

В.Ф. ПУЗЫРЕВ, И.Н. ДРЕВЦОВА, А.Н. БУРКОВ, Т.И. УЛАНОВА

ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы»,
Нижний Новгород

ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО HBcore АНТИГЕНА, ЭКСПРЕССИРОВАННОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЕКТОРА pLEX В КЛЕТКАХ ESCHERICHIA COLI, ДЛЯ СОЗДАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ТЕСТА

Получена плазмидная конструкция, экспрессирующая рекомбинантный HBcAg в клетках *Escherichia coli* под контролем P_L промотора фага лямбда. Проведена проверка специфической активности полученного антигена методом ИФА и его сравнение с референс-системой «AxSYM CORE assay» («ABBOTT», США) с использованием четырех панелей сывороток (всего 111 образцов). Совпадение результатов испытуемой тест-системы с референс составило 96,4%, что позволяет рекомендовать данную генетическую конструкцию рекомбинантного core-антигена для использования в производстве ИФА-тест-систем.

Ключевые слова: *вирус гепатита В, HBc антиген, клонирование, экспрессия, иммуноферментный анализ*

The plasmid construction expressing recombinant HBc antigen (HBcAg) in *Escherichia coli* cells under the control of the P_L promoter of phage I, was obtained. The specific activity of the antigen thus obtained was controlled by the enzyme immunoassay (EIA) method and compared with the reference system "AxSYM CORE assay" ("Abbott", USA) with four panels of sera (altogether 111 samples). The coincidence of the results of the compared test system with the reference was 96.4%, which made it possible to recommend this genetic construction of recombinant HBcAg for the production of EIA systems

Key words: *hepatitis B virus, HBc antigen, cloning, expression, immunoassay*

Введение. Вирус гепатита В является одним из самых распространенных и опасных для человека инфекционных агентов, передающихся парентеральным путем. Он может вызывать патологию печени, приводящую к смертельным исходам [2,3]. ВГВ отличается исключительно высокой инфекционностью, вирулентностью и устойчивостью в условиях окружающей среды, что приводит к более высокой частоте его передачи по сравнению с ВИЧ и ВГС. Наличие большого количества бессимптомных носителей диктует необходимость совершенствования диагностики и профилактики вирусного гепатита В. Нативный вирус содержит наружную липопротеиновую оболочку и внутренний нуклеокапсид, состоящий из двунитевой ДНК (3,2 Кб), обратной транскриптазы и белка, образующего капсид (так называемого core-антигена ВГВ) [2, 8]. Core-антиген обладает высокой иммуногенностью и, следовательно, высокой диагностической значимостью [1,6]. HBcAg обнаруживается только в ядрах гепатоцитов, поэтому в клинической практике его наличие подтверждается диагностированием в крови анти-HBc антител [3]. Анти-HBc присутствуют фактически во всех сыворотках острых и хронически инфицированных больных.

Наиболее удобным высокоспецифичным и чувствительным методом их обнаружения является иммуноферментный анализ. Для производства иммуноферментных анти-HBc диагностикумов необходимо наличие иммунологически активного препарата HBc-антигена. Трудности его выделения из природных изолятов определяют значимость получения HBcAg генноинженерным путем [4, 5].

Целью данной работы было создание новой конструкции рекомбинантного HBc-антигена и оценка ее активности при помощи иммуноферментного анализа.

Материалы и методы.

Для конструирования рекомбинантных плазмид последовательность, кодирующая ген HBc-антигена, была получена с помощью ПЦР. В качестве матрицы для синтеза HBc-антигена была использована плаزمида pHBw3-3, содержащая полный геном вируса гепатита В (HBsAg субтипа adw2), любезно предоставленная др. J. Yokosawa (CDC, Atlanta, USA). В качестве праймеров использовались 2 синтетических олигонуклеотида (рис.).

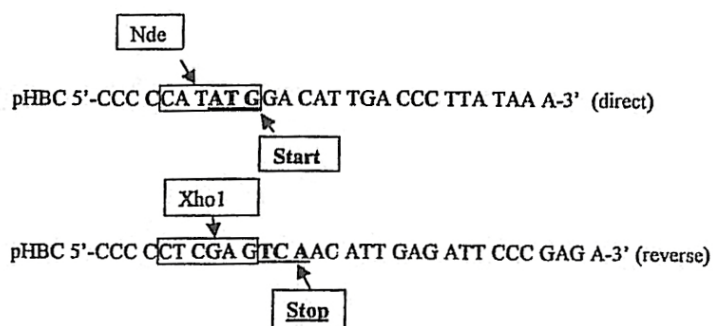


Рис. Дизайн праймеров для синтеза последовательности, кодирующий core-антиген вируса гепатита В

Реакция ПЦР была проведена в следующих условиях: 94°C, 45 сек; 50°C, 20 сек; 72°C, 1 мин. в течение 25 циклов, а затем пробы выдерживались 7 мин. при 72°C для полного завершения начатого синтеза.

В качестве вектора для экспрессии был использован вектор pLEX (Invitrogen). Вектор и PCR фрагмент, содержащий последовательность HBcAg, были обработаны рестриктазами Nde I и XhoI и лигированы с помощью Rapid DNA Ligation Kit (Roche). Клонированные в этот вектор гены находятся под регуляцией триптофан индуцибельной экспрессионной системы, использующей сильный PL промотор фага λ.

Получение рекомбинантных клеток и трансформация были проведены по стандартному протоколу, описанному в прилагаемом руководстве фирмы Invitrogen. Полученные клоны проанализированы при помощи ПЦР.

Свежая ночная культура *E.coli* pHBV7 с отобранной рекомбинантной плазмидой была разведена в 100 раз RM средой (Invitrogen), содержащей 100 мг/мл ампициллина, и подращивалась при 37°C на шейкерном инкубаторе до OD550=0.55-0.65. Индукция осуществлялась добавлением триптофана в конечной концентрации 100 мкг/мл. После этого клетки подращивались при температуре 37°C в течение 3-х часов. Уровень экспрессии анализировали визуально в SDS-PAGE. После этого клетки собирались центрифугированием с ускорением 4000 x g при 4°C в течение 20 мин. Осадок использовали незамедлительно или хранили при -70°C.

Для очистки биомассу ресуспендировали в 5-кратном объеме буфера: Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 100mM, EDTA 1mM и PMSF 50mM. Дезинтеграцию биомассы проводили ультразвуком на льду, 8-10 циклов по 20 сек с интервалами по 3 мин. между циклами. Дезинтеграт центрифугировали при 4°C в течение 30мин при 10 тыс об./мин, затем супернатант насыщали 35% сульфата аммония при постоянном перемешивании и оставляли на ночь при температуре 4°C. Образовавшийся после центрифугирования осадок трижды экстрагировали 10-кратным объемом буфера БКБ 50 mM, pH 9,6, в течение 1 часа при комнатной температуре. Полученные супернатанты диализовали в течение ночи в буфере следующего состава: Tris-HCl 20mM pH 7.8, NaCl 100 mM, EDTA 1mM. После диализа препарат центрифугировали в течение 20 мин. при скорости 10 тыс об./мин.

Для тестирования HBc-антигена были использованы 3 Performance панели сывороток (65 сывороток) производства Boston Biomedical Incorporation (BBI, USA). Панель рHE 102 состояла из 15 образцов, содержащих анти-HBc IgM в низком титре; панель рHE201 - из 25 образцов, содержащих анти-HBsAg в разных титрах. Панель рHE202 – из 25 образцов, содержащих анти-HBc IgM в разных титрах.

Также была использована коллекция сывороток НПО “ДС” (Н. Новгород) (46 образцов). В качестве референс тест-системы использован ИФА-диагностикум фирмы «АВБОТТ» (США) для определения суммарных анти-HBc - «АхSYM CORE assay», в основе которого лежит конкурентный метод ИФА.

Антитела к HBcAg в экспериментальной тест-системе определяли методом конкурентного ИФА. При этом 50 мкл цельной сыворотки вносили в лунки планшета (Nunc PolySorb) с сорбированным рекомбинантным HBcAg, добавляли 50 мкл р-ра конъюгата (человеческие антитела к HBcAg, меченные пероксидазой хрена) и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. После 4-кратной отмывки планшета фосфатно-солевым буферным раствором с твином в лунки вносили по 100 мкл субстратного раствора для пероксидазы хрена, после чего инкубировали планшеты в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл стоп-реагента (2М р-р серной кислоты), оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при 492 нм.

Результаты.

Полученная рекомбинантная плазида позволяет осуществлять синтез HBc-антигена (1-185aa) под контролем PL промотора фага λ. Эспрессия с PL промотора контролируется сI репрессором. Для трансформации использовали штамм *E.coli* GI1724, содержащий сI репрессор, встроенный в бактериальную хромосому под контролем trp промотора. Эспрессия гена регулируется добавлением в питательную среду триптофана. Эта система используется для синтеза потенциально токсичных для *E.coli* белков. Кроме того PL промотор фага λ обеспечивает высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков. Выделение частиц HBc-антигена из клеточного лизата осуществляли методом преципитации сульфатом аммония.

Иммунологическая активность полученного рекомбинантного антигена проверялась методом ИФА с использованием четырех панелей сывороток (всего 111 образцов). В качестве референс-теста была использована тест-система «АхSYM CORE assay» («АВБОТТ», США).

В результате тестирования панельных образцов на присутствие анти-HBc при помощи референс-тест-системы, среди 111 образцов 19 (17,1%) были идентифицированы как не содержащие антитела к кор-антигену вируса гепатита В, 92 образца (82,9%) - как положительные на анти-HBc.

Затем была проведена проверка анти-HBc-активности панельных сывороток с использованием полученного нами рекомбинантного HBcAg. Из 111 сывороток панелей анти-HBc-положительными оказались 93 (83,8%), а отрицательными – 18 (16,2%) образцов.

Таблица 1.

Результаты сравнения двух тестов для выявления анти-HBc в образцах сывороток крови.

Панели сывороток	Иммуноферментный тест			
	АВБОТТ АхSYM CORE		Эксперим. тест-система «Diagnostic Systems» ИФА-анти-HBc	
	pos	neg	pos	neg

pHE102, n=15 (BBI)	14	1	14	1
pHE201, n=25 (BBI)	25	0	25	0
pHE202, n=25 (BBI)	24	1	24	1
Коллекция НПО «ДС», n=46	29	17	30	16
Суммарный результат	92	19	93	18

Как видно из представленных в табл. 1 данных, экспериментальная тест-система с использованием новой конструкции рекомбинантного HBsAg показала полное соответствие результатам референс-тест-системы фирмы «АВВОТТ» на панелях сывороток производства BBI (Boston Biomedical Inc.). При тестировании коллекции сывороток ООО «НПО «Диагностические системы» количество совпадений результатов реакций в сравниваемых тест-системах составило 42 (91,3%) из 46.

При этом как анти-НВс-положительные в «AxSYM assay» прореагировали 29 (63,0%) сывороток, а в экспериментальной тест-системе - 30 (65,2%). 17 (37,0%) сывороток оказались отрицательными по анти-НВс в системе «АВВОТТ», в экспериментальной тест-системе как отрицательные прореагировали 16 (34,8%) образцов.

Сыворотки коллекции НПО «ДС» были проверены также на наличие HBsAg («ИФА-НВсAg»), ООО «НПО «Диагностические системы», Н.Новгород) и анти-НВе («АВВОТТ НВе (rDNA) EIA»). По результатам этих тестов, из 46 сывороток 20 (43,5%) оказались положительными как на HBsAg так и на анти-НВе, 2 (4,3%) сыворотки содержали только анти-НВе, а 6 (13,1%) - только HBsAg. Отрицательными по обоим маркерам были 18 (39,1%) сывороток. Сыворотки, по которым обнаружилось расхождение между двумя диагностикумами на анти-НВс (3 образца), были проверены также на наличие анти-НВс-IgM в тест-системе «ИФА-анти-НВс-IgM» (ООО «НПО «Диагностические системы», Н.Новгород). Из трех сывороток анти-НВс-IgM- положительной оказалась только одна, содержащая также HBsAg и анти-НВе.

Обсуждение.

Использование для клонирования вектора pLEX (Invitrogen, USA) позволило производить рекомбинантный HBsAg-антиген в клетках *E. coli* в достаточно больших количествах, а разработанная методика очистки исключала существенные затраты (выход белка составил 17,5 мг на 1г биомассы).

Сравнение результатов тестирования нашей конструкции HBsAg-антигена и тест-системы «AxSYM assay» показало 96,4 % совпадений (табл.1). При этом результаты, полученные на панелях сывороток производства BBI, совпали полностью.

Из 46 (100%) сывороток коллекции НПО «ДС» 2 (4,3%) были отрицательными в тест-системе «AxSYM assay», но положительными в тест-системе ООО «НПО «Диагностические системы», и одна наоборот - положительной в тест-системе «AxSYM assay», но отрицательной в тест-системе НПО «ДС» (табл. 2).

Таблица 2.

Результаты несовпадений между «AxSYM assay» (АВВОТТ, США) и Экспериментальной тест-системой (ООО «НПО «Диагностические системы») при выявлении анти-НВс в образцах сывороток крови коллекции НПО «Диагностические системы».

	Выявление анти-НВс: «AxSIM assay» / Эксперим. тест-система			
	++ / +	++ / -	-- / +	-- / -
Общее количество сывороток в данной группе	228	11	22	115
Сыворотки отрицательные на HBsAg и анти-НВе	33	11	11	113

Из 2 сывороток, отрицательных в “AxSYM assay”, одна не содержала других маркеров гепатита В. Во второй детектировались как антитела к НВеAg, так и HBsAg, кроме того, в ней обнаруживались антитела класса М к HBcAg. В сыворотке, положительной только в экспериментальной системе, другие маркеры гепатита В не определялись.

В результате мы обнаружили две сыворотки, отрицательные по HBsAg, анти-НВе и анти-НВс-IgM, одна из которых анти-НВс-положительная в “AxSYM assay”, другая – в экспериментальном диагностикуме. Данные сыворотки могут быть как ложноположительными, так и сыворотками от индивидов, переболевших гепатитом В в прошлом. Не исключено, что эти расхождения могут быть обусловлены различиями в первичной или четвертичной структурах рекомбинантных антигенов, использованных для сенсibilизации твердой фазы. Кроме того, известно, что анти-НВс антитела являются единственным детектируемым маркером в течение «окна» когда HBs антиген исчез, а анти-НВс еще не продуцируются [7].

Таким образом, наши исследования подтверждают перспективность использования новой конструкции рекомбинантного НВс-антигена в иммуноферментных диагностикумах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bichko V., Schodel F., Nassal M. et al. Epitopes recognized by antibodies to denatured core protein of hepatitis B virus. *J. Mol. Immunol.* 1993, 30(3): 221-231.
2. Conway J. F., Cheng N., Zlotnick A. et al. Hepatitis B Virus Capsid: Localization of the Putative Immunodominant Loop (Residues 78 to 83) on the Capsid Surface, and Implications for the Distinction between c and e-Antigens. *J. Mol. Biol.* 1998, 279: 1111-1121.
3. Jing-Hsiung Ou. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *Journal of Gastroenterol. and hepatol.* 1997, 12 (Suppl.): 178 –187.
4. Maassen A., Rehfeldt A., Kiessing S. et al. Comparison of three different recombinant hepatitis B virus core particles expressed in *Escherichia coli*. *J. Arch. Virol.* 1994, 135(1-2): 131-142.
5. Naito M., Ishii K., Nakamura Y. et al. Simple method for efficient production of hepatitis B virus core antigen in *E.coli*. *J. Res. Virol.* 1997, 148(4): 299-305.
6. Pushko P., Sallberg M., Borisova G. et al. Identification of hepatitis B virus core protein regions exposed 01 internalized at the surface of HBcAg particles by scanning with monoclonal antibodies. *J. Virology.* 1994, 202(2): 912-920.
7. Tordjeman M., Fontan G., Rabillon V. et al. Characterization of minor and major antigenic regions within the hepatitis B virus nucleocapsid. *J. Med Virol.* 1993, 41(3): 221-229.
8. Zlotnick A., Cheng N., Stahl S.J. et al. Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: Implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *J. Biochemistry. - Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997, 94 (18): 9556-9561.

Опубликовано: Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2004. - №6. - С. -76-80