

Получение рекомбинантного белка NS1 ортофлавириусов

Научный руководитель – Горященко Александр Сергеевич

Чигвинцева Анна Алексеевна

Студент (магистр)

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Москва, Россия

E-mail: annachigvintseva@mail.ru

Ортофлавириусы представляют серьезную угрозу для глобального здравоохранения из-за их способности вызывать тяжелые заболевания, отсутствия специфических лекарственных средств и высокой распространенности. На сегодняшний день эффективные препараты против ортофлавириусов на основе низкомолекулярных соединений отсутствуют.

Одной из потенциальных мишеней для *in vitro* скрининга ингибиторов репликативного цикла ортофлавириусов является неструктурный вирусный белок NS1. Для разработки методики скрининга низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с NS1, необходимо получение рекомбинантного белка.

Поскольку NS1 представляет собой гликопротеин, бактериальные системы экспрессии не подходят для его получения в нативной гликозилированной форме. Целью нашей работы стала разработка системы экспрессии рекомбинантного белка NS1 вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) штамма Абсеттаров и NS1 вируса Западного Нила (ВЗН) штамма NY99 в клетках млекопитающих, а также оптимизация методики их выделения и очистки.

На первом этапе работы была сконструирована плаزمиды на основе вектора pсDNA3.1, кодирующая NS1 ВКЭ штамма Абсеттаров с лидерным пептидом, обеспечивающим секрецию NS1 во внеклеточную среду, на N-конце, а также 6xHis-тагом на C-конце. Затем клетки линии НЕК293Т трансфецировали полученной плазмидой кальций-фосфатным и липосомальными методами. Наличие целевого белка в образцах питательной среды подтверждали методом Вестерн-блоттинга с использованием антител как к 6xHis-тагу, так и специфических антител к NS1 ВКЭ. Затем были подобраны такие параметры экспрессии белка, как состав питательной среды и время инкубации клеток после трансфекции.

Выделение и очистку белка NS1 из питательной среды проводили методом аффинной хроматографии на носителе Ni-NTA агароза. Были подобраны оптимальные условия и состав буферных растворов для элюции целевого белка. Анализ чистоты полученного белка проводили при помощи электрофореза в денатурирующих условиях. Для определения статуса гликозилирования NS1 образцы выделенного белка обработали пептид-N-гликозидазой F и анализировали изменение массы белка методами Вестерн-блоттинга и электрофореза в денатурирующих условиях. Экспрессию и очистку белка NS1 ВЗН проводили по разработанному протоколу с использованием любезно предоставленной нам плазмиды pсDNA3.1-sec-WNV_NS1-6x-His [1].

Таким образом, на данном этапе работы получена система экспрессии рекомбинантного белка NS1 ортофлавириусов (ВКЭ и ВЗН), оптимизированы условия его экспрессии и разработан протокол очистки целевого белка методом аффинной хроматографии.

Источники и литература

- 1) Mora-Cárdenas E. et al. Comparative specificity and sensitivity of NS1-based serological assays for the detection of flavivirus immune response // PLoS neglected tropical diseases. 2020. T. 14. №. 1. С. e0008039.