

УДК 615.371:578.833.25].012.6076.9

ОЧИСТКА НЕСТРУКТУРНОГО ПРОТЕИНА NS1 ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ИЗ НЕИНФЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

Ю. В. Кузьменко
С. Ф. Берестень
Е. С. Стародубова
А. В. Тимофеев
В. Л. Карпов

Институт молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

E-mail: Kuzmenko-Yulia@mail.ru

Используя сочетание методов разделения протеинов: гель-фильтрацию, быструю жидкостную хроматографию и многократную ультрафильтрацию, провели очистку неструктурного протеина NS1 вируса клещевого энцефалита из культуральной жидкости клеток эукариот, трансфицированных бактериальной плазмидой, несущей полноразмерный ген протеина NS1. В результате был получен препарат неструктурного протеина NS1 в нативной форме, которая представляет собой гексамер. Предложенный способ получения протеина NS1 из культуральной жидкости трансфицированных клеток эукариот полностью исключает инфекционную опасность. Полученный высокоочищенный продукт может быть использован при создании современных тест-систем для диагностики клещевого энцефалита.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, неструктурный протеин NS1.

Клещевой энцефалит (КЭ) — природно-очаговое заболевание, вызываемое вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) рода флавивирусов. Высокий риск инфицирования, широкое распространение и тяжесть заболевания делают КЭ одной из самых актуальных природно-очаговых вирусных инфекций в России и странах Восточной Европы [1, 2].

ВКЭ содержит одноцепочечную геномную РНК положительной полярности, которая кодирует 3 структурных и 7 неструктурных протеинов. К основным иммуногенам ВКЭ относятся протеин вирусной оболочки Е и неструктурный протеин NS1. Протеины Е и NS1 представляют собой гликопротеины с молекулярной массой 55 и 47 кДа соответственно.

Для выявления инфицирования вирусом и установления диагноза клещевого энцефалита используют лабораторные методы иммуноэнзимного анализа антигенов ВКЭ с антителами к ним. В качестве антигена обычно применяют оболочечный протеин Е вируса КЭ.

К настоящему времени установлено, что в случае преобладающей лихорадочной формы заболевания и на лихорадочной фазе двухволнового менингоэнцефалита в сыворотках пациентов антитела к протеину Е от-

сутствуют, но при этом достоверно выявляют антитела к другому протеину вируса — NS1 [3, 4]. Поэтому важной задачей профилактики и диагностики этого заболевания является разработка эффективных и безопасных способов получения вирусного иммуногена методами генной инженерии с последующим использованием полученного протеина в качестве диагностических тест-систем, базирующихся на протеине NS1 в качестве антигена.

Из литературы известны методики выделения внеклеточной формы неструктурного протеина NS1 только из материала, зараженного вирусом. Так, описано много работ по выделению из культуральной жидкости внеклеточной формы неструктурного протеина NS1 различных флавивирусов: вируса Денги, вируса Западного Нила и т. д. В основном они посвящены иммуноаффинной хроматографии культуральной жидкости зараженных вирусом клеток бакуловирусов (Sf9) [5, 6] или клеток эукариот Vero [7].

Для неструктурного протеина NS1 ВКЭ существуют методики выделения методом аффинной хроматографии с иммобилизованными моноклональными антителами

к протеину NS1 из супернатантов зараженных вирусом клеток PS [8, 9] или инфицированных клеток СПЭВ [10]. Кроме того, были предприняты попытки выделения бактериального внутриклеточного негликозилированного аналога протеина NS1 ВКЭ из клеток *E. coli* [11, 12]. До настоящего времени выделение секретлируемой формы неструктурного протеина NS1 ВКЭ в нативной форме из неинфекционного материала не проводили.

В основе нашей работы лежит метод очистки внеклеточной формы неструктурного протеина NS1 колоночной хроматографией в сочетании с мембранной фильтрацией, который был разработан Crooks и др. для выделения протеина из культуральной жидкости инфицированных клеток [13].

Мы применили сочетание методов гель-фильтрации [13] и быстрой жидкостной хроматографии для выделения внеклеточной формы неструктурного протеина NS1 ВКЭ с использованием бактериальной плазмиды, несущей полноразмерный ген протеина NS1. В результате был получен препарат протеина NS1 в нативном состоянии. Преимуществом разработанного метода выделения является отсутствие вирусных частиц в полученном препарате и исключение инфекционной опасности в работе. Полученный высокоочищенный продукт может быть использован при создании современных диагностикомов для клещевого энцефалита.

Материалы и методы

Плазмиды. Для клонирования использовали вектор pUC19 (Novagen, Германия). Плаزمида pSG65NS1, несущая ген протеина NS1 Западного субтипа, включающий лидерную последовательность, была предоставлена профессором А. Д. Альштейном (ИБГ РАН, Россия).

Культивирование и трансфекция культуры клеток. Клетки линии НЕК293Т (АТСС), эпителиоподобные клетки почки эмбриона человека, трансформированные ДНК аденовируса типа 5, культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% синтетического аналога сыворотки (САС) («ПанЭко», Россия) и 100 мкг/мл смеси пенициллина и стрептомицина. За день до трансфекции клетки рассевали на чашки Петри (10 см). Трансфекцию проводили с помощью липосомного реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

Конструкция экспрессионной плазмиды. В качестве эукариотического вектора была использована плаزمида pUC серии, которая несет аденовирусную экспрессирующую кассету, содержащую промотор и терминатор сверххранного гена аденовируса 5-го типа. Полноразмерный ген NS1 вируса КЭ Западного типа получали рестрикцией по сайтам *XbaI* транзиторной плазмиды pSG65NS1. Далее рестрикционный фрагмент клонировали в экспрессионный вектор по сайту *XbaI* и получали рекомбинантную плазмиду pLdNS1. Ориентацию вставки проверяли рестрикцией по сайтам *XhoI/SpHI*. Нуклеотидную последовательность клонированных фрагментов подтверждали секвенированием участка встройки в ЦКП «Геном» ИМБ РАН.

Приготовление клеточных лизатов и концентрирование культуральной жидкости. Через 48 ч после трансфекции культуральные жидкости собирали, клетки промывали PBS, соскребали и лизировали в буфере Лэммли для нанесения протеинов. Культуральную жидкость осветляли центрифугированием на центрифуге Eppendorf при 3 500 об/мин в течение 10 мин. Полученный препарат клеточных сред концентрировали до конечного объема 10 мл центрифугированием при 5 000 об/мин в течение 30 мин, используя концентраторы Vivaspin 20 (Sartorius stedim, Германия) с мембраной, пропускающей протеины с молекулярной массой свыше 30 кДа. Концентрированную среду в количестве 20 мкл смешивали с буфером Лэммли для нанесения протеинов и анализировали в 10%-м ПААГ в присутствии SDS. Некоторые пробы подвергали кипячению в течение 10 мин.

Гель-хроматография. Концентрированный супернатант разделяли на колонке с Сефакрилом S-300 (GE Healthcare, Швеция). Собирали фракции объемом 2 мл и оценивали общее содержание протеина в пробе по поглощению при длине волны 280 нм. Наличие протеина NS1 в пробе подтверждали иммуноблотингом.

Иммуноблотинг. Протеины, разделенные в 10%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) с помощью электропереноса в буфере (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 0,037% SDS, 10%-й этанол) при силе тока 1–1,5 мА на мембраны 1 см² в течение 2 ч. Для блокирования неспецифического связывания блоты инкубировали в течение ночи при 4 °С в блокирующем буфере (80 мМ Na₂HPO₄, 20 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl, 0,1% Твин-20), содержащем 5%-е обезжиренное молоко. Связывание ан-

тител проводили в буфере для блокирования неспецифического связывания в течение 1 ч при комнатной температуре и покачивании. Для выявления протеина NS1 мембраны последовательно инкубировали с сывороткой мышей, иммунизированной плазмидой pLdNS1, любезно предоставленной д. б. н. Г. Г. Каргановой (Ин-т полиомелита и вирусных энцефалитов РАМН), в разведении 1:100 и затем с вторичными антителами против IgG мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson, США), в разведении 1:5 000. В конечном препарате протеин NS1 выявляли коммерческими моноклональными антителами против неструктурного протеина NS1 ВКЭ («Биосан», Россия), в разведении 1:10 000. Для определения содержания примесей в конечном препарате протеина проводили вторичное окрашивание мембраны антителами к протеинам сыворотки крови крупного рогатого скота (СПбНИИВС, Россия) и вторичными антителами против IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson, США), в разведении 1:5 000. Иммуные комплексы на мембране выявляли с помощью флуоресцентной системы детекции ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Великобритания) и рентгеновской пленки (FujiFilm, Япония). Пленку сканировали и данные обрабатывали в программе ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Хроматография FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Процесс хроматографии осуществляли с помощью прибора АКТА FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Разделение проводили на колонке с Superdex 200 10/300 EL (GE Healthcare, Швеция). Собирали фракции объемом 1 мл. Наличие протеина NS1 в пробе определяли иммуноблотингом.

Результаты и обсуждение

Экспрессия в эукариотических клетках

Неструктурный протеин NS1 ВКЭ представляет собой полипептид с молекулярной массой 46–51 кДа, который в значительной степени гликозилирован, особенно в секретрируемой форме. Внутриклеточной формой протеина является его димер, в то время как вне клетки протеин в основном накапливается в виде высокомолекулярного комплекса (около 300 кДа) в гексамерной форме [13]. Известно, что внеклеточный протеин NS1 служит сильным иммуногеном. Кроме того, объем секретрируемого протеина в несколько раз превышает его содержание внутри клет-

ки [12]. Поэтому проводили выделение и очистку секретрируемой формы протеина NS1.

В нашей работе в качестве системы для экспрессии протеина были использованы клетки линии HEK293T. Клетки трансфицировали плазмидой pLdNS1, кодирующей протеин NS1, содержащий лидерную последовательность для направления в эндоплазматический ретикулум. Через 48 ч после трансфекции клеточный экстракт и сконцентрированную в 10 раз культуральную жидкость фракционировали в 10%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с предварительным прогревом проб либо без него. Анализ накопления протеина NS1 в пробе определяли иммуноблотингом (рис. 1).

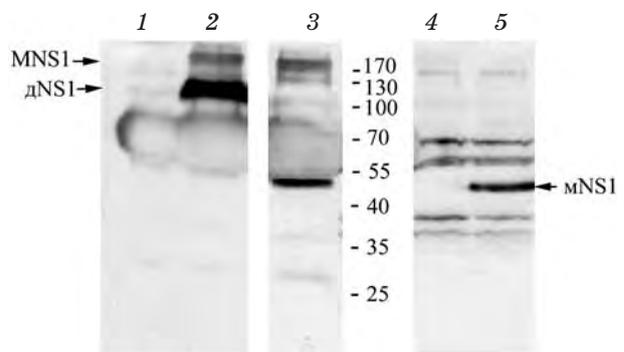


Рис. 1. Анализ синтеза внутриклеточной и секретрируемой формы протеина NS1 в культуре трансфицированных клеток HEK293T.

Имуноблотинг концентратов культуральной жидкости (1–3) и лизатов (4, 5) клеток HEK293T после трансфекции плазмидами: базовый вектор pUC19 (1 и 4) и pLdNS1 (2, 3, 5). Пробы 3, 4, 5 подвергали кипячению в течение 10 мин; пробы 1, 2 — без кипячения. Использовали сыворотку мышей, иммунизированных против протеина NS1. В центре электрофореграмм указано положение протеиновых маркеров молекулярной массы (кДа)

В лизатах клеток, трансфицированных плазмидой pLdNS1, с помощью сывороток мышей, иммунизированных против NS1, был выявлен протеин с молекулярной массой 47 кДа, соответствующей молекулярной массе внутриклеточной мономерной формы протеина NS1 (mNS1) (рис. 1, дорожка 5) [13–15]. В клетках, трансфицированных пустым вектором pUC19, наблюдали отсутствие полосы в этой области.

Было показано, что при трансфекции эукариотических клеток, так же как и вирусинфицированных клеток [9, 12] и клеток, зараженных рекомбинантным аденовирусом Rad51 [16], происходит секреция протеина

NS1, что подтверждается иммуноблотингом культуральных жидкостей. В условиях SDS-ПААГ при отсутствии кипячения проб секретируемая форма протеина NS1 ВКЭ в основном представлена мажорной полосой с молекулярной массой, соответствующей гликозилированной димерной форме (дNS1), а также несколькими полосами в области более 170 кДа, которые соответствуют мультимерным формам протеина (рис. 1, дорожка 2). Это связано с тем, что высокомолекулярные формы неструктурного протеина NS1 крайне чувствительны даже к низким значениям концентраций детергентов (SDS) и при нанесении на гель большая их часть диссоциирует в более стабильные димерные формы [13]. Мономерная форма в этих условиях выявлена не была. Известно, что в условиях SDS-ПААГ при кипячении проб наблюдается диссоциация димерной формы внеклеточного протеина NS1 до мономера (рис. 1, дорожка 3) [13]. Следует отметить, что при кипячении количество мономерной формы протеина, детектируемой на иммуноблоте, не соответствует количеству димеров. По-видимому, это происходит из-за образования дополнительных тримерных форм протеина NS1 [14–17] и неполной диссоциации мультимерных форм (MNS1) (рис. 1, дорожка 3). Подобное поведение секретируемой формы протеина NS1 характерно и для других флавивирусов: Денги, Западного Нила и Японского энцефалита [5, 6, 7, 14]. Аналогичные данные были получены для протеина NS1, секретируемого клетками, инфицированными рекомбинантным аденовирусом Rad 51 [16]. Поэтому для дальнейших исследований мы использовали анализ образцов в условиях SDS-ПААГ без кипячения.

Таким образом, молекулярные массы продуктов экспрессии гена NS1, судя по их электрофоретической подвижности, совпадали с данными литературы о секретируемой форме протеина NS1, выделенной из инфицированных источников, в условиях SDS-ПААГ. Следовательно, в клетках HEK293T, трансфицированных полученной нами плазмидой pLdNS1, синтезируются необходимые для наших целей формы протеина NS1, представленные в нативной гексамерной форме.

Выделение нативной формы протеина NS1

Гель-фильтрация на Сефакириле S-300

Первичную очистку внеклеточного протеина NS1 проводили гель-хроматографией на Сефакириле S-300 из десятикратного кон-

центрата культуральной жидкости клеток, трансфицированных плазмидой pLdNS1. Все процедуры осуществляли при 4 °С. Хроматографическую колонку (72×2 см) уравнивали фосфатным буфером №1 (18,5 мМ Na₂HPO₄, 1,3 мМ K₂HPO₄, 0,13 М NaCl), pH 8,0 [13]. Гель-фильтрацию протеинов выполняли со скоростью 8 мл/ч. В результате фракционирования на Сефакириле S-300 наблюдали профиль элюции с двумя плохо разделяющимися пиками (рис. 2).

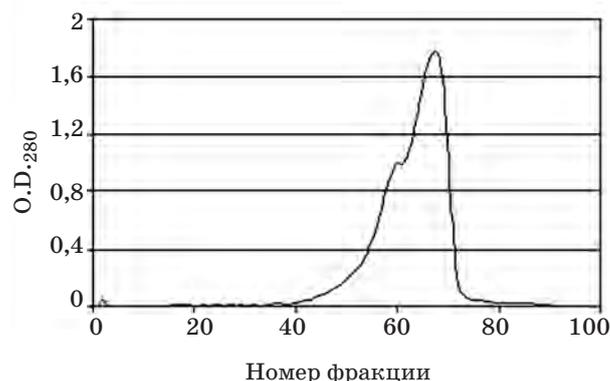


Рис. 2. Профиль элюции внеклеточной формы протеина NS1 после гель-фильтрации на Сефакириле S-300

С помощью иммуноблотинга фракций определили, что протеину NS1 соответствовал первый пик (фракции 55–65) (рис. 3).

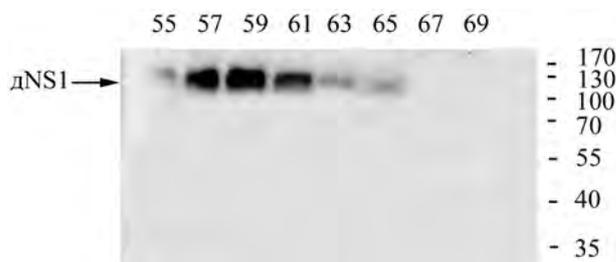


Рис. 3. Иммуноблотинг фракций 53–69 (приведены на рис. 2).

Электрофорез протеинов проводили в 10%-м ПААГ в денатурирующих условиях, без прогрева проб. Использовали сыворотку мышей, иммунизированных против протеина NS1. Сверху показаны номера фракций, справа — положение протеиновых маркеров молекулярных масс (кДа)

Второй пик, вероятно, соответствовал смеси высокомолекулярных протеинов — компонентов культуральной жидкости.

Как показано Crooks и др. [13], при выделении протеина NS1 из вирусных частиц на колонке с Сефакирилом S-300 также наблюдается контаминация пика протеина NS1 фракциями сывороточного альбумина. Ав-

торы смогли полностью избавиться от примесей повторной гель-хроматографией в аналогичных условиях. Однако отделить пик NS1 с помощью повторной хроматографии (данные не приведены) не удалось, поэтому мы решили провести разделение протеинов методом быстрой жидкостной хроматографии.

Метод быстрой жидкостной хроматографии протеинов (FPLC)

На втором этапе для освобождения протеина NS1 от примесей из культуральной жидкости нами был использован метод быстрой жидкостной хроматографии протеинов. Пробу из объединенных сконцентрированных фракций 55–65 (рис. 3) объемом 200 мкл нанесли на колонку с Superdex 200 10/300 EL (GE Healthcare, Швеция). Разделение проводили на приборе АКТА FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). В качестве элюирующего буфера использовали фосфатный буфер №2 (80 мМ Na₂HPO₄, 20 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl), pH 7,4, скорость элюции — 0,4 мл/мин. Контроль за процессом хроматографического разделения осуществляли по показаниям ультрафиолетового детектора, обеспечивающего регистрацию оптической плотности элюента при длине волны 280 нм. Собирали фракции объемом 1 мл (рис. 4).

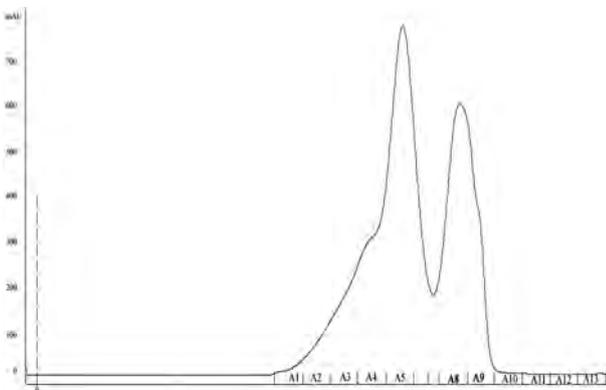


Рис. 4. Профиль элюции протеинов при хроматографии FPLC.

Объединенные фракции, содержащие протеин NS1, после первичной гель-хроматографии были разделены на колонке Superdex 200 10/300 EL. Номера фракций: A1–A13

Собранные фракции A2–A9 анализировали электрофорезом (рис. 5) и иммуноблоттингом. В результате было показано, что протеин NS1 содержался во фракциях A3–A6 (рис. 6), что соответствует первому пику профиля элюции (рис. 4).

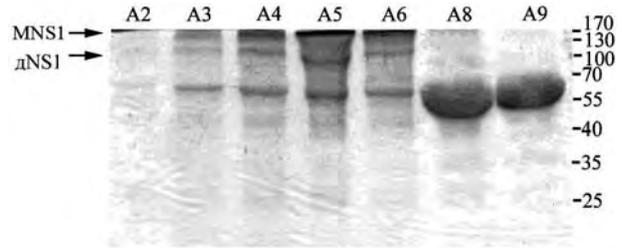


Рис. 5. Электрофорез фракций FPLC.

Аликвоты фракций были приготовлены и анализированы как описано для рис. 3. Гель окрашен раствором Кумасси бриллиантового синего. Сверху показаны номера фракций FPLC, справа — положение протеиновых маркеров молекулярных масс (кДа)

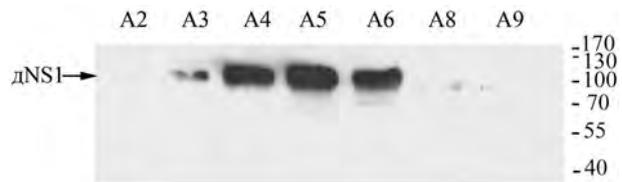


Рис. 6. Иммуноблоттинг фракций FPLC.

Для определения содержания протеина NS1 во фракциях использовали сыворотку мышей, иммунизированных против протеина NS1. Сверху обозначены соответствующие номера фракций. Справа указано положение протеиновых маркеров молекулярных масс (кДа)

Фракции после FPLC, содержащие протеин NS1, объединяли и концентрировали. Для определения качества препарата протеина был проведен электрофорез в денатурирующих условиях (рис. 7).

В условиях SDS-ПААГ при отсутствии кипячения образца окрашивание геля раствором Кумасси показало наличие различных форм протеина в высокомолекулярной области (рис. 7, дорожка 1). После окрашивания мембраны специфическими антителами против протеина NS1 ВКЭ антитела также мажорный сигнал в области высоких молекулярных масс, что свидетельствует о преимущественном содержании в полученном препарате мультимерных форм (MNS1) (рис. 7, дорожка 2). После прогрева проб в результате диссоциации мультимера NS1 отмечали характерную полосу для мономерной внеклеточной формы протеина (mNS1) (рис. 7, дорожка 5) с молекулярной массой 51 кДа.

Следовательно в полученном препарате протеина NS1 преобладает его нативная мультимерная форма. Из рис. 7 следует, что в препарате в качестве единственно значимой примеси содержится протеин, который по электрофоретической подвижности

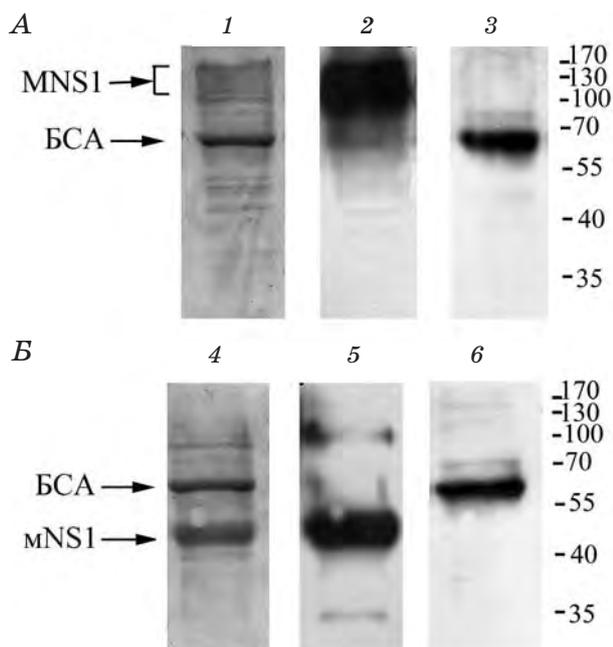


Рис. 7. Электрофорез и иммуноблотинг конечного очищенного препарата протеина NS1.

Препарат разделен в 10%-м ПААГ в денатурирующих условиях без кипячения (А) и с кипячением образца в течение 10 мин (Б). Протеины выявляли окрашиванием раствором Кумасси бриллиантового синего (дорожки 1, 4), моноклональными антителами против неструктурного протеина NS1 ВКЭ («Биосан», Россия) (дорожки 2, 5). Для определения содержания примесей в образце проводили вторичное окрашивание мембраны антителами к протеинам сыворотки крови крупного рогатого скота (СПБНИИВС, Россия) (дорожки 3, 6). Справа указаны положения протеиновых маркеров молекулярных масс (кДа)

соответствует БСА и выявляется с помощью антител к протеинам крови крупного рогатого скота (СПБНИИВС, Россия). Можно предполо-

жить, что его источником служит сыворотка, используемая для культуры клеток. Мы сочли возможным не избавляться полностью от этой примеси, поскольку подобные протеины используют в качестве стабилизирующего компонента при хранении протеинов и при этом они не являются иммуногенными [13].

Таким образом, с использованием сочетания методов разделения протеинов: гель-фильтрации, быстрой жидкостной хроматографии и многократной ультрафильтрации была проведена очистка неструктурного протеина NS1 вируса клещевого энцефалита из культуральной жидкости клеток эукариот, трансфицированных бактериальной плазмидой, несущей полноразмерный ген протеина NS1. В результате был получен биологический продукт, сходный по молекулярным характеристикам с аналогичным, выделенным из инфекционного материала и узнаваемый со специфическими антителами к протеину NS1.

Полученный высокоочищенный продукт, содержащий в виде примесного материала остаточное количество протеинов сыворотки, может быть использован при создании современных диагностикумов для клещевого энцефалита.

Выражаем благодарность за помощь в работе д. б. н. Г. Г. Каргановой (Институт полиомелита и вирусных энцефалитов РАМН) и В. В. Тютяевой (Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН).

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-5287.2011.4 и Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-01569-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Онищенко Г. Г.* Распространение вирусных природно-очаговых инфекций в Российской Федерации и меры по их профилактике // *Эпидемиол. инфекцион. заболеваний.* — 2000. — № 4. — С. 4–8.
2. *Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A.* Tick-borne encephalitis // *Antivir. Res.* — 2003. — V. 57. — P. 129–146.
3. *Кондратьева Я. Ю., Локтев В. Б., Орловский В. Г. и др.* Обнаружение антител к белкам E, NS1, NS3 и NS5 в сыворотках крови больных клещевым энцефалитом // *Матер. Всерос. науч.-практ. конф. «Акт. пробл. эпидемиол. проф. инф. бол.»*, Самара, РФ, 12–14 мая 2004. — С. 219–221.
4. *Черницына Л. О., Караванов А. С.* Гуморальный иммунный ответ к структурным и неструктурным белкам вируса клещевого энцефалита в динамике заболевания // *Вопр. вирусол.* — 2008. — № 4. — С. 27–30.
5. *Chung K. M., Nybakken G. E., Thompson B. S. et al.* Antibodies against West Nile Virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc gamma receptor-dependent and -independent mechanisms // *J. Virol.* — 2006 — V. 80(3). — P. 1340–1351.
6. *Flamand M., Chevalier M., Henchal E. et al.* Purification and renaturation of Japanese encephalitis virus nonstructural glycoprotein NS1 overproduced by insect cells // *Prot. Exp. Pur.* — 1995. — V. 6 — 519–527
7. *Flamand M., Megret F., Mathieu M. et al.* Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion // *J. Virol.* — 1999. — V. 73. — P. 6104–6110.

8. *Stephenson J. R., Crooks A. J., Lee J. M. et al.* The synthesis of immunogenetic polypeptides encoded by tick-borne virus // *J. Gen. Virol.* — 1987. — V. 68. — P. 1307–1316.
9. *Lee J. M., Crooks A. J., Stephenson J. R. et al.* The synthesis and maturation of a non-structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein // *Ibid.* — 1989. — V. 70. — P. 335–343.
10. *Pressman E. K.* Heterocomplexes of tick-borne encephalitis structural and non-structural proteins // *FEBS Lett.* — 1993. — V. 333, N 3. — P. 268–70.
11. *Пугачев К. В., Плетнев А. Г.* Экспрессия в клетках *Escherichia coli* гена белка NS1 вируса клещевого энцефалита // *Мол. биол.* — 1990. — Т. 24, № 6. — P. 1631–1639.
12. *Crooks A., Lee J., Easterbrook L. et al.* The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell // *J. Gen. Virol.* — 1994. — V. 75. — P. 3453–3460.
13. *Crooks A., Lee J., Dowsett A. B. et al.* Purification and analysis of infectious virions and native non-structural antigens from cells infected with tick-borne encephalitis virus // *J. Chromatogr.* — 1990. — V. 502. — P. 59–68.
14. *Winkler G., Randolph V., Cleaves G. et al.* Evidence that the mature form of the flavivirus non-structural protein NS1 is a dimer // *Virology.* — 1988. — V. 162. — P. 187–196.
15. *Gritsun T., Liapustin V., Shatalov A., Lashkevich V.* Multiple forms of the NS1 protein as the main component of the nonvirion («soluble») antigen of the tick-borne encephalitis virus // *Vopr. Virusol.* — 1990. — V. 35, N 6. — P. 471–474.
16. *Timofeev A. V., Butenko V. M., Stephenson J. R.* Genetic vaccination of mice with plasmids encoding the NS1 non-structural protein from Tick-borne encephalitis virus and Dengue 2 virus // *Vir. Genes.* — 2004. — V. 28. — P. 85–97.
17. *Тимофеев А. В.* Вирус клещевого энцефалита: изучение основных иммуногенов и разработка вариантов новых вакцинных технологий: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. 03.00.06 / Ин-т полиом. вирусн. энцеф. ПАМН. — 2000. — 70 с.

ОЧИЩЕННЯ НЕСТРУКТУРНОГО ПРОТЕЇНУ NS1 ВІРУСУ КЛІЩОВОГО ЕНЦЕФАЛІТУ З НЕІНФЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ

*Ю. В. Кузьменко, С. Ф. Берестень,
К. С. Стародубова, А. В. Тимофеев,
В. Л. Карпов*

Інститут молекулярної біології
ім. В. О. Енгельгардта РАН, Москва

E-mail: Kuzmenko-Yulia@mail.ru

Використовуючи поєднання методів розділення протеїнів: гель-фільтрацію, швидку рідинну хроматографію і багатократну ультрафільтрацію, провели очищення неструктурного протеїну NS1 вірусу клещового енцефаліту з культуральної рідини клітин евкаріотів, трансфікованих бактерійною плазмідною, що несе повнорозмірний ген протеїну NS1. В результаті був отриманий препарат неструктурного протеїну NS1 в нативній формі, яка є гексамером. Запропонований спосіб отримання протеїну NS1 з культуральної рідини трансфікованих клітин евкаріотів повністю виключає інфекційну небезпеку. Отриманий високоочищений продукт може бути використаний при створенні сучасних тест-систем для діагностики клещового енцефаліту.

Ключові слова: вірус клещового енцефаліту, неструктурний протеїн NS1.

PURIFICATION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS NON-STRUCTURAL PROTEIN NS1 FROM NON-INFECTIOUS MATERIAL

*Yu. V. Kuzmenko, S. F. Beresten,
E. S. Starodubova, A. V. Timofeev,
V. L. Karpov*

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS,
Moscow, Russia

E-mail: Kuzmenko-Yulia@mail.ru

Using the following combination of the methods for protein separation: gel-filtration, fast performance liquid chromatography and multiple ultrafiltration, we performed purification of non-structural protein NS1 of tick-borne encephalitis virus from culture fluids of eukaryotic cells transfected with plasmid carrying full-length gene of NS1. Hence we obtained the sample of nonstructural protein NS1 in the native form that is a hexamer. Current method of purification of NS1 protein from culture fluids of transfected eukaryotic cells completely eliminates risks of infection. This high-purity product can be used to create the new test systems for diagnosis of encephalitis.

Key words: tick-borne encephalitis virus, non-structural protein NS1.