

А.В.Иванова¹, Е.И.Казачинская¹, А.В.Качко¹, Е.Л.Субботина¹, А.В.Сорокин¹, И.А.Разумов¹,
С.В.Нетёсов², В.Б.Локтев¹

ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ VP40 И NP ФИЛОВИРУСОВ

¹ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово;

²ГОУ ВПО Новосибирский Государственный университет

Получены генетические конструкции, несущие полноразмерные гены матричных белков VP40 вируса Эбола (ВЭ) и вируса Марбург (ВМ), а также нуклеопротеина (NP) ВЭ. Экспрессия этих генов в прокариотической системе *Escherichia coli* с последующей аффинной очисткой на Ni-NTA агарозе обеспечивала получение полноразмерных рекомбинантных белков VP40 и NP филовирюсов. Исследование иммунологических свойств аффинно-очищенных полноразмерных белков показало, что они сохранили антигенные свойства, присущие нативным белкам филовирюсов. Это делает перспективными их использование для совершенствования иммунодиагностики и конструирования экспериментальных вакцин против филовирюсных инфекций.

Ключевые слова: вирус Марбург (ВМ), вирус Эбола (ВЭ), рекомбинантные белки.

Семейство *Filoviridae* включает в себя два рода: *Marburgvirus* и *Ebolavirus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>). К роду *Ebolavirus* относятся четыре вида вирусюв: *Zaire ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Ivory Coast ebolavirus* и, возможно, недавно описанный *Bundibugyo ebolavirus* [10, 12]. Род *Marburgvirus*, второй представитель семейства, включает в себя единственный вид *Lake Victoria marburgvirus*. Геном филовирюсов представлен линейной одноцепочечной РНК негативной полярности, 18959 нуклеотидов для ВЭ и 19112 нуклеотидов для ВМ. Вирионы филовирюсов имеют характерную сложную структуру, сформированную белками NP, VP30, VP40, VP35, L-белок, РНК-зависимая РНК-полимераза, – нуклеокапсид, и вирусная частица покрыта наружной липидной оболочкой, в которой локализуется 2 структурных белка (VP24 и гликопротеин (GP)) [9]. Филовирюсы способны вызывать геморрагические лихорадки у человека с крайне тяжелым течением заболевания и высоким уровнем летальности (до 90 %) [22].

NP ВЭ кодируется геном 1, расположенным на 3'-конце генома [16] и является одним из трех мажорных компонентов нуклеокапсиды (NP – 27 %, белок VP40 – 37,7 %, белок VP35 – 24,5 % от общей массы вириона) [9]. Белок NP обладает способностью к самосборке и формированию спиральных структур, которые, однако, не идентичны вирусным нуклеокапсидам. NP подвергается посттрансляционным модификациям, включающим фосфорилирование и О-гликозилирование [10]. Показано его участие в репликации вирусного генома совместно с белками L и VP35 [16]. Филогенетический анализ известных нуклеотидных последовательностей гена NP показывает его эволюционный консерватизм [14]. Белок NP ВЭ является хорошим иммуногеном и основные иммуногенные детерминанты белка NP расположены в пределах 110 С-концевых аминокислотных остатков NP белка [19]. Кроме того, показано, что С-конец белка NP играет важную роль в формировании ви-

русного нуклеокапсиды [15].

Белок VP40 филовирюсов является основным компонентом матрикса вирионов и способен самостоятельно формировать вирусоподобные частицы [15]. Гидрофобные и положительно заряженные аминокислотные остатки С-концевого района VP40, по-видимому, важны для сборки вирусных частиц. N-концевая область VP40 обеспечивает взаимодействие с мембранами посредством содержащегося в нем кластера положительно заряженных аминокислот [18]. Структурные белки NP и VP40 индуцируют выработку протективных антител. Экспериментальная бивакцина на основе аденовирусного вектора, несущего гены белков ВМ и ВЭ, обеспечивает полную защиту обезьян от летальной инфекции. [21]. В природных очагах распространения филовирюсов также регистрируется наличие специфических антител к этим белкам у обезьян и переболевших людей [7].

Белки VP40 и NP также были использованы для конструирования эффективных иммуноферментных тест-систем [11, 13] и исследования особенностей репликации филовирюсов в клетках [17].

Ранее нами были исследованы некоторые иммунохимические свойства белков VP35 ВМ, ВЭ и NP ВМ. В данной работе мы описываем получение полноразмерных рекомбинантных белков NP, VP40 ВЭ и VP40 ВМ, а также их иммунохимические свойства.

Материалы и методы

Вирусная РНК. Вирусная РНК была изолирована из инактивированных препаратов ВЭ, вид Заир (штамм Mayinga) и ВМ (штамм Popo), которые были получены, как описано ранее [5, 2]. Фрагменты генома ВЭ, кодирующие белки VP40 и NP, получили методом ОТ-ПЦР с использованием следующих праймеров:

для VP40:

5' – AAAAGGATCCATGAGGCGGGTTATATGCCTAC – 3'

5' – AAAAAAGCTTTACTTCTCAATCAGCTGGAA – 3'

для NP:

5' – AAAAAGGATCCATGGATTCTCGTCCTCAGAAAAATCTGG – 3'

5' – AAAAAAAGCTTTCACGTGATGATGTTGCAGGATTG – 3'

Полноразмерные ДНК-копии генов VP40 и NP ВЭ после гидролиза эндонуклеазами BamHI и HindIII клонировали в составе вектора pQE-30 (QIAGEN). Подлинность полученных гибридных плазмид pQE30-VP40 и pQE30-NP проверяли рестриктивным анализом и секвенированием. Для сборки полноразмерной ДНК-копии гена белка VP40 ВМ использовали плазмиду pMBG 4-48 из библиотеки клонов *E. coli* (штамм JC5183), несущих рекомбинантные плазмиды со вставками ДНК-копий фрагментов геномной РНК ВМ [8]. Для создания прокариотической системы экспрессии гена VP40 ВМ использовалась векторная плазида pQE-31(QIAGEN).

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков. Штамм *E. coli* JM 103, трансформированный плазмидной ДНК pQE30-VP40, pQE30-NP и pQE31-VP40, культивировали в 100 мл жидкой питательной среды LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) при 37 °C и перемешивании с частотой 160 об/мин. Индукцию синтеза рекомбинантных белков проводили добавлением изопропил-D-тиогалактозида (ИПТГ) и инкубированием в течение 4 ч при 30 °C до конечной концентрации 0,2 мМ. Очистку рекомбинантных белков проводили аффинной хроматографией на Ni-хелатной смоле согласно протоколу фирмы-производителя («QIAGEN», Германия). Электрофорез белков проводили по методу Лэммли в 10 % (для NP) и 15 % (для VP40) полиакриламидном геле. Концентрацию белка измеряли при помощи набора Protein Assay («Bio-Rad», США) в соответствии с рекомендациями производителя на спектрофотометре UVmini 1240 («Shimadzu», Япония) при длине волны 495 нм и оценивали по лабораторной калибровочной кривой, построенной для очищенных IgG крысы.

В работе использовали препараты эндонуклеаз рестрикции и ферментов модификации производства ТОО «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия). Секвенирование плазмид проводили по методу, описанному в работе [20] на автоматическом секвенаторе ДНК Beckman CEQ2000XL (Beckman Coulter, США) согласно инструкции фирмы-производителя, маркеры молекулярных масс белков («Sigma», США).

Моноклональные антитела (МКА) и поликлональные сыворотки. В работе были использованы специфические гибридомные МКА к ВЭ и ВМ, полученные, как описано ранее [3]. Для очистки МКА из асцитических жидкостей мышей BALB/c использовали каприловую кислоту с последующим осаждением IgG в 50 % растворе сульфата аммония (pH 7,0). Концентрацию очищенных МКА определяли, как описано выше.

Препарат лошадиных иммуноглобулинов (против инфекционного ВЭ) (IgG-лошадь-ВЭ), очищенных из гипериммунных сывороток методом спиртового фракционирования на холоду по Кону, был получен из ВЦ НИИМ МО РФ (Сергиев Посад) [1]. Поликлональные мышинные и крысиные антисыворотки к ВЭ получены, как описано ранее [3]. Получение антисыворотки кро-

лика против ВЭ описано в работе [6]. Моносыыворотки к рекомбинантным белкам получали в результате 4-кратной внутрибрюшинной иммунизации мышей ICR с интервалом в 1 неделю. При первой иммунизации с полным, при второй – с неполным адъювантом Фрейнда в 0,9 % растворе натрия хлорида в соотношении 1:1 и без адъюванта при последующих иммунизациях (в общей концентрации рекомбинантных белков 100 мкг/мышь в объеме 0,5 мл).

В качестве референс-сыворотки против ВМ использовали сыворотку человека, переболевшего лихорадкой Марбург [4]. Мышиные и кроличьи антисыворотки против ВМ (АС-ВМ) получали, как описано ранее [3]. Коммерческий препарат лошадиных иммуноглобулинов против инфекционного ВМ (IgG-лошадь-ВМ), очищенных из гипериммунных сывороток методом спиртового фракционирования на холоду по Кону, был получен из ВЦ НИИМ МО РФ (Сергиев Посад).

Твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА). Для проведения непрямого ТИФА в качестве антигена использовали инаktivированные препараты ВЭ и ВМ, полученные, как описано в [2, 5]. В каждую лунку полистироловых планшетов (ВНИИ Медполимер, Москва, «Costar», США) вносили антиген в концентрации 1000 нг/мл в объеме 100 мкл (антиген ВМ в карбонат-бикарбонатном буфере с pH 9,0; антиген ВЭ в 0,05 М двузамещенном Na-фосфатном буфере с pH 8,0; рекомбинантные филовиральные белки в растворе 4 М мочевины в 0,05 М двузамещенном Na-фосфатном буфере с pH 8,0) и выдерживали при 22 °C в течение 18 ч или 1 ч при 37 °C. Места для неспецифического связывания антител на планшетах насыщали 0,5 % раствором казеина в течение 30 мин при 37 °C в ТСБ-Т буфере (трис-солевой буфер с твином), содержащем 0,15 М NaCl; 0,02 М трис-HCl pH 7,4; 0,05 % твин-20. Затем раствор казеина удаляли и инкубировали антиген с МКА или специфическими в течение 1 ч при 37 °C или 18 ч при 4 °C. После трехкратной отмывки ТСБ-Т буфером в лунки добавляли по 100 мкл пероксидазного конъюгата антивидовых антител. Инкубировали 1 ч при 37 °C. После трехкратной отмывки лунок ТСБ-Т буфером, проявляли специфическое связывание антител с антивидовыми антителами раствором О-фенилендиамина (1 мг/мл орто-фенилендиамина, 0,03 % перекиси водорода) в цитратно-фосфатном буфере (0,2 М лимонной кислоты, 0,5 М Na₂HPO₄, pH 5,0). Выдерживали планшеты 30 мин в темноте, останавливали реакцию добавлением 100 мкл на лунку 1 N HCl и измеряли оптическую плотность (ОП) образцов на спектрофотометре («Uniscan», Финляндия) при длине волны 492 нм. Положительным считали результат измерения ОП, превышающий в 2 раза таковой для лунки с отрицательным контролем. Для отрицательного контроля связывания антител с антигеном использовали нормальные сыворотки или очищенные иммуноглобулины человека, лошади, мыши, крысы и кролика, а также МКА, специфичные к гетерологичным антигенам.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводили по методу, описанному в ра-

боте с использованием 12–15 % полиакриламидного геля. Окраску гелей проводили при помощи Кумасси G-250. Белки инактивированных ВЭ, ВМ и рекомбинантные белки после электрофореза переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Millipore», США) на аппарате Transpor («LKB», Швеция) в течение 1,5 ч при напряжении 80 В в 0,025 М трис-НСl буфере, содержащем 0,192 М глицина (рН 8,3) и 20 % этанола. Места неспецифического связывания насыщали 0,5 % раствором казеина при 37 °С в течение 2 ч в ТСБ-Т буфере. Затем отдельные полосы мембраны, содержащие вирусные или рекомбинантные белки, инкубировали с очищенными МКА, поликлональными антивирусными антителами или моносыворотками, специфичными к рекомбинантным белкам, 4 ч при 20–22 °С в буфере ТСБ-Т, содержащем 0,25 % казеина. После отмывки в ТСБ-Т буфере мембраны обрабатывали антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена (2 ч при 37 °С). Полоски мембраны промывали ТСБ-Т буфером и проявляли в растворе хромагена (1 мг/мл 3,3 диаминобензидин тетрагидрохлорида в 50 мМ трис-НСl буфере (рН 7,4), содержащем 0,145 М NaCl, 20 % этанола и 0,03 % перекиси водорода).

Результаты и обсуждение

Конструирование гибридных плазмид, несущих полноразмерные гены белков VP40, NP ВЭ и VP40 ВМ. Гены белков VP40 и NP ВЭ получали методом ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров и затем клонировали в составе вектора pQE-30. Последовательность гибридных плазмид pQE30-VP40 и pQE30-NP была подтверждена секвенированием. Полноразмерная копия гена VP40 ВЭ была встроена по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III в плазмиду pQE30-VP40 (рис. 1, А). Ген содержал открытую рамку трансляции, кодирующую белок длиной 338 аминокислотных остатков (а.о.) с полигистидиновым трактом, под контролем промотора фага Т5. Для клонирования гена NP ВЭ соответствующий амплификационный фрагмент ДНК длиной 2253 п.н., также полученный методом ОТ-ПЦР, был встроен аналогично. В результате была получена плазида pQE30-NP (рис. 1, Б), содержащая открытую рамку трансляции, кодирующую белок длиной 751 а.о. с полигистидиновым трактом под контролем промотора фага Т5.

Для получения полноразмерного гена VP40 ВМ была использована плазида pMBG 4-48, несущая кДНК-фрагмент генома штамма Popp с 3863 по 5864 нуклеотид (GenBank Accession No. Z29337). На первом этапе была получена промежуточная плазида p40BX, несущая ген VP40 ВМ, посредством встройки фрагмента *Xba*I/*Bgl*II (длиной 1109 пар оснований (п.о.); с 4550 по 5659 нуклеотид по геномной РНК ВМ) плазмиды pMBG 4-48 по соответствующим сайтам в полилинкер векторной плазмиды pMTL22 в обратной ориентации. Для экспрессии полноразмерного гена VP40 ВМ была сконструирована и получена экспрессирующая плазида pQ31-VP40 (рис. 1, В). Данная плазида была получена методом клониро-

вания фрагмента *Bam*HI/*Bsp*I720I плазмиды p40BX по соответствующим сайтам в pQE-31 (QIAexpress kit type IV (QIAGEN, Cat# 32149). В результате плазмиды pQE31-VP40 ВМ содержала фрагмент кДНК ВМ с 4567 по 5475 нуклеотид по геномной РНК положительной ориентации, который кодировал рекомбинантный полипептид длиной 331 а.о.

Получение и очистка рекомбинантных белков VP40, NP ВЭ и VP40 ВМ. Все полученные конструкции содержали полигистидиновый полипептид (6xHis-tag) в N-концевой части белка, что позволило очищать рекомбинантные белки филовирусов с помощью Ni-хелатной хроматографии (Ni-NTA) согласно протоколу фирмы QIAGEN. Электрофоретическая подвижность рекомбинантного белка VP40 ВЭ соответствовала расчетным данным (37 кДа) и была сравнима с подвижностью нативного вирусного белка (рис. 2, А).

Электрофоретический анализ рекомбинантного полипептида NP ВЭ (рис. 2, А) показал, что расчетная молекулярная масса рекомбинантного белка (85 кДа) не соответствовала электрофоретической подвижности (115 кДа). Это, по всей вероятности, объясняется тем, что две области этого белка, ограниченные аминокислотами 439–492 и 589–739, изменяют подвижность NP ВЭ в полиакриламидном геле на 5 и 15 кДа, соответственно. Ранее было показано, что введение указанных участков аминокислотной последовательности в структуру белка LacZ оказывает подобный эффект на его электрофоретическую подвижность [23].

Клонированный ген VP40 ВМ содержал вставку фрагмента кДНК с 4567 по 5475 нуклеотид и кодиро-

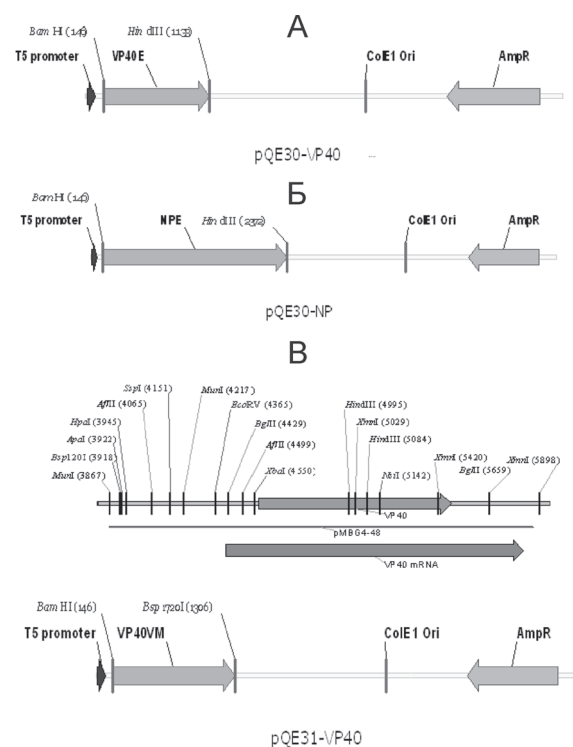


Рис. 1. Схематическое изображение гибридных плазмид:

А – рекомбинантная плазида pQE30-NP ВЭ; Б – рекомбинантная плазида pQE30-VP40 ВЭ; В – рекомбинантная плазида pQE31-VP40 ВМ

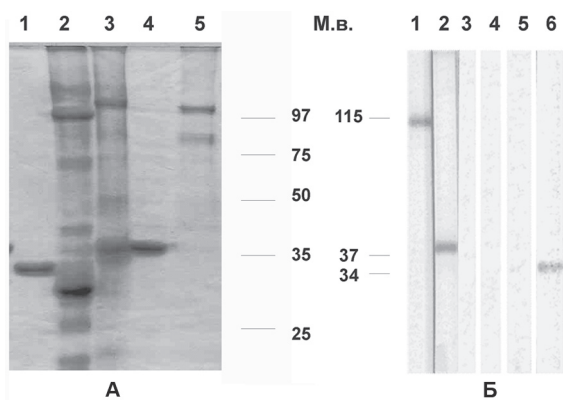


Рис. 2. **А.** Электрофореграмма вирионных белков и очищенных рекомбинантных белков филовирсов. **Б.** Иммуноблот. Взаимодействие филовирсусных вирусных белков с антителами моносывороток, специфичными к рекомбинантным белкам:

А: 1 – рекомбинантный белок VP40 BM (5 мкл); 2 – препарат инактивированного BM (10 мкл); 3 – препарат инактивированного ВЭ (10 мкл); 4 – рекомбинантный белок VP40 ВЭ (5 мкл); 5 – рекомбинантный NP ВЭ (5 мкл). **Б:** 1 – ВЭ обработан антисывороткой к рекомбинантному белку NP ВЭ; 2 – ВЭ обработан антисывороткой к рекомбинантному белку VP40 ВЭ; 3 – лизат рQE обработан антисывороткой к рекомбинантному белку NP ВЭ (отрицательный контроль); 4 – лизат рQE обработан антисывороткой к рекомбинантному белку VP40 ВЭ (отрицательный контроль); 5 – лизат рQE обработан антисывороткой к рекомбинантному белку VP40 BM (отрицательный контроль)

вал рекомбинантный полипептид с расчетной молекулярной массой около 37 кДа. Электрофоретическая подвижность этого рекомбинантного полипептида по результатам электрофореза в 12 % ПААГ соответствовала расчетным данным (рис. 2, А).

Иммунохимическая характеристика полноразмерных рекомбинантных белков VP40, NP ВЭ и VP40 BM. Антигенные и иммуногенные свойства

рекомбинантных белков, полученных в экспрессионной системе *E. coli*, исследовали методами иммуноблоттинга и ТИФА. Данные иммуноблоттинга (рис. 2, Б) показывают, что антитела моносывороток, специфичные к рекомбинантным белкам, выявляют соответствующие им белки-аналоги в инактивированных вирусных препаратах. Это свидетельствует о подобии конформационно-независимых эпитопов на рекомбинантных и природных белках VP40, NP ВЭ и VP40 BM.

Исследование рекомбинантных белков VP40 и NP ВЭ было проведено с помощью панели противовирусных поликлональных и моноклональных антител методом ТИФА (таблица). Эти рекомбинантные белки эффективно взаимодействовали с антителами, специфичными к инактивированному ВЭ (гибридомными МКА, антителами сывороток иммунизированных мышей, кроликов) и IgG-лошадь-ВЭ. Кроме того, было показано, что специфические антитела не выявили антигенного перекреста между рекомбинантными белками, как это было обнаружено при использовании инактивированных вирусных препаратов в качестве антигенов в ТИФА.

Ранее, нами методом иммуноблоттинга было выявлено, что в сыворотке человека, переболевшего лихорадкой Марбург, в основном преобладают антитела против белков NP, VP40 и VP35 [3]. В данной работе показано, что рекомбинантный белок VP40 BM эффективно взаимодействует в ТИФА с антителами сывороток мышей и кроликов, иммунизированных инактивированным BM, с гибридными МКА, специфичными к белку VP40 инактивированного BM; антителами переболевшего лихорадкой Марбург человека и IgG-лошадь-BM (таблица).

Анализ специфичности рекомбинантных белков филовирсов

Антитела	Иммуноген	Концентрация белка, мг/мл	Белки-мишени в иммуноблоте	Титр антител (обратные величины)					
				ВЭ	VP40 ВЭ	NP ВЭ	BM	VP40 BM	pQE
IgG лошади	ВЭ	90	NP*, VP40*, VP35*	656100	656100	656100	24300**	<100	<100
АС кролика	ВЭ	90	NP*, VP40*, VP35*, VP30, VP24	218700	218700	656100	2700**	<100	<100
АС мыши	ВЭ	90	NP*, VP40*, P35*, VP30, VP24	218700	218700	218700	2700**	<100	<100
АС мыши	VP40-ВЭ	90	VP40	656100	1968300	<100	<100	<100	<100
АС мыши	NP-ВЭ	90	NP	656100	<100	1968300	<100	<100	<100
МКА 1Е5	ВЭ	6,3	NP	218700	<100	243000	<100	<100	<100
МКА 1В5	ВЭ	5,7	VP40	72900	656100	<100	<100	<100	<100
АСчеловека	BM	50	NP*, VP35*, P40*, VP30, VP24, GP	900**	<100	<100	24300	8100	<100
IgG лошади	BM	90	GP, NP*, VP35*, VP40*, VP30	2700**	<100	<100	218700	72900	<100
АС кролика	BM	18,5	NP*, VP35*, VP24, VP40*, VP30,	<100	<100	<100	24300	24300	<100
АС мыши	BM	50	NP*, VP35*, P40*, VP30, VP24, GP	300**	<100	<100	24300	24300	<100
АС мыши	VP40 BM	14	VP40	<100	<100	<100	72900	1968300	<100
МКА 7Н10	BM	8	VP40	<100	<100	<100	729000	729000	<100
Отрицательный контроль				<100	<100	<100	<100	<100	<100

Примечания: Концентрация антигенов 100 нг/лунка; АС – антисыворотки животных, иммунизированных инактивированными вирусными препаратами; АС-человека – сыворотка переболевшего лихорадкой Марбург [7], мг/мл – концентрация препаратов МКА, очищенных из 1 мл асцитной жидкости; * – мажорные полосы, выявляемые в вирусном препарате методом иммуноблоттинга; ** – перекрестное взаимодействие поликлональных антител с гетерологичными вирусными препаратами: [pQE] – клеточный лизат *E. coli* – JM103 (отрицательный контроль для рекомбинантных белков). Проводили обработку (истощение) исследуемых моноспецифических сывороток, специфичных к рекомбинантным белкам, в присутствии 1 % раствора лизата *E. coli* клеток 20 минут при 37 °С; в качестве отрицательного контроля использовали нормальные сыворотки человека (5 сывороток), лошади (1 сыворотка), мыши (5 сывороток). IgG лошади очищены методом спиртового фракционирования на холоду по Кону. МКА, АС кролика-BM и АС мыши к рекомбинантному белку VP40 BM очищены каприловой кислотой.

Таким образом, полученные нами в экспрессионной системе *E. coli* полноразмерные рекомбинантные белки VP40 ВЭ, NP ВЭ и VP40 ВМ содержат конформационно-независимые эпитопы, которые эффективно распознаются в иммуноблоттинге и ТИФА как противовирусными антителами поликлональных сывороток, так и МКА, специфичными к индивидуальным вирусным белкам. Иммунологическое тестирование рекомбинантных белков показывает возможность их использования при конструировании лабораторных тест-систем для диагностики филовиральных инфекций. Идентичность антигенной структуры также позволяет использовать рекомбинантные белки в качестве кандидатных вакцин против филовиральных заболеваний.

В дальнейшем мы планируем проведение более детального картирования эпитопов рекомбинантных белков с помощью панели МКА, делеционных вариантов этих белков, а также перекрывающихся пептидов. Это позволит выявить иммунодоминантные эпитопы на полноразмерных белках VP40 ВЭ, NP ВЭ и VP40 ВМ.

Работа выполнена при финансировании грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-387.2008.4 (руководитель – член-корр. РАН, д.б.н., профессор С.В.Нетесов). Авторы работы благодарят д.б.н. А.А.Чепурнову за любезно предоставленный инактивированный ВЭ и сыворотку иммунизированного ВЭ кролика и к.м.н. Е.Ф.Беланова за препарат инактивированного ВМ и сыворотку человека, переболевшего геморрагической лихорадкой Марбург.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисевич И.В., Михайлов В.В., Краснянский В.П., Градобоев В.Н., Лебединская Е.В., Потрываева Н.В., Тиманькова Г.Д. Разработка и изучение свойств иммуноглобулина против лихорадки Эбола. *Вопр. вирусол.* 1996; 6(41):270–3.
2. Букреев А.А., Скрипченко А.А., Гусев Ю.М., Фролов В.Г., Кандрушин Е.В., Красницкая И.М. и др. Перспективный метод препаративной наработки и очистки вируса Марбург. *Вопр. вирусол.* 1995; 4:161–5.
3. Казачинская Е.И., Иванова А.В., Сорокин А.В., Качко А.В., Субботина Е.Л., Разумов И.А., Локтев В.Б. Моноклональные антитела и рекомбинантные белки филовиралов. Иммунохимические свойства и оценка возможности их использования для иммунодиагностики. *Медицинская иммунология.* 2010; 12(3):177–90.
4. Никифоров В.В., Туровской Ю.И., Калинин П.П., Акинфеева Л.А., Каткова Л.Р., Бармин В.С. и др. Случай лабораторного заражения лихорадкой Марбург. *Микробиология.* 1994; 3:104–10.
5. Чепурнов А.А., Мерзликин Н.В., Рябчикова Е.И., Чепурнова Т.С., Волчков В.Е., Истомина Н.И. и др. Получение очищенного вируса Эбола. *Вопр. вирусол.* 1994; 6:254–7.
6. Чепурнов А.А., Мерзликин Н.В., Чепурнова Т.С., Воробьева М.С. Получение кроличьих антисывороток к вирусу Эбола. *Вопр. вирусол.* 1994; 6(39):286–8.
7. Becker S., Feldmann H., Will C., Slenczka W.E. Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide. *J Med Microbiol.* 1992; 181:43–55.
8. Bukreyev A.A., Volchkov V.E., Blinov V.M., Netesov S.V. The complete nucleotide sequence of the Popp (1967) strain of Marburg virus: a comparison with the Musoke (1980) strain. *Arch. Virol.* 1995; 140:1589–90.
9. Elliott L.H., Kiley M.P., McCormick J.B. Descriptive analysis of Ebola virus protein. *Virology.* 1985; 147:169–76.
10. Feldmann H., Geisbert T.W., Jahring P.B., Klenk H.D., Netesov S.V., Peters C.J. *Filoviridae*. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., editors. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of*

- Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press; 2004. P. 645–53.
11. Ikegami T., Niikura M., Saijo M., Miranda A.B., Calaor M., Hernandez D.L. Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):552–7.
12. Jonathan S., Towner, Tara K. et al. Newly Discovered Ebola Virus Associated with Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008; 4(11):e1000212.
13. Kalstrom G., Warfield K.L., Swenson D.L., Shannon M., Panchal R., Ruthel G. et al. Analysis of Ebola virus and VLP release using an immunocapture assay. *J. Virol. Meth.* 2005; 127(1): 1–9.
14. Leroy E.M., Souquière S., Rouquet P., Drevet D. Re-emergence of ebola haemorrhagic fever in Gabon. *Lancet.* 2002; 359(9307):712.
15. Licata J.M., Johnson R.F., Han Z., Harty R.N. Contribution of Ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *Virology.* 2004; 78(14):7344–51.
16. Muhlberger E., Lotfering B., Klenk H.-D., Becker S. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J. Virol.* 1998; 72(11):8756–84.
17. Noda T., Watanabe S., Sagara H., Kawaoka Y. Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus. *J. Virol.* 2007; 81(7):3554–62.
18. Ruigrok R.W., Schoehn G., Dessen A., Forest E., Volchkov V., Dolnik O. et al. Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J. Mol. Biol.* 2000; 300:103–12.
19. Saijo M., Niikura M., Morikawa S., Ksiazek T.G., Meyer R.F., Peters C.J. et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(1):1–7.
20. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12):5463.
21. Swenson D., Wang D., Luo M., Warfield K.L., Woraratanadham J., Holman D.H. et al. Complete protection of nonhuman primates against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2008; 15(3):460–7.
22. Towner J.S., Khristova M.L., Sealy T.K., Vinscent M.J., Erickson B.R., Bawiec D.A. et al. Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J. Virol.* 2006; 80(13):6497–516.
23. Watanabe S., Noda T., Kawaoka Y. Functional mapping of nucleoprotein of Ebola virus. *J. Virol.* 2006; 80(8):3743–51.

A.V.Ivanova, E.I.Kazachinskaya, A.V.Kachko, E.L.Subbotina,
A.V.Sorokin, I.A.Razumov, S.V.Neteosov, V.B.Loktev

Obtaining and Immunologic Characterization of Filoviruses Recombinant Proteins VP40 and NP

State Scientific Center for Virology and Biotechnology, Koltsovo;
Novosibirsk State University

Full-size genes coding matrix proteins VP40 of Ebola virus (VE) and Marburg virus (VM) and nucleoprotein (NP) of VE were cloned. These genes expression in *Escherichia coli* and purification of their products by affinity chromatography using Ni-NTA agarose permitted to obtain full-size recombinant VP40 and NP proteins of filoviruses. Immunological studies showed the recombinant polypeptides to possess antigenic properties similar to those of the native viral proteins. These proteins can be used for constructing of experimental vaccines against filoviruses and improving immunodiagnostic tests against filoviral infections.

Key words: Marburg virus (MV), Ebola virus (EV), recombinant proteins.

Об авторах:

Иванова А.В., Казачинская Е.И., Качко А.В., Субботина Е.Л., Сорокин А.В., Разумов И.А., Локтев В.Б. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., р/п Кольцово. E-mail: ali@vector.nsc.ru
Нетеосов С.В. Новосибирский Государственный университет. Новосибирск. E-mail: nauka@nsu.ru

Authors:

Ivanova A.V., Kazachinskaya E.I., Kachko A.V., Subbotina E.L., Sorokin A.V., Razumov I.A., Loktev V.B. State Scientific Center for Virology and Biotechnology. 630559, Novosibirsk Region, Koltsovo E-mail: ali@vector.nsc.ru
Neteosov S.V. Novosibirsk State University. Novosibirsk. E-mail: nauka@nsu.ru

Поступила 19.08.10.