід біомаси, г/л	Вихід очищеного протеїну після лізису біомаси, мг/г		Вихід очищеного протеїну, мг/л	
		із супернатанта	із фракції тілець включень	із супернатанта	із фракції тілець включень
LB	2,1	9,6	4,4	19,2	8,8
ТВ	4,0	12,5	4,3	50,0	17,2
Середовище №3	5,1	8,4	5,3	42,8	27,0

Результати наших досліджень повністю підтверджують такий підхід. Встановлено, що склад живильного середовища впливає не лише на загальний вихід біомаси, але й на властивості цільового продукту. Так, згідно з наведеними в табл. 1 даними, вихід біомаси при культивуванні продуцента на середовищі LB за температури 37 °C становив 2,1 г, на середовищі ТВ — 4,0 г, а в разі його вирощування на середовищі № 3 цей показник дорівнював 5,1 г біомаси в розрахунку на 1 л живильного середовища.

Електрофоретичний аналіз протеїнових фракцій, отриманих у процесі виділення та очищення, показав, що гетерологічний протеїн GST-HSV2gG накопичується в клітинах бактерій *E. coli* BL21(DE3) як у вигляді тілець включень, так і в розчинній формі (рис. 2). При цьому найвищий рівень накопичення його в розчинному вигляді спостерігали на середовищі ТВ — 12,5 мг на 1 г біомаси або 50 мг у розрахунку на одиницю об'єму (1л) культурального середовища (табл. 1). Молекулярна маса цільового протеїну збігалася з теоретично розрахованою і становила 35,4 кДа.

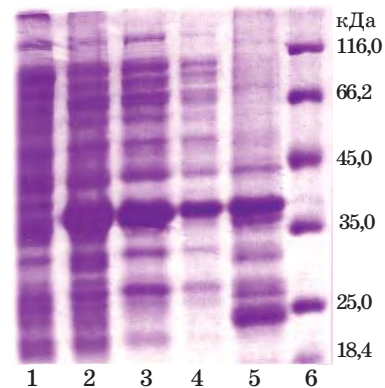


Рис. 2. SDS-ПААГ-аналіз співвідношення протеїнових фракцій рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG у клітинах штаму-продуцента за умов його культивування з використанням середовища ТВ при температурі 37 °C:

1 — лізат клітин штаму-реципієнта *E. coli* BL21(DE3); 2 — сумарні протеїни індукованих клітин; 3 — супернатант після лізису біомаси; 4 — зразок відмивки тілець включень; 5 — фракція тілець включень, розчинених у буфері з 8М сечовиною; 6 — протеїни-маркери молекулярної маси (Fermentas)

Отримані нами результати досліджень, які показали, що процес мікробного синтезу рекомбінантного протеїну відбувається як у розчинній формі, так і у вигляді нерозчинних тілець включень, зумовили необхідність оцінити його біологічні властивості за критерієм ІЕА-специфічної активності. На рис. 3 наведено дані порівняльного оцінювання імунохімічної активності очищених препаратів протеїнів із цих фракцій у разі використання їх у складі імуносорбенту імуноензимної тест-системи. Для кількісної оцінки величини активності рекомбінантного протеїну застосовували показник A , який розраховували за формулою (1). На діаграмі добре видно, що відповідні показники активності мали достовірно вищі значення для протеїну, виділеного з клітинного супернатанта після лізису біомаси, порівняно із фракцією тілець включень ($P < 0,05$). Ця залежність спостерігалася для всіх типів живильних середовищ, використаних для культивування продуцента.

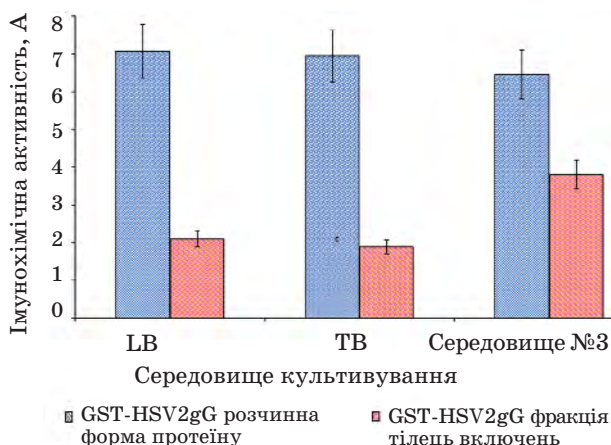


Рис. 3. Порівняльна оцінка імунохімічної активності очищених препаратів рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG, отриманих із розчинної та нерозчинної фракцій клітинної біомаси штаму-продуцента залежно від типу культурального середовища

Таку різку зміну якісних властивостей протеїну у формі тілець включень можна пояснити тим, що агрегація молекул у клітинах бактерій впливає на його структурно-функціональні характеристики, призводячи до зниження активності, а наступне застосування денатуруючих фізико-хімічних агентів у процесі рефолдингу посилює цей негативний вплив [17].

Як відомо з літератури, суперсинтез розчинних протеїнів значною мірою залежить від особливостей генно-інженерної конструкції продуцентів та умов їх культивування [18, 19].

Так, наприклад, ПТТГ може впливати на запуск механізму транскрипції клонованого гена та рівень експресії цільового протеїну, а також на метаболізм клітини-хазяїна [20], гальмуючи ріст бактерій [21, 22]. Відомо, що величина накопичення продукту мікробного синтезу не завжди пропорційна часу його експресії [22]. Температура вирощування продуцента теж є важливим чинником, що впливає на вихід експресованого клітиною чужого для неї протеїну [23]. Як правило, у більшості випадків зниження температури після індукції біосинтезу призводить до підвищення рівня накопичення розчинного протеїну [19]. Слід зауважити, що наявність послідовності глутатіон-S-трансферази як афінного партнера у складі рекомбінантної молекули є одним із факторів, що можуть посилювати розчинність злитих із GST поліпептидів [24, 25]. Тому наступні етапи нашої роботи передбачали проведення оптимізації умов бактеріальної експресії з метою отримання максимального виходу розчинної фракції рекомбінантного поліпептиду GST-HSV2gG з урахуванням вищенаведених технологічних підходів.

Як уже зазначалося, найвищий рівень біосинтезу розчинної форми протеїну під час культивування продуцента *E. coli BL21 (DE3) / pET28-GST-HSV2gG* спостерігали на середовищі TB, тому його використовували в подальших дослідженнях. Насамперед вивчали динаміку накопичення рекомбінантного продукту в клітинах бактерій залежно від температури експресії (25 °C і 37 °C) та в присутності різних концентрацій ПТТГ (0,1 мМ і 1 мМ). Як свідчать результати, наведені на рис. 4, максимальний вихід цільового протеїну спостерігали через 3,5 год після індукції ПТТГ незалежно від температурного режиму культивування продуцента.

Варто зазначити, що співвідношення фракцій протеїну в розчинній та нерозчинній формі в процесі біосинтезу залежить як від температури експресії протеїну, так і від концентрації ПТТГ. На рис. 5 добре видно, що за умов культивування продуцента при температурі 25 °C спостерігається стійка тенденція до збільшення рівня накопичення протеїну в розчинному вигляді з використанням вищої концентрації індуктора 1 мМ ПТТГ порівняно з концентрацією 0,1 мМ. З іншого боку, як впливає з табл. 2, за умов проведення бактеріальної експресії при температурі 37 °C найвищого виходу очищеного протеїну із супернатанта після лізису біомаси (26,3 мг/г) було досягнуто з використанням 0,1 мМ ПТТГ, який перевищував у 2,7 раза вихід протеїну (9,8 мг/г) при концентрації 1 мМ ПТТГ.

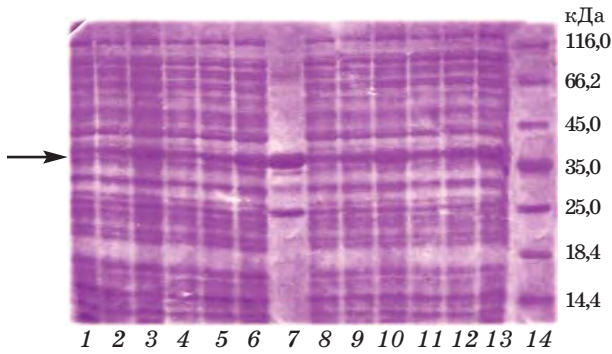


Рис. 4. Динаміка мікробного синтезу рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG залежно від температури культивування продуцента з використанням середовища ТВ при 25 °C (треки 1–6) та 37 °C (треки 8–13)

у присутності різних концентрацій ППТГ: 0,1 мМ ППТГ — треки 1, 2, 3 та 8, 9, 10; 1 мМ ППТГ — треки 4, 5, 6 та 11, 12, 13 впродовж 1 год (треки 1, 4, 8, 11), 2 год (треки 2, 5, 9, 12) та 3,5 год після індукції ППТГ (треки 3, 6, 10, 13); 7 — хроматографічно очищений протеїн GST-HSV2gG; 14 — протеїни-маркери молекулярної маси (Fermentas)

Як уже зазначалося, рекомбінантна плазміда pET28-GST-HSV2gG містить у своєму складі імунодомінантні ділянки глікопротеїну G ВПГ-2 та послідовності двох афінних партнерів — *His6-tag* і GST в N-кінцевій ділянці молекули. Шестигістидиновий тег часто застосовують у процесі одержання рекомбінантних протеїнів, оскільки він має декілька очевидних переваг: невеликий розмір, що не впливає на властивості гібридного протеїну, а також досить сильну взаємодію з деякими іонами перехідних металів (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}), що дає змогу здійснювати очищення за допомогою методу іммобілізованої металоафінної хроматографії [26, 27]. Послідовність глутатіон-S-трансферази, окрім функції підвищення рівня синтезу цільового протеїну в розчинній формі, також виконує роль афінного тегу. Це дає змогу проводити процес доочищення протеїну на глутатіонсефарозі завдяки утворенню комплексу між глутатіоном сорбенту

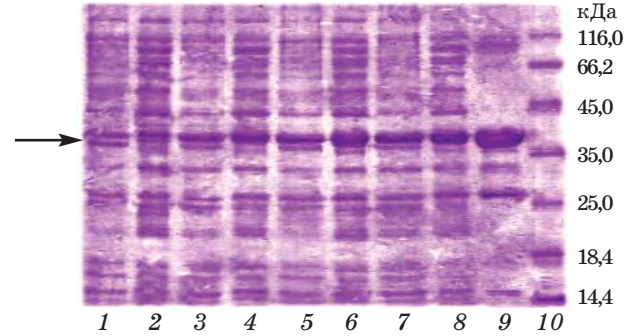


Рис. 5. Вплив різних температурних режимів на рівень експресії розчинної фракції (треки 2, 4, 6, 8) та нерозчинних тілець включень (треки 1, 3, 5, 7) рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG у клітинах штаму-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG:

за умов його культивування з використанням середовища ТВ при 25 °C (треки 1–4) та 37 °C (треки 5–8), індукованих 0,1 мМ ППТГ (треки 1, 2, 5, 6) та 1 мМ ППТГ (треки 3, 4, 7, 8) упродовж 3,5 год після індукції; 9 — хроматографічно очищений протеїн GST-HSV2gG; 10 — протеїни-маркери молекулярної маси (Fermentas)

та GST-послідовністю протеїну. Елюцію цільового протеїну із сорбенту в даному разі здійснюють за допомогою розчину відновленого глутатіону.

У нашій роботі на першому етапі очищення протеїну GST-HSV2gG застосовували метод IMAx з використанням сорбенту IDA-toyopearl, активованого іонами нікелю. Хроматограму очищення цільового протеїну з розчинної фракції лізату біомаси подано на рис. 6, А. Очищену на IDA-toyopearl протеїнову фракцію (рис. 6, Б, трек 3) далі наносили на колонку з глутатіонсефарозою. Питомий вихід очищеного препарату протеїну з клітинного супернатанта за оптимізованих умов становив 78,74% загальної кількості рекомбінантного протеїну в клітині. Слід зазначити, що такий двоступеневий підхід до розроблення технології очищення з використанням сорбентів IDA-toyopearl та глутатіонсефарози дав можливість значно підвищити специфічність IEA, не призводячи

Таблиця 2. Вихід очищеного рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG, експресованого в клітинах штаму-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG залежно від температури культивування та концентрації ППТГ у живильному середовищі ТВ

Температурний режим культивування штаму-продуцента	Вихід очищеного протеїну, мг/г біомаси			
	0,1 мМ ППТГ		1 мМ ППТГ	
	із супернатанта після лізису біомаси	із фракції тілець включень	із супернатанту після лізису біомаси	із фракції тілець включень
25 °C	5,4	8,1	11,9	7,3
37 °C	26,3	7,1	9,8	3,4

до зменшення його чутливості (дані не наведено). При цьому, як свідчать дані табл. 3, якісні характеристики протеїну GST-HSV2gG були зіставними з показником активності (показник А) комерційного аналога HSV2-gG2c виробництва LTD.Viral Therapeutics (США), використаного як референс-зразок ($P > 0,05$).

Таблиця 3. Порівняльна оцінка якісних характеристик очищеного з клітинного супернатанта протеїнового препарату GST-HSV2gG та комерційного аналога HSV2-gG2c (виробництво LTD.Viral Therapeutics, USA) у разі використання їх у складі імуносорбенту діагностичної тест-системи

Рекомбінантний протеїн	Імунохімічна активність, А	P
GST-HSV2gG	6,66 ± 0,47	P > 0,05
HSV2-gG2c	6,88 ± 0,51	

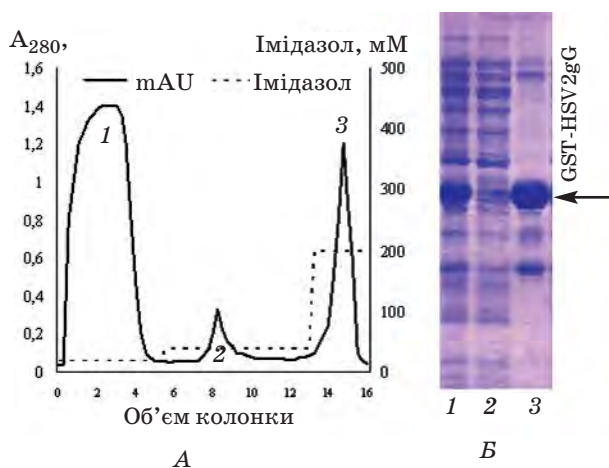


Рис. 6. IMAx-профіль очищення на сорбенті IDA-touorear1 зразків рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG, отриманих із розчинної фракції лізату біомаси (А):

1 — протеїни, що не зв'язались із сорбентом; 2 — неспецифічно зв'язані із сорбентом клітинні протеїни; 3 — цільовий протеїн;

SDS-ПААГ-аналіз зразків хроматографічних фракцій (Б):

1 — супернатант після лізису біомаси; 2 — протеїни, що не зв'язались із сорбентом, 3 — хроматографічно очищений протеїн GST-HSV2gG

ЛІТЕРАТУРА

1. Дранник Г. М., Свідро О. В. Torch-інфекції: герпес // Клин. имун. алл. инфектол. — 2006. — № 1. — С. 3–17.
2. Казмирчук В. Е., Мальцев Д. В. Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека. — К.: Феникс, 2009. — 248 с.
3. Gorander S., Svennerholm Bo., Liljeqvist J.-A. Secreted portion of Glycoprotein G of Herpes

Simplex Virus Type 2 Is a Novel Antigen for Type-Discriminating Serology // J. Clin. Microbiol. — 2003. — V. 41, N 8. — P. 3681–3686.

Таким чином, результати досліджень свідчать про те, що одержаний із розчинної фракції високоочищений препарат протеїну GST-HSV2gG за своїми імунохімічними характеристиками є перспективним для використання у складі імуносорбенту з метою розроблення вітчизняних імуноензимних тест-систем для діагностики вірусу герпесу людини 2-го типу.

Встановлено, що рекомбінантний протеїн, який містить імунодомінантні ділянки глікопротеїну G вірусу герпесу 2-го типу, злиті з послідовністю глутатіон-S-трансферази, накопичується в клітинах бактерій *Escherichia coli* як у розчинній формі, так і у вигляді тілець включень. Показано вплив складу живильного середовища, температури експресії та концентрації ІПТГ на рівень накопичення гібридного протеїну та його імунохімічні властивості. Визначено оптимальні умови експресії розчинної фракції протеїну в клітинах продуцента: середовище ТВ, температура експресії — 37 °С, концентрація ІПТГ — 0,1 мМ, час культивування після індукції — 3,5 год.

Рекомбінантний поліпептид очищали двоступенево за допомогою технологій іммобілізованої металоафінної та афінної хроматографії з використанням сорбентів IDA-touorear1 та глутатіон-сефарози, відповідно. Питомий вихід високоочищеного препарату з клітинного супернатанта за оптимізованих умов становив 78,74% від загальної кількості рекомбінантного протеїну в клітині.

Результати досліджень імунохімічних властивостей розчинного протеїну GST-HSV2gG свідчать про перспективність його використання в складі імуносорбенту під час розроблення імуноензимних тест-систем для діагностики вірусу герпесу 2-го типу.

4. Munday P. E., Vuddamalay J., Slomka M. J., Brown D. W. G. Role of type specific herpes simplex virus serology in the diagnosis and management of genital herpes // Sex. Transm. Infect. — 1998. — V. 74. — P. 175–178.

5. Al-Sulaiman A. M., Valley P. J., Klapper P. E. Comparative Performance of a Novel Herpes Simplex Virus Type 2-Specific Enzyme-Linked immunosorbent Assay Using a Targeted Chain Oligopeptide, peptide 55 // Clin. Vac. Immunol. — 2009. — V. 16, N 6. — P. 931–934.
6. Whitley R. J., Roizman B. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? // J. Clin. Invest. — 2002. — V. 110, N 2. — P. 145–151.
7. Dolan A., Jamieson F. E., Cunningham C. et al. The Genome Sequence of Herpes Simplex Virus Type 2 // J. Virol. — 1998. — V. 72, N 3. — P. 2010–2021.
8. William L. H., Connie L., Ashley R. Use of a Glycoprotein G-Based Type-Specific Assay to Detect Antibodies to Herpes Simplex Virus Type 2 Among Persons Attending Sexually Transmitted Disease // Sex. Transm. Dis. — 2001. — V. 28, N 2. — P. 99–104.
9. Reddy S. M., Balakrishnan P., Uma S. et al. Performance of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits Using Recombinant Glycoprotein G2 Antigen for Detection of Herpes Simplex Virus Type 2 Specific Antibodies // Clin. Diagn. Lab. Immun. — 2005. — V. 12, N 2. — P. 359–360.
10. Ashley R. L., Wald A. Genital Herpes: Review of the Epidemic and Potential Use of Type-Specific Serology // Clin. Microbiol. Rev. — 1999. — V. 12, N 1. — P. 1–8.
11. Ikoma M., Liljevist J.-A. Groen J., Glazenburg K. L. The T.H. Use of a Fragment of Glycoprotein G-2 Produced in the baculovirus Expression System for Detecting Herpes Simplex Virus Type 2-specific Antibodies // J. Clin. Microbiol. — 2002. — V. 40, N 7. — P. 2526–2532.
12. Jamalidoost M., Soleimanjahi H., Fotouhi F., Meshkat Z. Amplification and Cloning of Herpes Simplex Virus Type 2 Glycoprotein G from an Iranian Isolate // Pakist. J. Biol. Sci. — 2007. — V. 10, N 6. — P. 955–958.
13. Маниатис Т., Фршч Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — V. 227. — P. 680–685.
15. Підгорський В. С., Іутинська Г. О., Пирог Т. П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу — К.: Наук. думка, 2010. — 328 с.
16. Broedel S. E., Parciak S. J., Jones W. R. The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins in *E. coli* // Techn. Bull. — 2001. — V. 2. — P. 1–8.
17. Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Воробей Н. В. и др. Суперсинтез альфа-2b интерферона человека в клетках *Escherichia coli* в растворимой форме с использованием системы экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7 // Біополімери і клітина. — 2003. — Т. 19, № 4. — С. 367–373.
18. Sorensen H. P., Mortensen K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* // Microb. Cell Fact. — 2005. — V. 1. — P. 62–76.
19. Zhang D., Wei P., Fan L., Lian J. High-level soluble expression of HIGF-1 fusion protein in recombinant *Escherichia coli* // Proc. Biochem. — 2010. — V. 45. — P. 1401–1405.
20. Lian J. Z., Ding S. H., Cai J. et al. Improving aquaporin Z expression in *Escherichia coli* by fusion partners and subsequent condition optimization // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — V. 82. — P. 463–470.
21. Peng L., Xu Z. N., Fang X. M., Cen P. L. High-level expression of soluble human Beta-Defensin-2 in *E. coli* // Proc. Biochem. — 2004. — V. 82. — P. 199–205.
22. Baharum S. N., Rahman RNZRA, Basri M. Chaperone-dependent gene expression of organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain S5 // Ibid. — 2010. — V. 45. — P. 346–354.
23. Hartinger D., Heintl S., Schwartz H. E. Enhancement of solubility in *Escherichia coli* and purification of an aminotransferase from *Sphingopyxis* sp. MTA 144 for Deamination of hydrolyzed Fumonisin B // Microb. Cell Fact. — 2010. — V. 9. — P. 62–76.
24. Rabhi-Essaffi I., Sadok A., Khalaf N., Fathallah D. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon — as a GST-fusion protein in *E. coli* // Prot. Eng. Design Select. — 2007. — V. 12. — P. 201–209.
25. Esposito D., Chatterjee D. K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags // Cur. Opin. Biotechnol. — 2006. — V. 17. — P. 353–358.
26. Gaberc-Porekar V., Menart V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography // J. Biochem. Biophys. Meth. — 2001. — V. 49. — P. 335–360.
27. Карбовский Л. Л., Савчук А. Н., Волков Г. Л. Подходы к получению рекомбинантных фармацевтических белков на примере фрагмента стрептокиназы // Биофарм. журн. — 2010. — Т. 2, № 2. — С. 9–14.

**СУПЕРСИНТЕЗ РАСТВОРИМОГО
ПРОТЕИНА — ПРОДУКТА ЭКСПРЕССИИ
ГЕНА, СОДЕРЖАЩЕГО ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ
УЧАСТКИ ГЛИКОПРОТЕИНА
G ВИРУСА ГЕРПЕСА 2-ГО ТИПА,
В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ
*Escherichia coli***

Л. Н. Коршун¹, Л. Н. Мойса¹, Г. В. Ковтонюк¹,
Л. А. Ганова^{1,2}, Е. К. Киселева¹, Н. Я. Спивак²

¹АОЗТ НПК «Диaproф-Мед», Киев

²Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: KL2004@ukr.net

Сегодня во всем мире значительно возросла распространенность инфекций, вызванных вирусами простого герпеса типов 1 и 2. Заболевания, вызываемые вирусом герпеса 2-го типа, протекают в более тяжелой форме, с более частыми рецидивами и осложнениями, чем те, которые обусловлены возбудителем 1-го типа. Поэтому при проведении клинико-лабораторных исследований большое значение имеет дифференциальная диагностика между этими двумя типами вируса. Цель работы заключалась в оптимизации условий бактериальной экспрессии рекомбинантного протеина, содержащего иммунодоминантные области гликопротеина G вируса простого герпеса 2-го типа, в клетках *Escherichia coli* и получение высокоочищенного препарата, пригодного для использования в составе иммуносорбента при разработке диагностических тест-систем.

Установлено, что рекомбинантный полипептид GST-HSV2gG накапливается в клетках бактерий как в растворимой форме, так и в виде телец включений. Показано влияние состава питательной среды, температуры экспрессии и концентрации ИПТГ на уровень накопления гетерологичного протеина и его иммунохимические свойства. Уменьшение концентрации ИПТГ до 0,1 мМ при температуре культивирования продуцента 37 °С с использованием среды ТВ (1,2% бactoтриптона, 2,4% дрожжевого экстракта, 55 мМ глицерола, 17 мМ КН₂РO₄, 72 мМ К₂НРO₄, рН 7,2) позволяет получать наиболее высокий показатель биосинтеза растворимого протеина.

Целевой продукт очищали с использованием технологий аффинной хроматографии. Удельный выход очищенного протеина с клеточного супернатанта при оптимизированных условиях составлял 78,74 % от общего количества рекомбинантного протеина в клетке.

Иммунохимические свойства протеина GST-HSV2gG оценивали с помощью иммуноэнзимной тест-системы. Результаты исследований свидетельствуют о перспективности его использования при разработке тест-систем для диагностики вируса герпеса 2-го типа.

Ключевые слова: рекомбинантные протеины, экспрессирующие векторы, вирус простого герпеса человека 2-го типа, иммуноэнзимный анализ, *Escherichia coli*.

**SUPERSYNTHESIS OF PRODUCT GENE
EXPRESSION SOLUBLE PROTEIN,
WHICH INCLUDES IMMUNODOMINANT
REGIONS OF GLYCOPROTEIN G
HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2
IN THE BACTERIAL *Escherichia coli* SYSTEM**

L. M. Korshun¹, L. M. Moysa¹, G. V. Kovtonjuk¹,
L. O. Ganova^{1,2}, O. K. Kiselyova¹, M. J. Spivak²

¹JSC «Diaprof-Med», Kyiv

²Institute of Microbiology and Virology
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: KL2004@ukr.net

The spread of infections caused by herpes simplex virus types 1 and 2 has increased significantly worldwide now. Diseases caused by herpes virus type 2 occurring in more heavy form, with frequent recurrences and complications compared with those caused by agent type 1. When clinical and laboratory tests were carried out, differential diagnosis between these two types of virus became more important. Purpose of the work was optimizing conditions of the bacterial expression of recombinant protein containing immunodominant regions of glycoprotein G of herpes simplex virus type 2 in the *Escherichia coli* cells and obtaining of the highly purified preparation suitable for use in the immunosorbent composition to the development of diagnostic test kits.

It was found that recombinant protein GST-HSV2gG accumulated both in a soluble form and as insoluble inclusion bodies in bacterial cells. Influence of media composition, expression temperature and IPTG concentration on the level accumulation of the heterologous protein and its immunochemical properties was shown. The maximum level of the soluble protein biosynthesis was reached when the bacteria had been cultivated with use the TB medium (1,2 % bacto-tryptone, 2,4 % yeast extract, 55 mM glycerol, 17 mM КН₂РO₄, 72 mM К₂НРO₄, рН 7,2) at 37 °С with decreasing concentration IPTG up to 0,1 mM.

The target protein was purified by affinity chromatography technologies. Under the optimized conditions the yield of the purified soluble protein was up to 78.74 % relative to total recombinant protein.

The immunochemical properties of GST-HSV2gG protein was estimated by ELISA. The results suggested that it might be applicable for the development of the diagnostic kits for the detection of herpes simplex virus type 2.

Key words: recombinant proteins, expression vectors, herpes simplex virus type 2, ELISA test, *Escherichia coli*.