

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-47-52

УДК 616.91:616-07

Н.В. Волкова, А.В. Иванова, А.А. Исаева, О.А. Полежаева, А.В. Зайковская, Д.Н. Щербаков,
Е.И. Казачинская

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ МАРБУРГ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация

Цель работы – получение рекомбинантных вирусных антигенов основных иммунодоминантных белков: гликопротеина (GPΔMLD), нуклеопротеина (NP) и матричного белка (VP40) вируса Марбург, а также исследование их антигенных и иммуногенных свойств. **Материалы и методы.** Для создания рекомбинантных белков GPΔMLD, NP и VP40 вируса Марбург использовали синтезированные нуклеотидные последовательности, кодирующие эти белки, клонированные в составе экспрессионного вектора pET21a. Иммуногенные и антигенные свойства полученных рекомбинантных белков проверяли с использованием ряда биомodelей (мыши, куры и морские свинки). **Результаты и обсуждение.** Получены рекомбинантные плазмиды, содержащие гены, кодирующие белки GPΔMLD, NP, VP40 вируса Марбург, а также штаммы-продуценты *Escherichia coli*, с выходом очищенных препаратов рекомбинантных белков GPΔMLD, NP, VP40 с одного литра культуральной жидкости – 5, 10 и 10 мкг соответственно. Рекомбинантные белки GP, NP и VP40 MARV при иммунизации мышей вызывают синтез антител с высоким титром (рекомбинантные белки NP и VP40 – более 409600, а рекомбинантный белок GPΔMLD – 12800). Мышинные антитела, специфичные к рекомбинантным белкам, взаимодействуют в иммуноферментном анализе с антигеном инактивированного MARV. Антитела кур, иммунизированных вирусоподобными частицами, содержащими на поверхности поверхностный гликопротеин вируса Марбург, и антитела морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной, содержащей ген GPΔMLD MARV, узнают рекомбинантный белок GPΔMLD и вирусный белок в составе инактивированного MARV. Полученные рекомбинантные белки обладают иммуногенностью/антигенностью и могут использоваться для разработки иммуноферментных тест-систем.

Ключевые слова: вирус Марбург (Marburgvirus, MARV), гликопротеин (GP), нуклеопротеин (NP), матричный белок (VP40), рекомбинантные белки, серологическая диагностика.

Корреспондирующий автор: Волкова Наталья Вячеславовна, e-mail: vector@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Волкова Н.В., Иванова А.В., Исаева А.А., Полежаева О.А., Зайковская А.В., Щербаков Д.Н., Казачинская Е.И. Получение рекомбинантных антигенов для проведения серологической диагностики лихорадки Марбург. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:47–52. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-47-52

Поступила 29.09.20. Отправлена на доработку 09.11.20. Принята к публ. 22.12.20.

N.V. Volkova, A.V. Ivanova, A.A. Isaeva, O.A. Polezhaeva, A.V. Zaykovskaya, D.N. Shcherbakov,
E.I. Kazachinskaya

Obtaining Recombinant Antigens for the Development of Serological Diagnosis of Marburg Fever

State Scientific Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Aim. Production of recombinant viral antigens of the main immunodominant proteins: glycoprotein (GPΔMLD), nucleoprotein (NP) and matrix protein (VP40) of the Marburg virus, as well as the study of their antigenic and immunogenic properties. **Materials and methods.** To create recombinant proteins GPΔMLD, NP and VP40 of the Marburg virus, synthesized nucleotide sequences encoding these proteins cloned into the pET21a expression vector were used. The immunogenic and antigenic properties of the obtained recombinant proteins were tested using a number of biomodels (mice, chickens, and guinea pigs). **Results and discussion.** Recombinant plasmids containing genes encoding proteins GPΔMLD, NP, VP40 of the Marburg virus, as well as *Escherichia coli* producing strains, with the yield of purified preparations of recombinant proteins GPΔMLD, NP, VP40 from one liter of culture fluid – 5, 10, and 10 μg were obtained, respectively. When mice are immunized, recombinant proteins GP, NP, and VP40 MARV induce the synthesis of high titer antibodies (recombinant proteins NP and VP40 – more than 409600, and recombinant protein GPΔMLD – 12800). Mouse antibodies specific to recombinant proteins interact in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the antigen of inactivated MARV. Antibodies of chickens immunized with virus-like particles containing the surface glycoprotein of the Marburg virus and antibodies of guinea pigs immunized with an experimental DNA vaccine containing the GPΔMLD MARV gene recognize the recombinant GPΔMLD protein and the viral protein in the inactivated MARV. The resulting recombinant proteins are immunogenic/antigenic and can be used for the development of enzyme-linked immunosorbent assay systems.

Key words: Marburg virus (MARV), glycoprotein (GP), nucleoprotein (NP), matrix protein (VP40), recombinant proteins, serological diagnostics.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Natalya V. Volkova, e-mail: vector@vector.nsc.ru.

Citation: Volkova N.V., Ivanova A.V., Isaeva A.A., Polezhaeva O.A., Zaykovskaya A.V., Shcherbakov D.N., Kazachinskaya E.I. Obtaining Recombinant Antigens for the Development of Serological Diagnosis of Marburg Fever. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 4:47–52. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-47-52

Received 29.09.20. Revised 09.11.20. Accepted 22.12.20.

Zaykovskaya A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>
Shcherbakov D.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>
Kazachinskaya E.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1856-6147>

Материалы и методы

С помощью набора «БиоМастер HS-Таг ПЦР-Color (2×)» («БиолабМикс», Россия) проведена амплификация районов, кодирующих целевые белки. Очистку продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1%-м агарозном геле с последующим выделением при помощи набора Cleanup Standard («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для клонирования генов GPΔMLD, VP40 и NP MARV в составе экспрессионного вектора pET-21a использованы эндонуклеазы рестрикции XhoI и NheI (НПО «Сибэнзим», Россия). Реакционные смеси готовили в соответствии с активностью ферментов (2–5 ед. акт. на 1 мкг ДНК) и концентрацией ДНК. Условия реакции: температура, состав буферного раствора и длительность проведения ферментативного гидролиза ДНК подобраны в соответствии с инструкциями производителя. Продукты гидролиза после очистки лигировали с помощью лигазы бактериофага T4. Реакцию лигирования проводили 30 минут при комнатной температуре, используя смесь из 2 мкг ампликонов с ДНК-матрицы, 1 мкг векторной плазмиды pET-21a и 20 е.а. ДНК-лигазы фага T4 (НПО «Сибэнзим», Россия) в прилагаемом к коммерческому набору реакционном буферном растворе. Полученными продуктами лигирования трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма BL21/DE3(+) с помощью хлористого кальция. Наличие встройки целевых генов подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием по

Цель работы – получение рекомбинантных вирусных антигенов основных иммунодоминантных белков гликопротеина (GP), нуклеопротеина (NP) и матричного белка (VP40) MARV, исследование их антигенных и иммуногенных свойств.

Таблица 1 / Table 1

Праймеры, использованные для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки GP, VP40 и NP MARV

Primers used to amplify nucleotide sequences encoding proteins GP, VP40 and NP MARV

Ген Gene	Название олигонуклеотида Oligonucleotide	Нуклеотидная последовательность Nucleotide sequence
GP	GPM-pET-F	5'-aaaaacatatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtccctatttagagatagctagtaacaatca-3'
	GPM-pET-R	5'-aaaaagtcgacttagtggtggtggtggtggtcgcatgtccaccattacca-3'
VP40	VP40M-pET-F	5'-aaaaacatatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtgccagttccagcaattacaa-3'
	VP40M-pET-R	5'-aaaaaactcgagttagtggtggtggtggtggaacggcactgagcgttg-3'
NP	NPM-pET-F	5'-aaaaacatatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtgattacatagctgttagagttgggt-3'
	NPM-pET-R	5'-aaaaaactcgagttagtggtggtggtggtggtgcaagttcatagcaacatgtctcct-3'

методу Сэнгера.

Культуру трансформированных клеток, содержащих рекомбинантную плазмиду с встроенным геном, культивировали в 100 мл жидкой питательной среды LB (Lysogeny broth) с добавлением натриевой соли ампициллина в рабочей концентрации 20 мкг/мл. Синтез целевых рекомбинантных белков индуцировали 0,5 mM IPTG (изопропил- β -D-тиогалактозидом). Отбор клонов *E. coli* – продуцентов проводили по наличию синтезируемых целевых белков по результатам электрофореза лизатов клеток в 10%-м полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAAG). В качестве отрицательного контроля использовали полученный аналогичным способом лизат клеток *E. coli* штамма BL21/DE3(+), содержащий плазмиду pET-21a. Очистку рекомбинантных белков, содержащих полигистидиновый блок, проводили аффинной хроматографией на Ni-хеллатной смоле, согласно протоколу фирмы-производителя Qiagen (набор Ni-NTA Fast Start). Полученные клеточные лизаты штамма *E. coli* – продуцента и очищенный рекомбинантный белок анализировали методом белкового электрофореза по методу Лэммли в SDS-PAAG. В качестве контроля использовали полученный аналогичным способом лизат клеток *E. coli* штамма BL21/DE3(+), содержащий векторную плазмиду pET-21a. Концентрацию рекомбинантных белков измеряли при помощи набора «Bio-Rad Protein Assay Kit» в соответствии с рекомендациями производителя на спектрофотометре при длине волны 495 нм и оценивали путем калибровки по овальбумину в 4 М растворе мочевины (pH 8,0).

Препараты рекомбинантных белков NP, VP40 и GPΔMLD MARV после электрофореза переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Millipore, США) на аппарате Transpor (LKB, Швеция) в течение 1,5 часов при напряжении 80 В в 0,025 М трис-HCl буферном растворе, содержащем 0,192 М глицина (pH 8,3) и 20 % этанола. Места неспецифического связывания насыщали 1%-м раствором казеина при 37 °C в течение 2 часов в ТСБ-Т буферном растворе (состав: Трис-солевой буферный раствор с твином, содержащий 0,15 М NaCl; 0,02 М трис-HCl pH 7,4; 0,05 % Твин-20). Затем мембрану, содержащую рекомбинантный и вирусные белки, инкубировали со специфическими антителами 4 часа при 20–22 °C в буферном растворе ТСБ-Т, содержащем 0,5 % казеина. После отмывки в ТСБ-Т мембраны обрабатывали антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена (Sigma), – антимышиные и античеловеческие или белок G, меченный пероксидазой для козьих антител, в рабочих разведениях в 0,5%-м растворе казеина в ТСБ-Т в течение 2 часов при 37 °C. Затем мембраны промывали ТСБ-Т буферным раствором и проявляли в растворе хромагена (1 мг/мл 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорида в 50 mM трис-HCl буферном растворе (pH 7,4), содержащем 0,145 М NaCl, 20 % этанола и 0,03 % перекиси водо-

рода). Реакцию останавливали отмыванием мембран в дистиллированной воде. Специфическое взаимодействие антител с белками проявлялось в виде ярких коричневых полос (рис. 1, B).

Для исследования иммуногенности полученных белков проведена иммунизация мышей линии Balb/c. Внутримышечную иммунизацию мышей массой 15–18 г проводили трехкратно с интервалом 10 дней. Доза рекомбинантных белков VP40, NP, GPΔMLD и инактивированного MARV составила 100 мкг на мышь. Забор крови для анализа гуморального иммунного ответа проводили на 35-е сутки.

Для исследования антигенности полученных белков проведены иммунизации морских свинок экспериментальной ДНК-вакциной против MARV по схеме, описанной ранее [7]. А также иммунизировали кур препаратом псевдовиральных частиц VSV-GPΔMLDpppp, очищенным при помощи центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Концентрация препарата составила $1,4 \cdot 10^7$ RLU (relative light units) (показатель количества вирионов в 1 мл – 10^9). Иммунизацию проводили 4 раза с интервалом в 3 недели [8].

Сыворотку крови морских свинок и мышей получали инкубированием препарата крови при 37 °C в течение 1 часа, далее при 4 °C 20 часов, с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 5000 g. Препараты сывороток крови хранили при –20 °C.

Выделение из яиц иммунизированных птиц желточных антител IgY проведено с помощью метода изоэлектрического осаждения [9].

Для проведения непрямого твердофазного иммуноферментного анализа использовали полистироловые планшеты (Nunk). Сенсибилизацию ячеек рекомбинантными белками вируса Марбург (в концентрации 6 мкг/мл) выполняли в объеме 100 мкл 0,05 М натрий-фосфатного буферного раствора (pH 8,0) с 4 М мочевины. Сорбцию проводили при 22 °C в течение 18 часов. Дополнительную блокировку сорбционной активности осуществляли 1%-м раствором казеина в ТСБ-Т (трис-солевой буферный раствор с твином, содержащий 0,15 М NaCl; 0,02 М трис-HCl pH 7,4; 0,05 % Твин-20) в течение 30 минут при 37 °C. Затем раствор казеина удаляли и инкубировали антиген со специфическими антителами (мышинными, человеческими или козьими) в течение 1 часа при 37 °C или 18 часов при 4 °C в 0,5%-м растворе казеина в ТСБ-Т. После трехкратной отмывки ТСБ-Т в лунки добавляли по 100 мкл пероксидазного конъюгата антивидовых антител (Sigma) – антимышинных, античеловеческих или белок G, меченный пероксидазой для козьих антител, в рабочих разведениях в 0,5%-м растворе казеина в ТСБ-Т. Инкубировали 1 час при 37 °C. Отмывку лунок осуществляли трехкратно с ТСБ-Т. Проявление проводили в течение 30 минут при 37 °C с использованием жидкого субстрата на основе ТМБ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). Блокировали реакцию добавле-

нием 100 мкл 1 N HCl на каждую лунку и измеряли ОП субстратно-индикаторной смеси на спектрофотометре Uniscan при длине волны 450 нм.

Результаты и обсуждение

В геноме филовирусов выявлено 7 открытых рамок трансляции, однако не все белки вируса обладают диагностической значимостью. Основными антигенными детерминантами являются белки NP, VP40 и GP [10]. Получение индивидуальных белков филовирусов на основе вирусного материала ограничено условиями биобезопасности, а также значительными материальными затратами. Использование технологии рекомбинантной ДНК позволяет решить многие из этих проблем, однако использование в системе *E. coli* природной нуклеотидной последовательности вирусных генов для получения экспрессирующих плазмид зачастую приводит к низкому выходу целевых рекомбинантных белков. Поэтому для повышения выхода белка используют оптимизацию кодонного состава и структуру экспрессируемых генов. Получение рекомбинантных белков VP40, NP и GPΔMLD MARV в системе *E. coli* для диагностических микрочипов описано в работе Т. Kamata *et al.* [11], однако авторы не описали процесс получения рекомбинантных белков, что не позволяет воспроизвести методику и оценить ее эффективность.

В нашей работе для повышения выхода рекомбинантных белков использованы последовательности генов, кодирующих белки MARV, с оптимизированным кодонным составом. Оптимизацию кодонного состава генов проводили с помощью онлайн-сервиса GeneOptimizer [12]. Клонирование целевых генов про-

водили в составе экспрессионного вектора pET21a. Встройку проводили таким образом, чтобы целевой белок был в единой рамке считывания с лидерным пептидом гена 10 бактериофага T7 на N-конце и полигистидиновым трактом (6×His) на С-конце.

При создании рекомбинантных аналогов NP и VP40 MARV использованы полные последовательности. Из последовательности GP MARV удалена нуклеотидная последовательность, соответствующая муциноподобному домену (с 290 лейцин по 422 аспарагин), наличие которой значительно снижало выход целевого белка (неопубликованные данные). Из-за удаления муциноподобного домена, трансмембранного региона, а также отсутствия гликозилирования в прокариотической системе молекулярная масса полученного рекомбинантного белка GP отличается от нативной (рис. 1, А).

Антигенные свойства полученных рекомбинантных белков подтверждали методом иммуноблоттинга (рис. 1, В). После обработки мембраны антивидовыми антителами, меченными пероксидазой хрена (Sigma) – античеловеческими (на рис. 1, В – дорожки 1–3) и антимышиными (на рис. 1, В – дорожки 5–7), специфическое взаимодействие рекомбинантных белков с антителами проявлялось в виде ярко окрашенных бэндов. Молекулярная масса выявленных бэндов совпадает с теоретической молекулярной массой.

Для оценки иммуногенности рекомбинантных белков проводили иммунизацию мышей Balb/c. Как видно из рис. 2, после двух иммунизаций титры антител сывороток крови мышей, иммунизированных рекомбинантными белками NP MARV и VP40 MARV, выявленных при помощи инактивированного

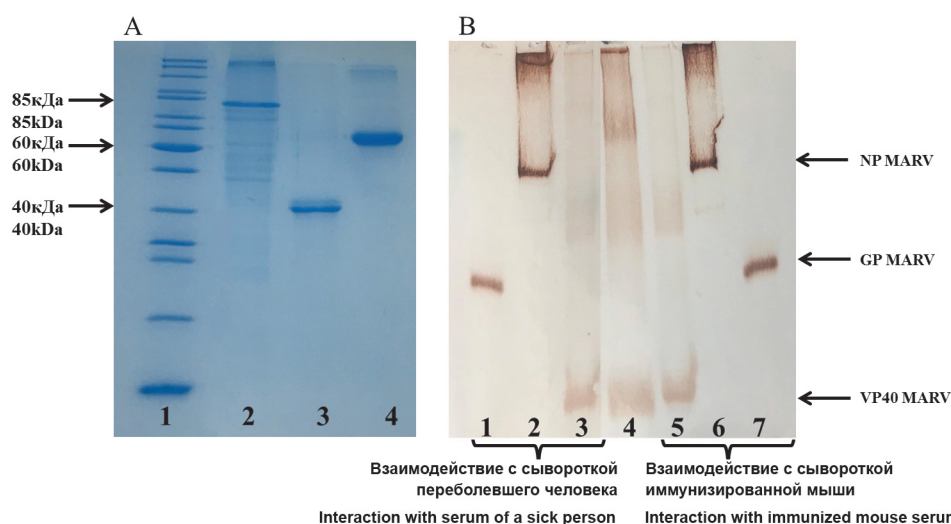


Рис. 1. А. Электрофореграмма очищенных препаратов рекомбинантных белков GPΔMLD, VP40 и NP MARV в 6 %-м ПААГ-SDS. В. Иммуноблоттинг: проверка антигенных свойств полученных рекомбинантных белков:

А: 1 – белковый маркер молекулярной массы (кДа); 2–4 – очищенные рекомбинантные белки NP, VP40 и GPΔMLD по 10 мкл/дорожка соответственно; В: 1 и 7 – рекомбинантный аналог GPΔMLD MARV; 2 и 6 – рекомбинантный аналог NP MARV; 3 и 5 – рекомбинантный аналог матричного белка VP40 MARV; 4 – инактивированный препарат MARV

Fig. 1. А. Electropherogram of purified preparations of recombinant proteins GPΔMLD, VP40 and NP MARV in 6 % SDS-PAGE. В. Immunoblotting: testing the antigenic properties of the resulting recombinant proteins:

А: 1 – protein molecular weight marker (kDa); 2–4 – purified recombinant proteins NP, VP40 and GPΔMLD at 10 μl/lane respectively; В: 1 and 7 – recombinant analogue of GPΔMLD MARV; 2 and 6 – recombinant analogue of NP MARV; 3 and 5 – recombinant analogue of the VP40 MARV matrix protein; 4 – inactivated MARV preparation

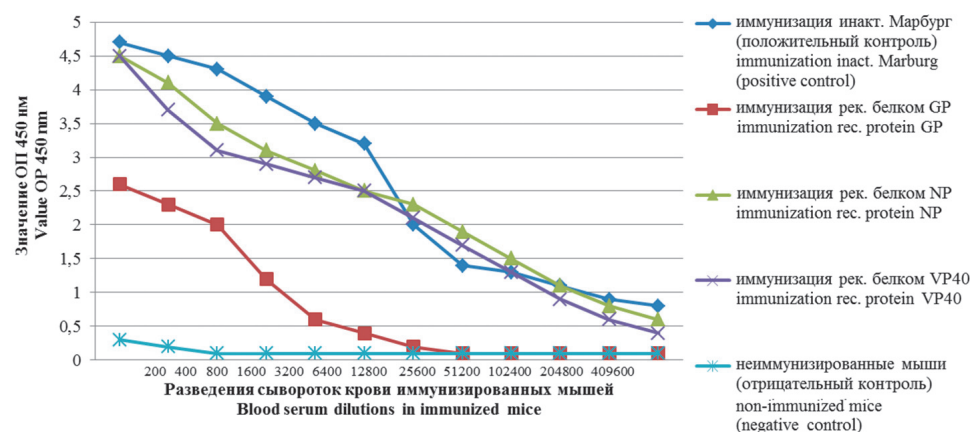


Рис. 2. Титрование сывороток крови мышей, иммунизированных рекомбинантными белками MARV. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки крови неиммунизированных мышей. В качестве положительного контроля использовали сыворотки крови мышей, иммунизированных инактивированным MARV

Fig. 2. Titration of blood sera from mice immunized with MARV recombinant proteins. Serum of non-immunized mice was used as a negative control. The blood serum of mice immunized with inactivated MARV was used as a positive control

MARV, достигали значений более 409600. В случае рекомбинантного GPΔMLD MARV значения были значительно ниже и составили 12800. Основываясь на этих результатах, можно констатировать, что рекомбинантные белки, полученные в системе *E. coli*, обладают иммуногенными свойствами.

Оценку реактивности полученных белков проводили с использованием сыворотки крови переболевшего человека, сыворотки крови мышей, иммуни-

зированных инактивированным препаратом MARV, домашних кур, иммунизированных вирусоподобными частицами (ВПЧ), экспонирующими на своей поверхности белок GP MARV [8], и морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной, кодирующей ген GP MARV без муциноподобного домена [7]. Как видно из данных, представленных в табл. 2, мышинные антитела, специфичные к рекомбинантным белкам, взаимодействуют в ИФА с

Таблица 2 / Table 2

Исследование антигенности рекомбинантных белков GP, NP и VP40 MARV методом твердофазного ИФА
Investigation of the antigenicity of the recombinant proteins GP, NP and VP40 MARV by solid-phase ELISA

Источник антител Source of antibodies	Обратные титры антител Reverse antibody titers					
	антиген инакт. MARV antigen inact. MARV	антиген рек. GP antigen recomb. GP	антиген рек. NP antigen recomb. NP	антиген рек. VP40 antigen recomb. VP40	антиген ВПЧ (полнораз. GP-MARV) antigen VLP (full size GP-MARV)	антиген ВПЧ (GPΔMLD-MARV) antigen VLP (GPΔMLD-MARV)
Мышь** Mouse**	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Человек* Human*	25600	12800	12800	25600	32000	32000
Человек** Human**	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Мышь-инакт. Marv Mouse-inact. Marv	>1018200	25600	25600	51200	800	800
Курица* Chicken*	51200	32000	-	-	>1018200	>1018200
Курица** Chicken**	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Морская свинка* Guinea pig*	3200	12800	-	-	12800	12800
Морская свинка** Guinea pig**	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Примечания: **антиген инакт. MARV** – сконцентрированный и очищенный из суспензии инфицированной культуры клеток *Vero*, инактивированный кипячением в течение 2 мин в растворе, содержащем 5 % β-меркаптоэтанол и 1 % додецилсульфата натрия (SDS) с дальнейшим прогреванием при 60 °C в течение 1 часа; **рек.** – рекомбинантный белок; **ВПЧ** – вирусоподобные частицы на основе вируса везикулярного стоматита, экспонирующие белок GP MARV [7]; **GPΔMLD** – белок GP без муциноподобного домена; антигены (инакт. MARV и рек. белки) использованы в концентрации 1 мкг/мл (100 нг/лунка), ВПЧ (с в разведении 1/100 из очищенного препарата с физическим титром (общее количество вирусоподобных частиц, определяемых при электронной микроскопии) 10⁶; **мышь**** – сыворотка крови неиммунных мышей (отриц. контроль); **человек*** – переболевший в результате лабораторной аварии; **человек**** – неиммунный к MARV (отриц. контроль); **курица*** – иммунизирована ВПЧ (GPΔMLD-MARV); **курица**** – неиммунная (отриц. контроль); **морская свинка*** – смесь сывороток крови морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной (GPΔMLD-MARV); «-» – нет специфического взаимодействия.

Notes: **antigen inact. MARV** – concentrated and purified from a suspension of an infected Vero cell culture, inactivated by boiling for 2 minutes in a solution containing 5 % β-mercaptoethanol and 1 % sodium dodecyl sulfate (SDS) with further heating at 60 °C for 1 hour; **recombinant proteins** – recombinant protein; **HPV** – virus-like particles based on the vesicular stomatitis virus, exhibiting the GP MARV protein [7]; **GPΔMLD-GP** protein without mucin-like domain; antigens (inact. MARV and rec. proteins) were used at a concentration of 1 μg/ml (100 ng/well), HPV (with a dilution of 1/100 from a purified preparation with a physical titer (total number of virus-like particles determined by electron microscopy) 10⁶; **mouse**** – blood serum of non-immune mice (negative control); **human*** – recovered from a laboratory accident; **human**** – non-immune to MARV (negative control); **chicken*** – immunized with HPV (GPΔMLD-MARV); **chicken**** – non-immune (negative control); **guinea pig*** – a mixture of blood sera from guinea pigs immunized with an experimental DNA vaccine (GPΔMLD-MARV); “-” – no specific interaction.

антигеном инактивированного MARV. Антитела кур и морских свинок, иммунизированных ВПЧ, содержащим на своей поверхности гликопротеин MARV, и экспериментальной ДНК-вакциной, кодирующей ген GPΔMLD MARV, соответственно, взаимодействуют с рекомбинантным белком GPΔMLD и полно-размерным GP в составе инактивированного MARV. Полученные результаты могут свидетельствовать о сохранении антигенных свойств у вирусных белков, полученных при помощи *E. coli*.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что рекомбинантные белки MARV обладают антигенностью/иммуногенностью и могут быть использованы:

- для тестирования иммунного ответа животных и добровольцев на введение экспериментальных вакцин, содержащих белки NP, VP40 и GP MARV;

- для иммунизации мышей при получении препаратов моноклональных антител, используемых при разработке иммуноферментных тест-систем в формате «сэндвич» для выявления вирусного антигена;

- как положительный контроль в иммуноферментных тест-системах по выявлению аналогичных вирусных белков-антигенов MARV.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Авторы выражают благодарность доктору биологических наук А.А. Чепурнову за предоставление материалов.

Список литературы

1. Телесманич Н.Р., Микашинович З.И., Ломаковский Н.С., Лосева Т.Д., Чайка С.О. Биохимия вируса Эбола и молекулярные аспекты биологической защиты. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2015; 3:28–34.
2. Qiu X., Wong G., Audet J., Cutts T., Niu Y., Booth S., Kobinger G.P. Establishment and characterization of a lethal mouse model for the Angola strain of Marburg virus. *J. Virol.* 2014; 88(21):12703–14. DOI: 10.1128/JVI.01643-14.
3. Vetter P., Fischer W.A. 2nd, Schibler M., Jacobs M., Bausch D.G., Kaiser L. Ebola Virus shedding and transmission: review of current evidence. *J. Infect. Dis.* 2016; 214(suppl 3):S177–S184. DOI: 10.1093/infdis/jiw254.
4. Paweska J.T., Jansen van Vuren P., Kemp A., Storm N., Grobbelaar A.A., Wiley M.R., Palacios G., Markotter W. Marburg virus infection in Egyptian rousette bats, South Africa, 2013–2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(6):1134–7. DOI: 10.3201/eid2406.172165.
5. Brangel P., Sobarzo A., Parolo C., Miller B.S., Howes P.D., Gelkop S., Lutwama J.J., Dye J.M., McKendry R.A., Lobel L., Stevens M.M. A serological point-of-care test for the detection of IgG antibodies against Ebola virus in human survivors. *ACS Nano.* 2018; 12(1):63–73. DOI: 10.1021/acsnano.7b07021.
6. Программное обеспечение Snapgene. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.snapgene.com> (дата обращения 17.05.2020).
7. Волкова Н.В., Пьянков О.В., Иванова А.В., Исаева А.А., Зыбкина А.В., Казачинская Е.И., Щербakov Д.Н. Прототип ДНК-вакцины против вируса Марбурга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 170(10):487–91. DOI: 10.47056/0365-9615-2020-170-10-487-491.
8. Полежаева О.А., Щербakov Д.Н. Разработка панели псевдовиральных частиц, экспонирующих гликопротеин вируса Марбурга. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2017; 8–2:27–30. DOI: 10.23670/IRJ.2017.62.018.
9. Hodek P., Trefil P., Simunek J., Hudecek J., Stiborova M. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013; 8:113–124.
10. Sobarzo A., Perelman E., Groseth A., Dolnik O., Becker S., Lutwama J.J., Dye J.M., Yavelsky V., Lobel L., Marks R.S. Profiling the native specific human humoral immune response to Sudan Ebola virus strain Gulu by chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(11):1844–52. DOI: 10.1128/CVI.00363-12.
11. Kamata T., Natesan M., Warfield K., Aman M.J., Ulrich R.G. Determination of specific antibody responses to the six species of Ebola and Marburg viruses by multiplexed protein microarrays. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(12):1605–12. DOI: 10.1128/CVI.00484-14.
12. Thermo Fisher Scientific. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html> (дата обращения 22.06.2020).

References

1. Telesmanich N.R., Mikashinovich Z.I., Lomakovskiy N.S., Loseva T.D., Chaika S.O. [Biochemistry of the Ebola virus and molecular aspects of biological defense]. *Zhurnal Fundamental'noj Meditsiny i Biologii [Journal of Fundamental Medicine and Biology]*. 2015; 3:28–34.
2. Qiu X., Wong G., Audet J., Cutts T., Niu Y., Booth S., Kobinger G.P. Establishment and characterization of a lethal mouse model for the Angola strain of Marburg virus. *J. Virol.* 2014; 88(21):12703–14. DOI: 10.1128/JVI.01643-14.
3. Vetter P., Fischer W.A. 2nd, Schibler M., Jacobs M., Bausch D.G., Kaiser L. Ebola Virus shedding and transmission: review of current evidence. *J. Infect. Dis.* 2016; 214(suppl 3):S177–S184. DOI: 10.1093/infdis/jiw254.
4. Paweska J.T., Jansen van Vuren P., Kemp A., Storm N., Grobbelaar A.A., Wiley M.R., Palacios G., Markotter W. Marburg virus infection in Egyptian rousette bats, South Africa, 2013–2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(6):1134–7. DOI: 10.3201/eid2406.172165.
5. Brangel P., Sobarzo A., Parolo C., Miller B.S., Howes P.D., Gelkop S., Lutwama J.J., Dye J.M., McKendry R.A., Lobel L., Stevens M.M. A serological point-of-care test for the detection of IgG antibodies against Ebola virus in human survivors. *ACS Nano.* 2018; 12(1):63–73. DOI: 10.1021/acsnano.7b07021.
6. Snapgene software. (Cited 17 May 2020). [Internet]. Available from: <https://www.snapgene.com/>.
7. Volkova N.V., Pyankov O.V., Ivanova A.V., Isaeva A.A., Zybikina A.V., Kazachinskaya E.I., Shcherbakov D.N. [A prototype of a DNA vaccine against Marburg virus]. *Bulleten' Eksperimental'noj Biologii i Meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2020; 170(10):487–91. DOI: 10.47056/0365-9615-2020-170-10-487-491.
8. Polezhaeva O.A., Shcherbakov D.N. [Development of a panel of pseudovirus particles exhibiting the glycoprotein of the Marburg virus]. *Mezhdunarodny Nauchno-Issledovatel'sky Zhurnal [International Research Journal]*. 2017; 8–2:27–30. DOI: 10.23670/IRJ.2017.62.018.
9. Hodek P., Trefil P., Simunek J., Hudecek J., Stiborova M. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013; 8:113–124.
10. Sobarzo A., Perelman E., Groseth A., Dolnik O., Becker S., Lutwama J.J., Dye J.M., Yavelsky V., Lobel L., Marks R.S. Profiling the native specific human humoral immune response to Sudan Ebola virus strain Gulu by chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(11):1844–52. DOI: 10.1128/CVI.00363-12.
11. Kamata T., Natesan M., Warfield K., Aman M.J., Ulrich R.G. Determination of specific antibody responses to the six species of Ebola and Marburg viruses by multiplexed protein microarrays. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(12):1605–12. DOI: 10.1128/CVI.00484-14.
12. Thermo Fisher Scientific. (Cited 22 June 2020). [Internet]. Available from: <https://www.thermofisher.com/ru/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html>.

Authors:

Volkova N.V., Ivanova A.V., Isaeva A.A., Polezhaeva O.A., Zaykovskaya A.V., Shcherbakov D.N., Kazachinskaya E.I. State Scientific Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Об авторах:

Волкова Н.В., Иванова А.В., Исаева А.А., Полежаева О.А., Зайковская А.В., Щербakov Д.Н., Казачинская Е.И. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.