

DOI: 10.21055/0370-1069-2025-1-141-148

УДК 578.833.29

А.Е. Тишин, С.А. Пьянков, Е.Ю. Прудникова, И.Р. Иматдинов

Получение рекомбинантного нуклеопротеина вируса Пуумала для проведения серологической диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация*

Вирус Пуумала (*Orthohantavirus puumalaense*) является одним из возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), широко распространенной на территории Российской Федерации, где ежегодно регистрируется более 6 тыс. случаев инфицирования ГЛПС, а за последние 10 лет (2013–2023 гг.) – более 77 тыс. случаев заболевания. Вирус Пуумала вызывает до 98 % случаев ГЛПС. Разработка быстрых и высокоточных методов диагностики, в том числе серологических тест-систем, имеет важное значение в клинических и лабораторных исследованиях, направленных на контроль вирусных инфекций. **Цель работы** – получение рекомбинантного вирусного иммунодоминантного белка нуклеопротеина (N) вируса Пуумала и исследование антигенных свойств. **Материалы и методы.** Экспрессионные конструкции получены стандартными молекулярно-биологическими методами. Очистку рекомбинантного нуклеопротеина вируса Пуумала проводили в двух раундах металл-хелатной аффинной хроматографии. Антигенные свойства очищенного рекомбинантного белка подтверждали вестерн-блоттингом и иммуноферментным анализом с использованием моноклональных антител и сывороток крови реконвалесцентов. **Результаты и обсуждение.** В рамках данной работы получены прокариотические продуценты для наработки и хроматографической очистки рекомбинантного нуклеопротеина N вируса Пуумала. С использованием методов вестерн-блоттинга и иммуноферментного анализа подтверждены специфические антигенные свойства рекомбинантного хроматографически очищенного белка N вируса Пуумала. Проведение двух последовательных раундов металл-хелатной аффинной хроматографии позволяет получить высокоочищенный препарат рекомбинантного вирусного белка. Результаты демонстрируют антигенную специфичность полученных рекомбинантных хроматографически очищенных белков вируса Пуумала. Препараты могут быть использованы для разработки тест-систем для серологической диагностики, в том числе для дифференциации вакцинированных лиц от переболевших.

Ключевые слова: вирус Пуумала, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, нуклеопротеин, антиген.

Корреспондирующий автор: Тишин Антон Евгеньевич, e-mail: tishin_ae@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Тишин А.Е., Пьянков С.А., Прудникова Е.Ю., Иматдинов И.Р. Получение рекомбинантного нуклеопротеина вируса Пуумала для проведения серологической диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2025; 1:141–148. DOI: 10.21055/0370-1069-2025-1-141-148

Поступила 11.11.2024. Отправлена на доработку 25.11.2024. Принята к публикации 26.11.2024.

A.E. Tishin, S.A. P'yankov, E.Yu. Prudnikova, I.R. Imatdinov

Obtaining a Recombinant Nucleoprotein of the Puumala Virus for Serological Diagnostics of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome*State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation*

Abstract. Puumala virus (*Orthohantavirus puumalaense*) is one of the causative agents of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), which is widespread in the Russian Federation (RF): more than 6 thousand cases of HFRS infection are registered annually, over the past decade (2013–2023) – more than 77 thousand cases of the disease were reported. Puumala virus causes up to 98 % of HFRS cases. The development of rapid and highly accurate diagnostic methods, including serological test systems, is of great importance in clinical and laboratory studies aimed at controlling viral infections. **The aim** of the work was to obtain a recombinant viral immunodominant protein, the nucleoprotein (N), of the Puumala virus, and to study its antigenic properties. **Materials and methods.** Expression constructs were produced using standard molecular-biological methods. The recombinant nucleoprotein of the Puumala virus was purified in two rounds of metal-chelate affinity chromatography. The antigenic properties of the purified recombinant protein were confirmed by Western blotting and enzyme immunoassay using monoclonal antibodies and convalescent blood sera. **Results and discussion.** Within the frames of this work, prokaryotic producers have been generated for the production and chromatographic purification of the recombinant nucleoprotein N of the Puumala virus. Using Western blotting and enzyme immunoassay, specific antigenic properties of the recombinant chromatographically purified Puumala virus N protein have been confirmed. Two consecutive rounds of metal-chelate affinity chromatography allowed us to obtain a highly purified recombinant viral protein preparation. The results demonstrate the antigenic specificity of the recombinant chromatographically purified Puumala virus proteins. The preparations can be used to develop serological test systems, including for differentiating vaccinated people from those who have recovered.

Key words: Puumala virus, hemorrhagic fever with renal syndrome, nucleoprotein, antigen.

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

Funding: The study was carried out within the framework of the state assignment of the Federal Budgetary Institution of Science "State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of the Rospotrebnadzor" (SA-26/21).

Corresponding author: Anton E. Tishin, e-mail: tishin_ae@vector.nsc.ru.

Citation: Tishin A.E., P'yankov S.A., Prudnikova E.Yu., Imatdinov I.R. Obtaining a Recombinant Nucleoprotein of the Puumala Virus for Serological Diagnostics of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2025; 1:141–148. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2025-1-141-148

Received 11.11.2024. Revised 25.11.2024. Accepted 26.11.2024.

Tishin A.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3998-3345>
P'yankov S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6593-6614>

Prudnikova E.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7983-5312>
Imatdinov I.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6927-7580>

Вирус Пуумала (*Orthohantavirus puumalaense*) является одним из возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), характеризующейся лихорадкой, тромбоцитопенией, гриппоподобными симптомами и транзиторной почечной недостаточностью. Основным природным резервуаром вируса Пуумала является рыжая полевка (*Myodes glareolus*) [1]. Ежегодно на территории Российской Федерации в среднем регистрируется порядка 6 тыс. случаев инфицирования хантавирусами, при этом за последние 10 лет (2013–2023 гг.) в РФ зарегистрировано более 77 тыс. случаев ГЛПС [2]. Вирус Пуумала широко распространен на территории РФ и вызывает до 98 % случаев ГЛПС [3, 4]. Вирус Пуумала относится к роду *Orthohantavirus* семейства *Hantaviridae* порядка *Elliovirales*. Представляет собой оболочечный вирус с сегментированным одноцепочечным (–)РНК-геном. Геном вируса имеет три сегмента: большой L-сегмент кодирует вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp); средний М-сегмент кодирует полипротеин (GPC), процессирующийся на два поверхностных гликопротеина (Gn и Gc); малый S-сегмент кодирует нуклеопротеин (N) [5]. Нуклеопротеин N инкапсулирует vРНК с формированием рибонуклеопротеина (РНП), данный комплекс служит матрицей для репликации и транскрипции, которые осуществляются RdRp [6, 7].

Согласно литературным данным, на ранних стадиях заболевания значительная часть выявляемых специфических антител направлена против нуклеопротеина N, но спустя 14 дней от начала инфекции относительное количество антител против нуклеопротеина N начинает снижаться, уступая антителам против поверхностных гликопротеинов Gn и Gc [8]. Немаловажным является тот факт, что антитела против RdRp не обнаружены ни у животных – переносчиков инфекции, ни у людей, перенесших ГЛПС [9]. Вирусспецифические антитела класса IgG против нуклеопротеина N, а также нейтрализующие антитела к гликопротеинам Gn и Gc детектируются на протяжении многих лет у переболевших, повторные случаи заражения не описаны, в связи с чем считается, что хантавирусные инфекции вызывают стойкий, вероятно, пожизненный иммунитет [10]. Таким образом, из антигенов, входящих в состав вирионов хантавирусов, при оценке гуморального иммунного ответа следует выделить нуклеопротеин N и гликопротеины Gn и Gc [11].

Диагностика ГЛПС основывается на анализе анамнеза, клинической картины, а также результатов лабораторных методов, таких как обнаружение генетического материала возбудителя (ОТ-ПЦР)

и детекции специфических антител или антигенов (ТФ ИФА). А.П. Иванов и соавт. описывают применение инаktivированного очищенного вируса Пуумала в качестве антигена при разработке экспериментальных ИФА-тест-систем [12]. Однако вирус Пуумала является «труднокultивирuемым» агентом, с длительными циклами репродукции в клеточных культурах, и работа с данным возбудителем должна проводиться в лабораториях с высоким уровнем биобезопасности, что несколько затрудняет первые этапы производства ИФА-тест-систем на основе инаktivированных вирусных материалов. Альтернативой инаktivированным вирусным материалам при разработке серодиагностикомов являются рекомбинантные белки, полученные в прокариотической системе экспрессии. Рекомбинантные антигены выгодно отличаются от нативных вирусных белков безопасностью препаративной наработки, высокой степенью чистоты при двустадийной хроматографии, а также высокой специфичностью в диагностических серологических реакциях.

В настоящее время в РФ не зарегистрировано вакцинных препаратов и средств специфической терапии против ГЛПС. При этом значительный прогресс достигнут отечественными исследователями под руководством Е.А. Ткаченко, которыми проведена разработка и продолжаются исследования бивалентной, цельновирионной, инаktivированной вакцины «Комби-ГЛПС-Вак» [13]. В то же время в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с применением альтернативного технологического подхода ведется разработка прототипной рекомбинантной векторной вакцины, действующее вещество которой представляет собой рекомбинантный вирус, экспонирующий на поверхности вирионов функциональные гликопротеины Gn и Gc вируса Пуумала. Предполагается, что введение прототипной рекомбинантной векторной вакцины будет индуцировать формирование противовирусного иммунитета, нацеленного на гетеродимеры Gn/Gc, с исключением ответа на нуклеопротеин N вируса Пуумала благодаря конструкционным особенностям. Таким образом, выявляемые антитела к нуклеопротеину N могут выступать маркером заболевания/переболевания ГЛПС, открывая перспективы для создания дифференциальных серодиагностикомов в комбинации с векторными вакцинами, что в перспективе станет надежным инструментом системного эпидемиологического надзора ГЛПС. В связи с этим **цель** работы – получение рекомбинантного нуклеопротеина N вируса Пуумала и исследование его антигенных свойств.

Материалы и методы

Получение экспрессирующей конструкции рMBP-PUUV_N. Фрагмент ДНК, кодирующий нуклеопротеин N, получали посредством амплификации в ПЦР с генетической конструкцией, содержащей открытую рамку считывания S-сегмента вируса Пуумала [Патент РФ № 2783430]. Для направленного клонирования гена N применяли праймеры, фланкирующие открытую рамку считывания нуклеопротеина N и добавляющие на 5'-концах последовательности сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции BamHI и XhoI. ДНК-фрагмент клонировали в экспрессирующем векторе рMBP по сайтам BamHI и XhoI с использованием стандартных молекулярно-биологических методов и подходов. Лигазной смесью трансформировали химически компетентные клетки *Escherichia coli* штамма NEB Stable (NEB, США). После 16 ч роста на агаризированной среде Lysogeny broth (LB) с селективным антибиотиком (100 мкг/мл ампициллина) при температуре (30±0,5) °C отбирали единичные колонии и культивировали 16 ч в жидкой питательной среде LB с 100 мкг/мл ампициллина при температуре (30±0,5) °C. Плазмидную ДНК клонов-трансформантов экстрагировали с использованием набора QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Германия). Корректность генетической конструкции рMBP-PUUV_N подтверждали методом рестрикционного анализа и секвенирования по методу Сэнгера.

Получение прокариотического продуцента рекомбинантного химерного белка 6xHis-MBP-N. Продуценты рекомбинантного белка 6xHis-MBP-N получали трансформацией электрокомпетентных клеток *E. coli* штамма KRX (Promega, США) плазмидой рMBP-PUUV_N. Трансформанты выращивали на агаризированной среде LB, содержащей 1 % глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина. Полученными клонами-трансформантами засеивали жидкую среду LB (100 мкг/мл ампициллина), культивировали 6–8 ч при (37±0,5) °C в термостатируемом орбитальном шейкере при 220 об/мин до достижения OD₆₀₀=0,6. Продукцию рекомбинантного белка 6xHis-MBP-N индуцировали добавлением L-рамнозы до концентрации 0,1 % и изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до концентрации 1 mM, индукцию экспрессии проводили в течение 20–24 ч при (18±0,5) °C при 220 об/мин.

Выделение и очистка рекомбинантного химерного белка 6xHis-MBP-N. Бактериальную биомассу осаждали центрифугированием при 4500 g в течение 15 мин при (4±0,5) °C, осадок ресуспендировали в фосфатном буфере А (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 25 mM имидазола, pH 8,0) из расчета 15 мл буфера на 1 г клеточного осадка. Лизис клеток осуществляли гомогенизацией под давлением в гомогенизаторе EmulsiFlex-C3 (Avestin, Канада). С целью снижения вязкости лизата, а также для минимизации нуклеиновых кислот клеток-продуцентов на каждые 10 мл лизата вносили по 10 тыс. единиц

нуклеазы *Serratia marcescens*. Лизат инкубировали при (4±0,5) °C в течение 20 мин и осветляли центрифугированием при 13000 g в течение 30 мин при (4±0,5) °C. Очистку рекомбинантного белка 6xHis-MBP-N проводили методом металл-хелатной аффинной хроматографии на сорбенте Sepharose Ni-NTA (GE Healthcare, Великобритания). После нанесения осветленного лизата сорбент промывали фосфатным буфером «А» со ступенчатым повышением концентрации имидазола: 50, 100 и 150 mM. Целевой белок элюировали фосфатным буфером Б (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 500 mM имидазола, pH 8,0). Для протеолитического отщепления химерной лидирующей последовательности 6xHis-MBP от нуклеопротеина N к фракции элюата вносили протеазу TEV (Invitrogen, США) в массовом соотношении протеазы к белку 1:100. Совмещение диализа против буфера А при температуре (4±0,5) °C в течение 20 ч с гидролизом TEV-протеазой существенно ускоряет и упрощает промежуточные этапы очистки рекомбинантного антигена без аффинных меток. В последующем продукты протеолиза разделяли методом металл-хелатной аффинной хроматографии посредством нанесения ретентата на колонку с Sepharose Ni-NTA. Благодаря присутствию в составе полипептидов аффинной метки 6xHis лидирующая последовательность 6xHis-MBP, TEV-протеаза и негидролизированный белок 6xHis-MBP-N связывались с неподвижной фазой, в то время как целевой нуклеопротеин N без аффинных меток оставался в подвижной фазе. Белковые фракции анализировали в 10 % ПААГ в денатурирующих условиях по методу U.K. Laemmli [14] с последующей визуализацией продуктов разделения в геле с использованием трифенилметанового красителя Кумасси G-250 (Merck, Германия). В дальнейших серологических реакциях использовали фракции с максимальным содержанием белка N. Концентрацию белка измеряли с использованием набора Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение антигенной активности рекомбинантного нуклеопротеина N вируса Пуумала в вестерн-блоттинге. Иммунологические исследования проводили с использованием специфического мышинового моноклонального антитела 5F147 (MyBioSource, США) и панели сывороток крови пациентов с диагнозом «хантавирусная инфекция в результате инфицирования вирусом Пуумала», наличие специфических антител подтверждено в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ). Определение антигенной активности рекомбинантного нуклеопротеина N проводили методом вестерн-блоттинга. Образец нуклеопротеина N разделяли в 10 % ПААГ в денатурирующих условиях. Перенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану проводили полусухим методом. Затем мембрану помещали в блокирующий буфер (10 mM Трис-HCl,

150 mM NaCl, 0,05 % Твин-20, 3 % рыбий желатин, pH 7,5) на 1 ч при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Далее мембрану 3-кратно отмывали в буфере TBST (10 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Твин-20, pH 7,5) и инкубировали с моноклональными антителами 5F147 в разведении 1:500 (MyBioSource, США) или с сывороткой крови реконвалесцентов в разведении 1:100 в течение 1 ч при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. После 3-кратной отмывки в буфере TBST мембрану инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с пероксидазным конъюгатом Rabbit Anti-Mouse IgG H&L (Abcam, Великобритания) в разведении 1:10000 или с пероксидазным конъюгатом Rabbit Anti-Human IgG H&L (Abcam, Великобритания) в разведении 1:10000. После 3-кратной отмывки проводили визуализацию образовавшихся иммунных комплексов добавлением 0,3 % раствора диаминобензидина (DAB) в 0,1 % перекиси водорода. Реакцию останавливали отмывкой мембран в дистиллированной воде.

Исследование антигенной активности рекомбинантного нуклеопротеина N вируса Пуумала в ТФ ИФА. Постановку ТФ ИФА для определения антигенной активности осуществляли с использованием как рекомбинантного хроматографически очищенного антигена, так и с инактивированным вирусным материалом. Препарат вирусного антигена получали посредством инфицирования пермиссивной клеточной культуры (Vero) вирусом Пуумала, изолят № 986 (Коллекция микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). При достижении 85–90 % деструкции монослоя клеток в результате цитопатического действия культуральную жидкость осветляли центрифугированием и инактивировали добавлением 0,1 % раствора пропиолактона. Отсутствие остаточной инфекционной активности подтверждали пассированием в культуре клеток Vero (не менее трех пассажей). Рекомбинантный нуклеопротеин N (финальная концентрация – 1–5 мкг/лунка) или инактивированный вирусный антиген (финальная концентрация – 10–50 мкг/лунка) разводили в растворе 0,1 М натрия углекислого (Na_2CO_3) и вносили по 100 мкл в лунки планшета для иммунологических реакций (Corning, США). Инкубировали 18 ч при $(4 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ с последующей трехкратной отмывкой фосфатно-солевым буферным раствором с Твином (ФСБ-Т) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4 , 0,1 % Твин-20, pH 7,4). Для блокирования свободных сайтов связывания полистирола использовали 0,1 % казеина в ФСБ-Т, для чего вносили по 200 мкл/лунка и инкубировали 2 ч при $(21 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Жидкость из лунок удаляли аспирацией, планшет высушивали 16–18 ч при $(21 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Планшеты хранили до использования при $(4 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Сыворотки крови реконвалесцентов разводили от 1:100 до 1:102400 серией последовательных двукратных разведений в растворе 0,1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) и вносили по 100 мкл разведений в дубле в лунки планшетов с рекомбинантным и инактивированным вирусным антигеном.

В качестве отрицательного контроля исследовали сыворотки крови от условно здоровых доноров и пациентов с похожими заболеваниями методом скрининга (в разведении 1:100). Планшеты инкубировали 1 ч при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ с последующей пятикратной отмывкой ФСБ-Т. Для выявления комплексов «антиген – антитело» в лунки вносили по 100 мкл раствора пероксидазного конъюгата моноклональных антител мыши к IgG человека (ООО «Биосан», Россия) 1:100 в 0,1 % казеине, инкубировали 30 мин при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и пятикратно отмывали ФСБ-Т. Визуализацию образовавшихся иммунных комплексов проводили внесением 100 мкл хромогенного субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) с инкубацией 15 мин при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Реакцию останавливали внесением 1 М раствора серной кислоты, результаты учитывали на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм. Дополнительные исследования, направленные на оценку перспективы применения рекомбинантного нуклеопротеина N в качестве антигена в диагностических серологических реакциях, осуществляли относительно коммерческого набора «Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к хантавирусам в сыворотке (плазме) крови “ВектоХанта-IgG”» (АО «Вектор-Бест», Россия). Исследуемые образцы сывороток крови разводили аналогично от 1:100 до 1:102400 серией последовательных двукратных разведений в растворе 0,1 % БСА. Анализ и интерпретацию результатов проводили согласно инструкции по применению «Набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к хантавирусам в сыворотке (плазме) крови “ВектоХанта-IgG”» (АО «Вектор-Бест», Россия).

Для статистической обработки применялся непараметрический критерий статистической значимости результата оценки – коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Отечественными и зарубежными исследователями показано, что нуклеопротеин N вируса Пуумала является иммунодоминантным белком, антитела на который регистрируются на протяжении долгого времени после перенесенной инфекции у людей и животных [8]. Препаративная наработка антигенов вируса Пуумала из вирусосодержащего материала осложнена особенностями культуральных свойств возбудителя и высокими требованиями к биобезопасности. В качестве возможного решения в данной работе предлагается получение диагностически значимых антигенов хантавирусов в прокариотической системе экспрессии.

На первом этапе получена экспрессирующая генетическая конструкция rMBP-PUUV_N. Открытая рамка считывания нуклеопротеина N амплифицирована в ПЦР с полученной нами ранее минигеномной системой, содержащей полноразмерную кДНК-

копию S-сегмента вируса Пуумала [11]. Полученная плаزمида рMBP-PUUV_N кодирует химерный белок 6xHis-MBP-N, состоящий из лидирующей последовательности 6xHis-MBP, обеспечивающей высокую растворимость слитых белков и аффинность взаимодействия с хелатированными ионами Ni^{2+} или Co^{2+} в коммерческих смолах (NTA-, IDA- и т.п.), для ферментативного удаления метки после 6xHis-MBP располагается сайт расщепления TEV-протеазы, за которым следует аминокислотная последовательность нуклеопротеина N вируса Пуумала. Применение стратегии отщепляемой аффинной метки 6xHis-MBP в комплексе со штаммом KRX *E. coli* со строгим контролем экспрессии трансгена позволяет получить высокие выходы растворимого рекомбинантного белка 6xHis-MBP-N (до ~40 мг/л).

Выделение рекомбинантного белка 6xHis-MBP-N из бактериального лизата прокариотического продуцента осуществляли методом аффинной хроматографии на сорбенте Sepharose Ni-NTA согласно общепринятым рекомендациям. Известно, что один раунд аффинной хроматографии не всегда обеспечивает достаточный уровень чистоты рекомбинантных белков, в связи с чем требуются дополнительные методы доочистки, что существенно усложняет и удорожает процесс производства антигенов в бактериальных системах. Помимо этого, присутствие аффинных меток (6xHis, ALFA, Strep-Tag и т.д.) и белков-партнеров из *E. coli* (MBP, TrxA, GST и т.п.) в составе рекомбинантных антигенов может отразиться на результатах постановки серологических исследований, связывая антитела, нацеленные не на фрагмент вирусного антигена.

В рамках данной работы использовано решение с отщеплением аффинной метки, с последующей второй металл-хелатной хроматографией. При этом на неподвижной фазе остаются все балластные белки *E. coli*, связавшиеся и элюированные в ходе первой хроматографии, TEV-протеаза, метка 6xHis-

MBP, а также не расщепленный 6xHis-MBP-N. Нуклеопротеин N в ходе второй хроматографии с неподвижной фазой не связывается. Такой подход наименее трудозатратен, экономически эффективен и позволяет получить антигены с требуемой аминокислотной последовательностью.

Первичный анализ белковых фракций, полученных в ходе первой и второй аффинной хроматографии, проведен в ходе постановки ПААГ-электрофореза (рис. 1).

Молекулярная масса химерного белка 6xHis-MBP-PUUV_N в денатурирующих условиях близка к расчетной – 94,1 кДа (рис. 1). Этап протеолитического отщепления 6xHis-MBP-PUUV_N, совмещенного с диализом, с последующей второй хроматографией, позволил получить рекомбинантный нуклеопротеин N без аффинных меток с высокой степенью чистоты (более 95 % согласно ДСН-ПААГ). При этом молекулярная масса рекомбинантного нуклеопротеина N вируса Пуумала соответствовала расчетной – 49,4 кДа (рис. 1). Выход очищенного рекомбинантного нуклеопротеина N вируса Пуумала составил не менее 3,3 мг/л среды LB.

Антигенные свойства хроматографически очищенного рекомбинантного нуклеопротеина N вируса Пуумала подтверждали методом вестерн-блоттинга с использованием специфических моноклональных мышинных антител 5F147 (рис. 2, А) и двух сывороток крови реконвалесцентов ГЛПС (рис. 2, В). В лунки геля загружали от 50 до 150 нг рекомбинантного белка N. Специфическое взаимодействие «антиген – антитело» визуализировали с помощью антивидового пероксидазного конъюгата и хромогенного субстрата с диаминобензидином (DAВ) и перекисью водорода, что проявлялось в виде окрашенных полос на нитроцеллюлозной мембране. Молекулярная масса взаимодействующего с антителами белка совпадает с теоретической молекулярной массой и составляет ~49,4 кДа.

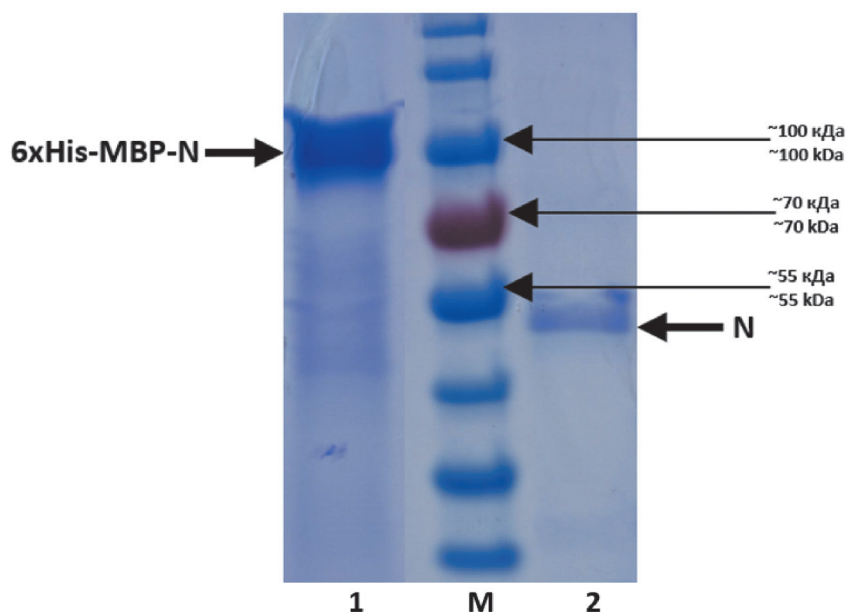


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле образцов с различных этапов получения рекомбинантного нуклеопротеина N вируса Пуумала:

1 – хроматографически очищенный белок 6xHis-MBP-N; M – белковый маркер молекулярной массы (кДа) (PageRuler, Invitrogen); 2 – рекомбинантный нуклеопротеин N вируса Пуумала

Fig. 1. Electrophoretic separation of samples from different stages of obtaining recombinant nucleoprotein N of Puumala virus in polyacrylamide gel: 1 – chromatographically purified protein 6xHis-MBP-N; M – protein marker of molecular weight (kDa) (PageRuler, Invitrogen); 2 – recombinant nucleoprotein N of Puumala virus

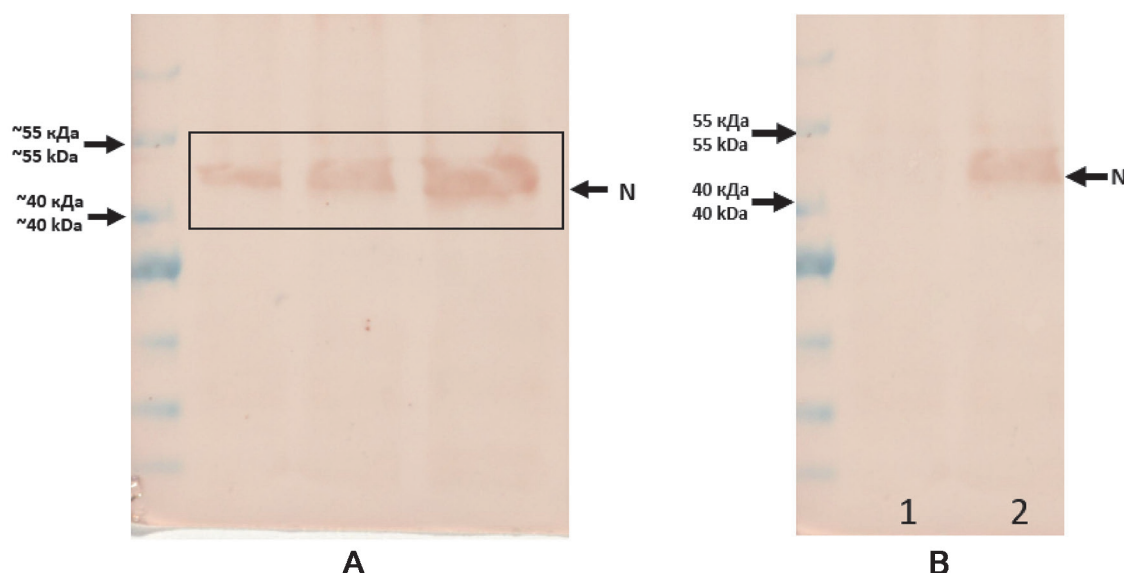


Рис. 2. Исследование антигенных свойств рекомбинантного хроматографически очищенного нуклеопротеина N вируса Пуумала с использованием моноклональных антител 5F147 (1:500) (MyBioSource, США) (А) и с использованием сыворотки крови реконвалесцента ГЛПС (В):

1 – хроматографически очищенный ксеноантиген, не содержащий аминокислотные последовательности хантавирусов (К-); 2 – рекомбинантный белок N вируса Пуумала

Fig. 2. Study of the antigenic properties of the recombinant chromatographically purified nucleoprotein N of the Puumala virus using mono-clonal antibodies 5F147 (1:500) (MyBioSource, USA) (A) and the blood serum of a HFRS convalescent (B):

1 – chromatographically purified xenoantigen not containing the amino acid sequences of hantaviruses (K-); 2 – recombinant protein N of the Puumala virus

При постановке вестерн-блоттинга рекомбинантного хроматографически очищенного нуклеопротеина N вируса Пуумала с коммерческим моноклональным антителом 5F147 и сыворотками крови реконвалесцентов ГЛПС выявили единичный бенд, соответствующий ожидаемой молекулярной массе ~49,4 кДа, при полном отсутствии продуктов иной массы, что говорит о высокой специфичности взаимодействия.

Для изучения возможности применения полученного рекомбинантного нуклеопротеина N вируса Пуумала в качестве антигена в диагностических серологических реакциях проанализирована панель из 35 образцов сывороток крови пациентов с диагнозом «хантавирусная инфекция в результате инфицирования вирусом Пуумала», наличие специфических антител в которых подтверждено в РНИФ. В качестве отрицательного контроля исследовали 298 образцов от условно здоровых доноров и пациентов с похожими заболеваниями.

Специфические антитела выявили во всех образцах сыворотки крови, полученных от пациентов с подтвержденным диагнозом «хантавирусная инфекция» (n=35) при использовании в качестве антигена как рекомбинантного нуклеопротеина N «ИФА N», так и нативного антигена «ИФА нат» (таблица). Ложноположительных результатов при исследовании образцов (n=298) от условно здоровых доноров и пациентов с похожими заболеваниями не выявлено.

Ранговый коэффициент корреляции Спирмена в парах данных «РНИФ – ИФА N» составил 0,37. Аналогичный показатель в парах «ИФА N – ИФА нат» равен 0,91. Специфические иммуногло-

булины в сыворотках крови инфицированных пациентов выявлены в титрах от 1:200 до 1:102400. Ранговый коэффициент корреляции Спирмена в парах данных «РНИФ – ИФА N» свидетельствует о слабopоложительной корреляции, тогда как аналогичная величина в парах «ИФА N – ИФА нат» говорит о высокой корреляции результатов.

Дополнительно проведено сравнительное исследование методом ИФА этих же образцов с использованием коммерческого набора «ВектоХанта-IgG» (таблица). Ранговый коэффициент корреляции Спирмена в парах данных «ИФА N – “ВектоХанта-IgG”» составил величину более 0,7. Логарифм среднегеометрических значений титров иммуноглобулинов составил $3,33 \pm 0,7$ для исследуемого антигена и $3,59 \pm 0,7$ для коммерческого набора при высокой корреляции результатов.

Для данной работы использована последовательность нуклеопротеина N актуального штамма вируса Пуумала, выделенного в 2019 г. из легочной ткани грызунов-переносчиков (GenBank: MZ014466.1). В исследовании описано получение рекомбинантного нуклеопротеина вируса Пуумала, не содержащего аффинные метки, а также представлены результаты серологических реакций с его использованием, которые демонстрируют высокую антигенную специфичность.

По результатам исследований показано, что рекомбинантный нуклеопротеин N пригоден для выявления методом ТФ ИФА специфических иммуноглобулинов в сыворотках крови, инфицированных вирусом Пуумала пациентов, при полном отсутствии ложноположительных результатов. Применение в

Сравнительный анализ титров специфических антител к вирусу Пуумала в образцах сыворотки крови пациентов
Comparative analysis of titers of specific antibodies to Puumala virus in serum samples of patients

№ образца Sample No.	№ рег. Registration No.	Обратный титр антител Reverse antibody titer			
		РНИФ IIFR	ИФА ELISA		
			Рек. N Recom. N	Вирус Пуумала PUUV	«ВектоХанта-IgG» VectoHanta-IgG
1	872	512	800	400	1600
2	874	4096	1600	1600	6400
3	1059	4096	3200	25600	800
4	1060	4096	6400	25600	1600
5	1115	4096	1600	800	3200
6	1116	4096	102400	51200	102400
7	1117	4096	1600	800	800
8	1118	4096	1600	3200	6400
9	1192	1024	3200	25600	6400
10	1201	1024	400	400	3200
11	1206	4096	12800	25600	51200
12	1207	16384	102400	25600	102400
13	1208	1024	800	3200	800
14	1209	16384	1600	6400	1600
15	1210	1026	800	1600	3200
16	1211	65536	3200	12800	6400
17	1306	1024	1600	3200	6400
18	1335	1024	400	400	1600
19	1338	256	800	3200	3200
20	1339	1024	6400	25600	25600
21	1340	1024	12800	12800	25600
22	1341	4096	12800	25600	25600
23	1342	1024	400	480	1600
24	1343	4096	12800	51200	25600
25	1344	256	200	400	400
26	1345	1024	51200	102400	51200
27	1372	64	800	800	200
28	1373	1024	800	3200	800
29	1374	4096	1600	1600	1600
30	1375	256	3200	6400	3200
31	1376	1024	6400	25600	12800
32	1377	256	1600	3200	6400
33	1378	16384	3200	25600	25600
34	1379	256	1600	6400	1600
35	1380	256	25600	102400	12800
36	K1	0,0099	0,0069	0,0064	0,0063
37	K2	0,0128	0,0101	0,0115	0,0113
38	K3	0,0063	0,0064	0,0062	0,0065
39	K4	0,0081	0,0074	0,0074	0,0081

Примечание: образцы 1–35 – сыворотки крови пациентов с диагнозом «хантавирусная инфекция в результате инфицирования вирусом Пуумала»; образцы 36–37 – сыворотки крови условно здоровых доноров; образцы 38–39 – сыворотки крови пациентов с похожими заболеваниями. РНИФ – реакция непрямой иммунофлуоресценции.

Note: samples 1–35 are blood sera from patients diagnosed with hantavirus infection as a result of infection with the Puumala virus; samples 36–37 are blood sera from conditionally healthy donors; samples 38–39 samples are blood sera from patients with similar diseases. IIFR – indirect immunofluorescence reaction.

ТФ ИФА рекомбинантного нуклеопротеина N как антигена может обеспечить выявление специфических иммуноглобулинов к вирусу Пуумала на уровне требований, предъявляемых к диагностическим медицинским изделиям (чувствительность, специфичность).

Рекомбинантный нуклеопротеин N вируса Пуумала, полученный по описанной в данной работе методике, может быть использован при разработке серологических тест-систем, в том числе для дифференциации вакцинированных векторной вакциной лиц от переболевших.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (ГЗ-26/21).

Список литературы

1. Jiang H., Du H., Wang L.M., Wang P.Z., Bai X.F. Hemorrhagic fever with renal syndrome: pathogenesis and clinical picture. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6:1. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00001. Erratum in: *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6:178. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00178.
2. Савицкая Т.А., Иванова А.В., Зубова А.А., Решетникова И.Д., Исаева Г.Ш., Трифонов В.А., Магерамов Ш.В., Марцоха К.С., Транквилевский Д.В. Хантавирусные болезни: обзор эпидемиологической ситуации в мире. Анализ эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2024; (1):113–24. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-113-124.
3. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., Kurashova S.S., Balkina A.S., Tkachenko P.E., Kruger D.H., Klempa B. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12):2325–8. DOI: 10.3201/eid2512.181649.
4. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., Tordo N., Plyusnin A. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses.* 2019; 11(8):679. DOI: 10.3390/v11080679.
5. Hussein I.T., Mir M.A. How hantaviruses modulate cellular pathways for efficient replication? *Front. Biosci. (Elite Ed.)*. 2013; 5(1):154–66. DOI: 10.2741/e604.
6. Reguera J., Malet H., Weber F., Cusack S. Structural basis for encapsidation of genomic RNA by La Crosse Orthobunyavirus nucleoprotein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(18):7246–51. DOI: 10.1073/pnas.1302298110.
7. Li B., Wang Q., Pan X., Fernández de Castro I., Sun Y., Guo Y., Tao X., Risco C., Sui S.F., Lou Z. Bunyamwera virus possesses a distinct nucleocapsid protein to facilitate genome encapsidation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(22):9048–53. DOI: 10.1073/pnas.1222552110.
8. Yoshimatsu K., Arikawa J. Antigenic properties of N protein of hantavirus. *Viruses.* 2014; 6(8):3097–109. DOI: 10.3390/v6083097.
9. Zöller L.G., Yang S., Gött P., Bautz E.K., Darai G. A novel mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(5):1194–9. DOI: 10.1128/jcm.31.5.1194-1199.1993.
10. Saavedra F., Díaz F.E., Retamal-Díaz A., Covián C., González P.A., Kalergis A.M. Immune response during hantavirus diseases: implications for immunotherapies and vaccine design. *Immunology.* 2021; 163(3):262–77. DOI: 10.1111/imm.13322.
11. Reuter M., Krüger D.H. The nucleocapsid protein of hantaviruses: much more than a genome-wrapping protein. *Virus Genes.* 2018; 54(1):5–16. DOI: 10.1007/s11262-017-1522-3.
12. Иванов А.П., Дзагурова Т.К., Курашова С.С., Теодорович Р.Д., Клеблеева Т.Д., Ткаченко Е.А. Система иммуноферментного анализа для серологической диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом на основе инактивированного очищенного вируса Пуумала (Hantaviridae: Orthohantavirus). *Вопросы вирусологии.* 2024; 69(3):285–9. DOI: 10.36233/0507-4088-230.
13. Синугина А.А., Дзагурова Т.К., Ишмухаметов А.А., Баловнева М.В., Курашова С.С., Коротина Н.А., Егорова М.С., Ткаченко Е.А. Доклинические исследования поливалентной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2019; 18(4):52–8. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-52-58.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

References

1. Jiang H., Du H., Wang L.M., Wang P.Z., Bai X.F. Hemorrhagic fever with renal syndrome: pathogenesis and clinical picture. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6:1. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00001. Erratum in: *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6:178. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00178.
2. Savitskaya T.A., Ivanova A.V., Zubova A.A., Reshetnikova I.D., Isaeva G.Sh., Trifonov V.A., Magerramov Sh.V., Martsokha K.S., Trankvilevsky D.V. [Hantavirus infections: review of the epidemiological situation around the world. Analysis of the epidemiological situation on hemorrhagic fever with renal syndrome in the Russian Federation in 2023 and forecast of its development for 2024]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; (1):113–24. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-113-124.
3. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., Kurashova S.S., Balkina A.S., Tkachenko P.E., Kruger D.H., Klempa B. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12):2325–8. DOI: 10.3201/eid2512.181649.
4. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., Tordo N., Plyusnin A. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses.* 2019; 11(8):679. DOI: 10.3390/v11080679.
5. Hussein I.T., Mir M.A. How hantaviruses modulate cellular pathways for efficient replication? *Front. Biosci. (Elite Ed.)*. 2013; 5(1):154–66. DOI: 10.2741/e604.
6. Reguera J., Malet H., Weber F., Cusack S. Structural basis for encapsidation of genomic RNA by La Crosse Orthobunyavirus nucleoprotein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(18):7246–51. DOI: 10.1073/pnas.1302298110.
7. Li B., Wang Q., Pan X., Fernández de Castro I., Sun Y., Guo Y., Tao X., Risco C., Sui S.F., Lou Z. Bunyamwera virus possesses a distinct nucleocapsid protein to facilitate genome encapsidation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(22):9048–53. DOI: 10.1073/pnas.1222552110.
8. Yoshimatsu K., Arikawa J. Antigenic properties of N protein of hantavirus. *Viruses.* 2014; 6(8):3097–109. DOI: 10.3390/v6083097.
9. Zöller L.G., Yang S., Gött P., Bautz E.K., Darai G. A novel mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(5):1194–9. DOI: 10.1128/jcm.31.5.1194-1199.1993.
10. Saavedra F., Díaz F.E., Retamal-Díaz A., Covián C., González P.A., Kalergis A.M. Immune response during hantavirus diseases: implications for immunotherapies and vaccine design. *Immunology.* 2021; 163(3):262–77. DOI: 10.1111/imm.13322.
11. Reuter M., Krüger D.H. The nucleocapsid protein of hantaviruses: much more than a genome-wrapping protein. *Virus Genes.* 2018; 54(1):5–16. DOI: 10.1007/s11262-017-1522-3.
12. Ivanov A.P., Dzagurova T.K., Kurashova S.S., Teodorovich R.D., Klebleeva T.D., Tkachenko E.A. [Enzyme immunoassay system for serological diagnostics of hemorrhagic fever with renal syndrome based on inactivated purified Puumala virus (Hantaviridae: Orthohantavirus)]. *Problemy Virusologii [Problems of Virology]*. 2024; 69(3):285–9. DOI: 10.36233/0507-4088-230.
13. Siniugina A.A., Dzagurova T.K., Ishmukhametov A.A., Balovneva M.V., Kurashova S.S., Korotina N.A., Egorova M.S., Tkachenko E.A. [Preclinical studies of a polyvalent vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome]. *Épidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2019; 18(4):52–8. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-52-58.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

Authors:

Tishin A.E., P'yankov S.A., Prudnikova E.Yu., Imatdinov I.R. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Об авторах:

Тишин А.Е., Пьянков С.А., Прудникова Е.Ю., Иматдинов И.Р. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.