

^{1,2}А.В. Жигайлов , ^{1,2}Е.О. Остапчук* , ^{1,2}Ю.В. Перфильева ,
^{1,2}Э.Р. Мальцева , Ж.А. Бердыгулова¹ , Д.А. Найзабаева^{1,2} ,
А.С. Низкородова^{1,2} , А.О. Бисенбай¹ , А.С. Черушева¹ ,
Г.А. Исмагулова^{1,2} , А.М. Дмитриевский^{1,3} , Ю.А. Скиба^{1,2} 

¹Филиал РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК в г. Алматы, Казахстан, г. Алматы;

²РГП на ПХВ «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы;

³ «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева» МЗ РК, Казахстан, г. Алматы.

*e-mail: katyostapchuk@gmail.com

КЛОНИРОВАНИЕ ОТКРЫТЫХ РАМОК СЧИТЫВАНИЯ SARS-COV-2, ИХ ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* И ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ SARS-S-6HIS, SARS-S1-6HIS, SARS-N-6HIS, SARS-M-6HIS И SARS-E-6HIS

Новый коронавирус SARS-CoV-2 вызвал пандемию атипичной пневмонии COVID-19 и повлек разрушительный кризис здравоохранения и социально-экономической сферы во всем мире. Для успешной борьбы с эпидемией необходима эффективная система диагностики возбудителя для предотвращения его распространения среди населения. Поскольку обнаружение антигенов и антител к SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа имеют большое значение в диагностике COVID-19, мы разработали рекомбинантные аналоги основных структурных белков вируса SARS-CoV-2. Для этого нами были клонированы в экспрессионный вектор pET23c открытые рамки считывания четырех структурных белков вируса, а именно поверхностного спайкового гликопротеина (S), мембранного белка (M), малого белка оболочки (E) и нуклеокапсидного белка (N). Нами были получены штаммы *Escherichia coli* BL-21(DE3), продуцирующие рекомбинантные белки S-6His, M-6His, E-6His и N-6His. Была оптимизирована процедура очистки рекомбинантных белков из суспензии клеток. В достаточном количестве был выделен белок N-6His, который был очищен диализом и сконцентрирован. Полученный чистый препарат N белка (содержание целевого белка 80%) может быть использован для дальнейших исследований его антигенной активности.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, клонирование, рекомбинантные белки.

^{1,2}A.V. Zhigailov, ^{1,2}Y.O. Ostapchuk*, ^{1,2}Y.V. Perfilyeva, ^{1,2}E.R. Maltseva, ¹Z.A. Berdygulova, D.A. ^{1,2}Naizabayeva, ^{1,2}A.S. Nizkorodova, ¹A.O. Bisenbay, ¹A.S. Cherusheva, ^{1,2}G.A. Ismagulova, A.M. ¹Dmitrovskiy, ^{1,2}Y.A. Skiba

¹Almaty Branch of the National Center for Biotechnology, Kazakhstan, Almaty

²M.A. Aitkhozhin's Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: katyostapchuk@gmail.com

Cloning of the major open reading frames of SARS-CoV-2, their expression in *Escherichia coli* and purification of SARS-S-6His, SARS-S1-6His, SARS-N-6His, SARS-M-6His and SARS-E-6His proteins

A novel coronavirus SARS-CoV-2 has been associated with the COVID-19 atypical pneumonia pandemic, which caused a devastating healthcare and socioeconomic crisis worldwide. Effective diagnosis of the disease is important to prevent the spread of infection. Since the detection of antigens and antibodies against SARS-CoV-2 by enzyme-linked immunosorbent assay is of great importance in the diagnosis of COVID-19, we developed recombinant analogs of the main structural proteins of the SARS-CoV-2 virus. The genes of the main open reading frames, including the surface spike (S) glycoprotein, the small membrane (M) protein, the envelope (E) glycoprotein and nucleocapsid (N) protein, were cloned in expression plasmids pET23c in polyhistidine reading frames. We obtained the strains of *Escherichia coli* BL-21(DE3) that produce recombinant S-6His, M-6His, E-6His and N-

6His proteins. N-6His protein was produced in sufficient quantities, for the purification of which the conditions of dialysis and its concentration were optimized. We obtained pure preparation of N protein (the target protein concentration is 80%). Further studies should be performed to identify its antigenic activity.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, cloning, recombinant proteins.

А.В. Жигайлов^{1,2}, Е.О. Остапчук^{1,2*}, Ю.В. Перфильева^{1,2}, Э.Р. Мальцева^{1,2},
Ж.А. Бердыгулова¹, Д.А. Найзабаева^{1,2}, А.С. Низкородова^{1,2}, А.О. Бисенбай¹,
А.С. Черушева¹, Г.А. Исмагулова^{1,2}, А.М. Дмитриевский¹, Ю.А. Скиба^{1,2}

¹ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы» ШЖҚ РМК филиалы, Қазақстан, Алматы қ.;

²ҚР БҒМ ҒК «М.А.Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты» ШЖҚ РМК, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: kastyostapchuk@gmail.com

SARS-CoV-2 ашық оқу шеңберлерін клондау, олардың *Escherichia coli* жасушаларында экспрессиясы және рекомбинантты SARS-S-6His, SARS-S1-6His, SARS-N-6His, SARS-M-6His және SARS-E SARS-E-6His ақуыздарын бөліу

Жаңа SARS-CoV-2 коронавирусы атипикалық пневмония COVID-19 пандемиясын тудырды және бүкіл әлемде денсаулық сақтау мен әлеуметтік-экономикалық саладағы дағдарысқа әкелді. Эпидемияға қарсы тиімді күресу, оның халық арасында таралуын болдырмау үшін қоздырғышты анықтаудың тиімді диагностикалық жүйесі қажет. COVID-19 диагностикасында ELISA көмегімен SARS-CoV-2 антигендері мен антиденелерін анықтау үлкен маңызға ие болғандықтан, біз SARS-CoV-2 вирусының негізгі құрылымдық ақуыздарының рекомбинантты ақуыздарын синтездедік. Ол үшін біз вирустың төрт құрылымдық ақуызының ашық оқу шеңберлерін pET23c экспрессиялық векторына клондадық, атап айтқанда, беттік гликопротеин (S), кішкене мембраналық ақуыз (M), конвертті ақуыз (E) және нуклеокапсидті ақуыз (N). Біз S-6His, M-6His, E-6His және N-6His рекомбинантты ақуыздарын экспрессиялайтын *Escherichia coli* BL21 (DE3) штамдарын алдық. Рекомбинантты ақуыздарды жасуша суспензиясынан тазарту процедурасы оңтайландырылды. Диализ арқылы тазартылып, концентрацияланған N-6His ақуызы жеткілікті мөлшерде алынды. Алынған N ақуыздың таза препаратын (қажетті ақуыздың мөлшері 80% құрайды), оның антигендік белсенділігін зерттеу үшін жалғасты зерттеулерге қолдануға болады.

Түйін сөздер: COVID-19, SARS-CoV-2, клондау, рекомбинантты ақуыз.

Введение

Коронавирусная инфекция COVID-19 – это высококонтагиозное инфекционное заболевание, характеризующееся тяжелым острым респираторным синдромом. COVID-19 вызывается новым штаммом коронавируса SARS-CoV-2, который впервые был выявлен в декабре 2019 г. Вирус распространился по всему миру за короткий период времени, вызвав заболевание у более чем 193 миллионов человек и более 4 миллионов смертей [1]. Всемирная организация здравоохранения объявила пандемию 11 марта 2020 г. [2]. В Казахстане вирус впервые был обнаружен 13 марта 2020 года. По состоянию на 27 июля 2021 года в Казахстане зарегистрировано более 600 тысяч случаев заболевания и 5619 смертей [1]. Несмотря на принятые карантинные меры, показатели заболеваемости и смертности от COVID-19 в стране растут.

Для борьбы с распространением инфекции необходимо внедрение эффективной системы

диагностики. Несмотря на быстрый прогресс в разработке и внедрении диагностических ПЦР тест-систем, существует острая клиническая потребность в широком применении экспресс тест-систем, которые могут выявлять вирус на ранних стадиях заболевания за короткий промежуток времени и являются доступными [3-7]. Кроме этого, в борьбе с COVID-19 приоритетной является разработка отечественных тест-систем, поскольку зарубежные аналоги в разы дороже, а также существует зависимость от их поставок. Таким образом, целью данной работы было получение рекомбинантных белков вируса SARS-CoV-2, которые могут быть использованы для разработки тест-систем для выявления антигенов и антител к SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 – это оболочечный несегментированный РНК-содержащий вирус, который принадлежит к бетакоронавирусам семейства *Coronaviridae*. Геном РНК SARS-CoV-2 имеет длину около 29,7 п.н. и имеет 11 открытых рамок считывания (ОРС) [8]. Специфические структур-

ные белки, представленные на поверхности вируса, играют важную роль в патогенезе заболевания, распознавании его иммунными клетками. Данные белки используются в качестве антигенов в диагностике инфекции [9]. Открытые рамки основных структурных белков SARS-CoV-2, а именно спайкового гликопротеина (S), белка нуклеокапсида (N), мембранного или матричного белка (M) и малого трансмембранного белка (E), располагаются в 3'-приближенном участке вирусного генома [10, 11].

В данной работе мы клонировали OPC белков S, M, E и N вируса SARS-CoV-2, экспрессировали их в клетках *Escherichia coli* штамма BL-21(DE3) и оптимизировали очистку наработанных рекомбинантных белков с целью их дальнейшего применения для разработки отечественных тест-систем на основе иммуноферментного анализа.

Методы

В работе использовали образец РНК, выделенный набором «ОТ-ПЦР-РБ-SARS-CoV-2» (Синтол) из назофарингеального мазка пациента с подтвержденным ПЦР-результатом на COVID-19, для которого прежде методом секвенирования ДНК по Сэнгеру была считана вся структурная область вирусного генома.

Реакция обратной транскрипции проводилась с использованием набора SuperScriptTM IV Reverse Transcriptase (Thermo FS) и гексамерных праймеров Random Hexamer Primer (Thermo FS).

Аmplификация кДНК открытых рамок считывания геномной РНК вируса проводилась с использованием высокоточной полимеразы из набора Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo FS). Для амплификации OPC спайк-белка S использовали праймеры “S1_Trunk_Nhe_Cla_F” (5'-ttgctagcgcacatgatggttaactctacaaccagaactcaatta) и “S2_Xho_Xba_R”: (5')attctagacctcgagtggccattttatatactgctcactact); для амплификации OPC нуклеопротеина N – праймеры “N_Nhe_Cla_F” (5'-ttgctagcgcacatgatgtctgataatggaccccaaatcagcga) и “N_Sal_Xba_R” (5'-gttctagacgtcgacgtgagtgagtcagcactgctcatgga); для амплификации OPC мембранного белка M – праймеры “M-ER_Nde_F” (5'-tgaattccatattggcagattccaacggtact) и “M-Xho_Kpn_R” (5'-ttggtaccctactcgagctgtacaagcaagcaatattgtc); для клонирования OPC белка E – праймеры “E-Cla_Nde_F” (5'-ttcatcgatgcatatgtactcattcgtttcgg aag) и “E-Kpn_Sal_R” (5'-ttggtaccctagtcgaccagaagatcaggaactctagaag). Температурный режим во всех четырех случаях: стадия 1 – 30 сек при 98°C – 1

цикл; стадия 2 – 30 сек. при 98°C, 30 сек. при 60°C, 2 мин. при 72°C – 35 циклов; стадия 3 – 5 мин. при 72°C – 1 цикл.

Клонирование OPC SARS-CoV-2. Амплификаты, очищенные из агарозного геля посредством набора DNA Gel extraction Kit (Thermo FS), обрабатывали соответствующими рестрицирующими эндонуклеазами (“CoV2-S” и “CoV2-N” – по NheI/XhoI, “CoV2-M” – по NdeI/XhoI и “CoV2-E” – по NdeI/SalI) и клонировали в вектор для бактериальной экспрессии pET23c под контроль промотора и терминатора фага T7 (в случае OPC белков S и N – по NheI/XhoI; в случае OPC M и E – по NdeI/XhoI). Клонированные участки конструкций были выверены севенированием ДНК по Сэнгеру с использованием набора BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) по методике производителя с последующим анализом на генетическом анализаторе. Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе ABI 3500XL (Life Technologies).

Экспрессия и выделение рекомбинантных белков. Плазмидами *pET23c_SARS-CoV2-S*, *pET23c_SARS-CoV2-N*, *pET23c_SARS-CoV2-M* и *pET23c_SARS-CoV2-E* были трансформированы клетки экспрессионного штамма *E. coli* BL-21(DE3) методом теплового шока. Содержащие плазмиды клетки *E. coli* росли в 200 мл жидкой среды LB при 25 °C до оптической плотности OD⁶⁰⁰=0,5, после чего их осаждали при 4000 g в течение 3 мин, ресуспендировали в 200 мл свежей среды LB, содержащей IPTG, до конечной концентрации 1 mM, и культивировали при 25 °C в течение 4 часов. Выделение рекомбинантных белков, содержащих His-tag, проводилось в нативных (для белка N) и денатурирующих (для белков S, M и E) условиях методом аффинной хроматографии IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) с использованием набора PerfectPro Ni-NTA Agarose (5-Prime) по методике производителя.

Иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводился в полиакриламидном геле (T = 12,5%, C = 0,5%) в присутствии 0,1% SDS по стандартной методике Лэмбли [12]. Гели окрашивались 0,125% раствором Кумасси бриллиантового голубого G-250 (Serva). Перенос белков из ПАА-геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили в аппарате для полусухого блоттинга (C.B.S. Scientific) в буфере для переноса (102 mM глицина, 25 mM Трис, 20% (o/o) этанола) при силе тока 0,8 mA см² в течение 1 часа. Мембрана

после переноса промывалась дважды по 10 мин в буфере TBS (20 мМ ТрисHCl (pH=7,6), 140 мМ NaCl), дважды по 10 мин – в буфере TBST (TBS + 0,05% Tween-20) и инкубировалась в блокирующем буфере (5% обезжиренное молоко “Sigma” на TBST) в течение ночи при 4°C. После забивки мембрану инкубировали с первыми антителами (Penta-His mouse antibodies (5-Prime) в разведении 1:2000 в блокирующем буфере) в течение 1 часа при комнатной температуре. После трехкратной промывки в TBST по 20 мин мембрана инкубировалась со вторыми антителами (Anti-mouse HRP-conjugate (5-Prime) в разведении 1:2000 в блокирующем буфере) в течение 1 часа при комнатной температуре. После двукратной промывки мембраны по 20 мин в TBST и двукратной промывки по 10 мин в TBS, проводили ее проявку хемилюминесцентным субстратом для пероксидазы набором SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Promega), либо хромогенным субстратом с использованием набора Metal Enhanced DAB Substrate Kit (Thermo FS).

Очистка белков. Диализ рекомбинантных белков с целью избавления от имидазола или мочевины проводили с использованием диализных мешков (Sigma) против диализного буфера (20 мМ TrisAc pH7,6; 90 мМ KAc; 2 мМ Mg(OAc)₂)

в течение ночи при температуре 4 °С. Концентрирование белков после диализа проводилось путём центрифугирования образцов в колонках с мембраной 10,000 MWCO-НУ (Sartorius) согласно инструкции производителя.

Концентрацию белка определяли по Бредфорду в трех повторах с вычислением среднего арифметического значения (X_{cp}) и ошибки среднего арифметического (m).

Общие методы (определение концентрации ДНК, электрофорез ДНК в агарозном геле, приготовление и трансформацию клеток *E. coli*, выделение плазмидной ДНК и др.) проводили согласно стандартным процедурам [13].

Результаты и обсуждение

Для амплификации OPC структурных белков SARS-CoV-2 в качестве матрицы использовался препарат РНК из назофарингеального мазка, для которого была считана вся структурная область вирусного генома (линия S (B.1.1)) методом секвенирования ДНК по Сэнгеру. С использованием высокоточной полимеразы Phusion и специфических праймеров, содержащих сайты рестрикции для клонирования, были получены амплификаты OPC структурных белков S, M, N и E SARS-CoV-2 (рис. 1).

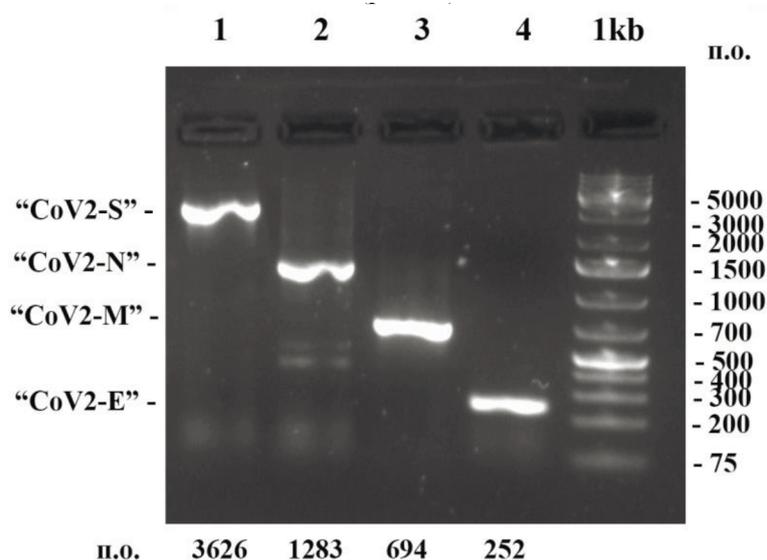


Рисунок 1 – Электрофоретический анализ в 1,5% агарозном геле продуктов амплификатов OPC SARS-CoV-2, полученных при использовании полимеразы Phusion Hi-Fi и специфических праймеров. Обозначения: 1 – праймеры “S1_Trunk_Nhe-Cla_F” / “S2_Xho_Xba_R”; 2 – праймеры “N_Nhe_Cla_F” / “N_Sal_Xba_R”; 3 – праймеры “M-ER_Nde_F” / M-Xho_Kpn_R” 4 – праймеры “E-Cla_Nde_F” / “E-Kpn_Sal_R”. 1 kb – ДНК-маркер.

Следует отметить, что в случае спайкового белка S амплифицировалась не полнотная ОРС, а усеченная ее область без участков, кодирующих сигнальный пептид, трансмембранный и цитозольный сегменты спайкового белка (т.е. для клонирования использовалась только кДНК, кодирующая участок белка S с экстрамембранной локализацией). Амплификаты после их очистки и обработки соответствующими рестрицирующими эндонуклеазами были клонированы в экспрессионный вектор pET23c, позволяющий экспрессировать клонированные в него участки кДНК в клетках бактерий. Клонирование осу-

ществлялось таким образом, чтобы к целевым ОРС с 3'-конца в одной с ними рамке прибавлялись шесть триплетов, кодирующих гистидин. Таким образом, синтезированные в бактериях рекомбинантные белки SARS-CoV-2 содержали на С-конце аминокислотную последовательность из шести гистидинов («6His-tag»), позволяющую достаточно легко и оперативно их выделять методом аффинной хроматографии ИМАС. Карты четырех полученных ДНК-конструкций представлены на рисунке 2. Клонированные участки ДНК были выверены секвенированием по Сэнгеру.

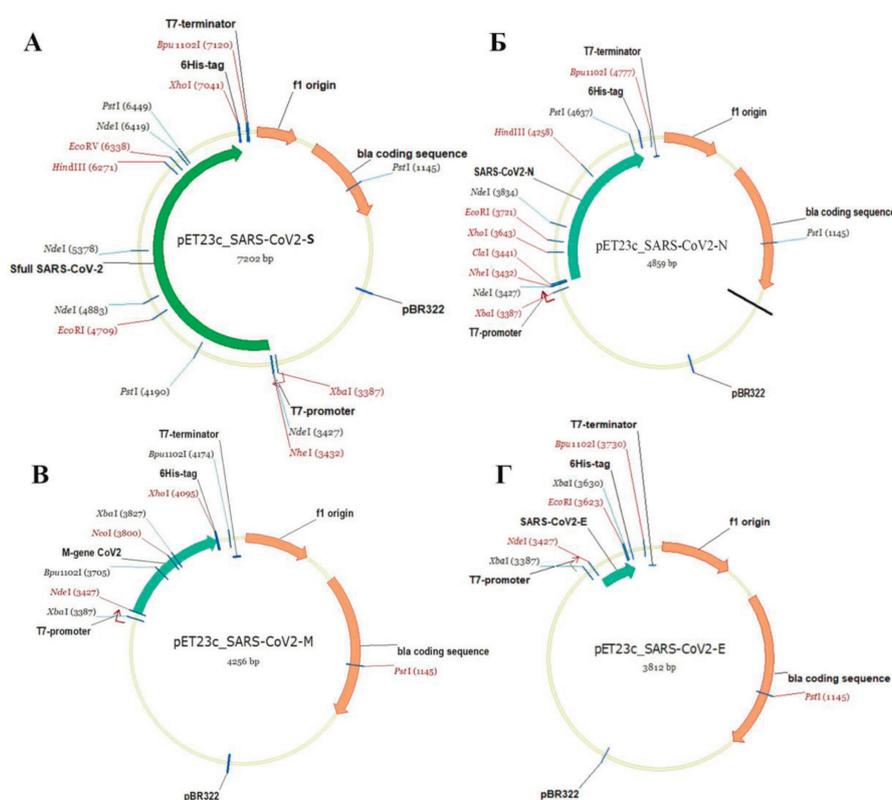


Рисунок 2 – Карты ДНК-конструкций, содержащих ОРС структурных белков S (А), N (Б), М (В) и Е (Г) вируса SARS-CoV-2

После трансформации клеток экспрессионного штамма *E. coli* BL-21(DE3) сконструированными плазмидами была проведена экспрессия ОРС целевых белков. Следует отметить, что пролиферация клеток, несущих плазмиду *pET23c_SARS-CoV2-N*, была значительно снижена при температуре выше 30 °C (даже в отсутствии IPTG). До добавления IPTG клетки культивировали при 28 °C, после добавления активатора lac-оперона – при

температуре 25 °C. Незначительной транскрипции с утечкой (leaky) с T7-промотора было достаточно для наработки небольшого количества рекомбинантного белка N-6His, который, вероятно является токсичным для бактерий. Можно также предположить, что токсичное воздействие на клетки *E. coli* оказывают агрегаты N белка вируса SARS-CoV-2, формирующиеся при оптимальной для роста бактерий температуре.

Проплифация клеток бактерий, трансформированных плазмидами *pET23c_SARS-CoV2-E* и *pET23c_SARS-CoV2-M*, была на достаточно высоком уровне до добавления IPTG, но после добавления IPTG к питательной среде оптическая плотность клеточных суспензий не увеличивалась со временем, что указывает на токсичность для бактерий синтезируемых в них вирусных белков М-6His и Е-6His. Для наработки этих белков в ходе оптимизации условий экспрессии кДНК была снижена концентрация IPTG с 0,5 мМ до 0,1 мМ и сокращено время индукции экспрессии кДНК с четырех часов до одного часа.

После наработки рекомбинантных белков в клетках бактерий тестировалась их способность переходить в растворимую форму. Лишь рекомбинантный белок N-6His детектировался в су-

пернатанте после лизиса бактерий и центрифугирования лизата при 20000 g в течение 20 минут. Белки S-6His, М-6His и Е-6His неизменно локализовались в осадке (т.е. формировали нерастворимые тельца включения или ассоциировались с мембранами) и практически отсутствовали в надосадочной жидкости (данные не представлены). При добавлении к лизирующему раствору детергентов (1% Tween-20, 1% Triton X-100 либо 1% SDS) доля S-6His переходила в растворимую фракцию, но при этом формировались димеры и другие агрегаты (данные не представлены). В случае же белков М-6His и Е-6His, добавление детергентов к лизирующему раствору не оказало влияние на их солюбилизацию. Таким образом, только белок N-6His удалось выделить методом ИМАС в нативных условиях (рис. 3).

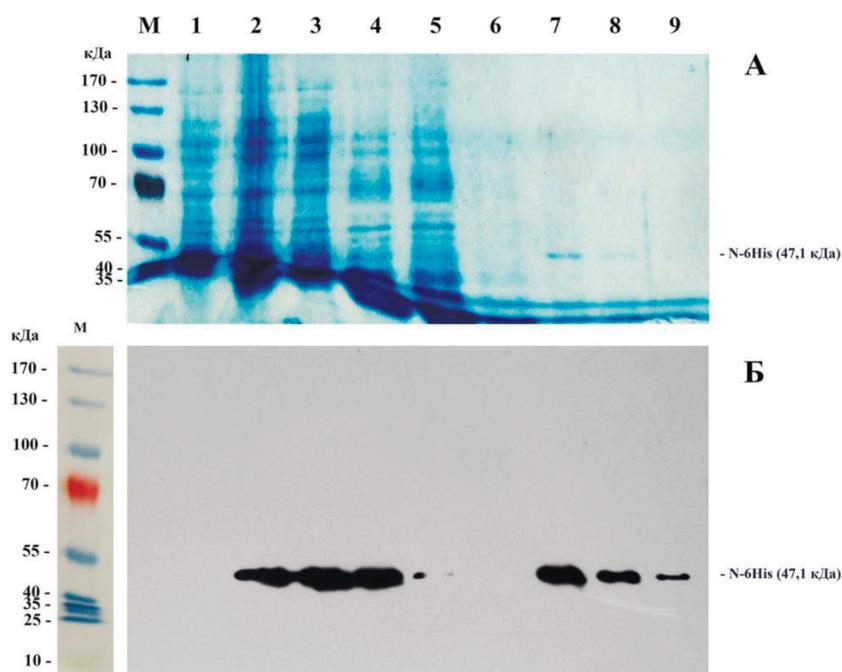


Рисунок 3 – Электрофореграмма (А) и вестерн-блот анализ фракций (Б) рекомбинантного нуклеокапсидного белка N SARS-CoV-2, несущего 6His-tag на С-конце (N-6His), в ходе его очистки методом ИМАС-хроматографии в нативных условиях из лизата клеток *E. coli*. Обозначения: М – белковый маркер; 1 – отрицательный контроль (лизат бактерий, содержащих пустой вектор рЕТ23с); 2 – лизат бактерий после экспрессии кДНК CoV2-N-6His; 3 – осадок лизата; 4 – супернатант лизата до связывания с Ni-NTA агарозой; 5 – супернатант лизата после пропускания через Ni-NTA агарозу; 6 – препарат белков, смывтых с Ni-NTA агарозы промывочным буфером; 7, 8 и 9 – препараты белков, элюированных с колонки с Ni-NTA агарозой буфером, содержащим 20 мМ имидазола (1-я, 2-я и 3-я фракции соответственно).

Белки S-6His, М-6His и Е-6His были очищены на Ni-NTA агарозу в денатурирующих условиях (рис. 4).

х (рис. 4).

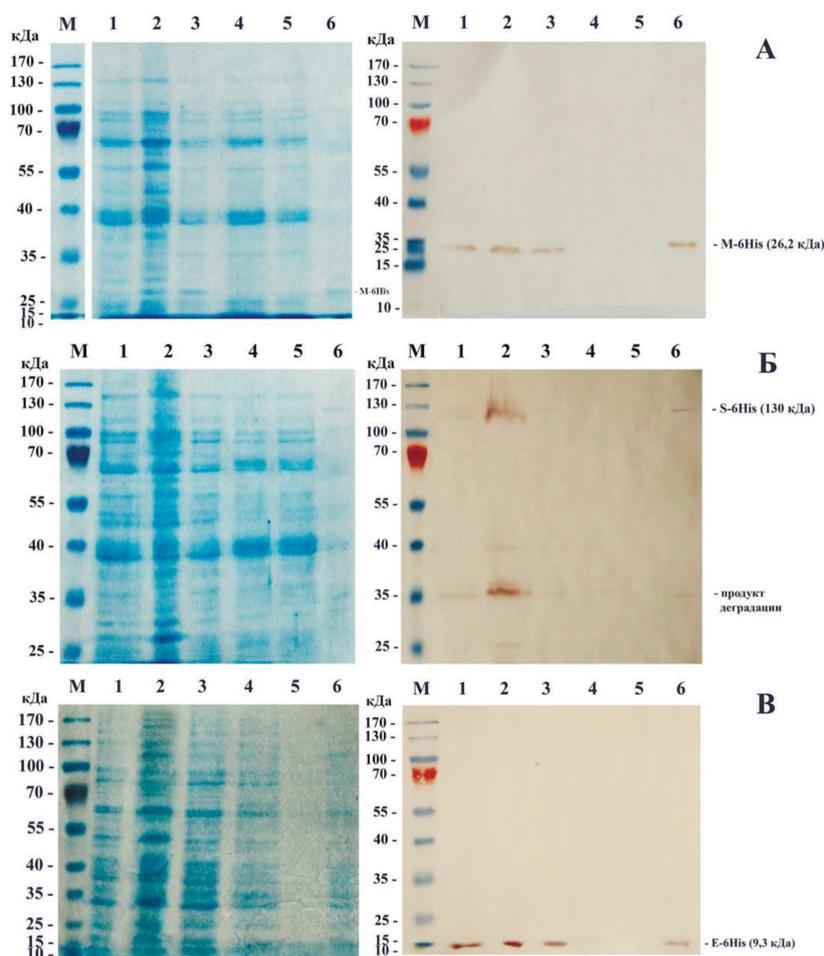


Рисунок 4 – Электрофореграмма (А) и вестерн-блот анализ (Б) фракций рекомбинантных белков, несущих 6His-tag на С-конце, в ходе их очистки методом ИМАС-хроматографии в денатурирующих условиях из лизата клеток *E. coli*. Обозначения: М – белковый маркер; 1 – лизат бактерий после экспрессии соответствующих кДНК; 2 – осадок лизата; 3 – супернатант лизата до связывания с Ni-NTA агарозой (pH = 8,0); 4 – супернатант лизата после пропускания через Ni-NTA агарозу (pH = 8,0); 5 – препарат белков, смытых с Ni-NTA агарозы промывочным буфером (pH = 6,3); 6 – препарат белков, элюированных с колонки с Ni-NTA агарозой элюирующим буфером (pH = 5,9).

Элюированные с Ni-NTA агарозы белки очищали диализом для того, чтобы избавиться от содержащегося в них имидазола или денатурирующих агентов, а также, чтобы скорректировать их pH до 7,5. По данным денситометрического анализа (выполненного в программе ImageJ), относительно чистым препаратом оказался только препарат N-6His, выделенный в нативных условиях (содержание целевого белка приближалось к 80%). Белок S-6His подвергался в ходе выделения деградации, поэтому в элюате доля полнодлинного белка не превышала 20%. Для повышения доли полнодлинного рекомбинантного белка нами были использованы концен-

трирующие центрифужные колонки с высокой степенью отсечки (более 30 кДа). При этом, использование для элюции с Ni-NTA колонки элюирующего буфера с более низким значением pH (pH = 4,5) позволяло повысить выход целевого белка, но при дальнейшем диализе и концентрировании таких элюатов наблюдалась олигомеризация белков (данные не представлены).

В случае выделения белков M-6His и E-6His нам не удалось получить достаточно чистых препаратов (содержание целевых белков в элюатах в обоих случаях было ниже 10%). Следует отметить, что мембранный белок М и порообразующий белок E SARS-CoV-2 являются токсичны-

ми даже для эукариотических клеток, поскольку способны запускать каскады апоптоза [14, 15]. Таким образом можно предположить, что М-6Нis и Е-6Нis белки не были наработаны в достаточном количестве в силу своей токсичности для клеток *E. coli* [16]. Более чистые препараты этих белков могут быть получены при использовании повторной очистки элюатов на Ni-NTI агарозу, либо при использовании в качестве продуцентов клетки экспрессионного штамма ArcticExpress (DE3), позволяющие осуществлять наработку рекомбинантных белков при относительно низкой температуре (10-12 °С). Следует отметить, что для получения поликлональных антител достаточно использовать вырезанные из полиакриламидного геля полосы заданных размеров рекомбинантных М-6Нis и Е-6Нis белков SARS-CoV-2, полученных вышеописанным способом.

При этом, полученный нами чистый препарат N-6Нis имеет высокий потенциал для дальнейшего использования в качестве антигена при разработке тест-систем. Кроме того, данный белок является перспективным кандидатом для его использования в иммуоферментных тест-системах в связи с его функциональными особенностями [17]. Известно, что N-белки некоторых коронавирусов, включая коронавирус мышей [18], Турецкий коронавирус [19], а также коронавирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней [20], являются сильными иммуногенами. Также сообщалось, что N белок имеет способность накапливается внутри инфицированных клеток еще до того, как он упаковы-

вается в зрелый вирус [21]. Поэтому N белок является наиболее распространенным белком вируса SARS-CoV-2 и других близкородственных коронавирусов на протяжении всей инфекции [22], вероятно, потому что его мРНК является наиболее распространенной субгеномной РНК [23-25].

Заключение

Таким образом нами были успешно клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli* OPC структурных белков S, М, Е и N вируса SARS-CoV-2, а также апробированы методы выделения кодируемых ими рекомбинантных белков. Разработанные в ходе выполнения работы методы получения и очистки рекомбинантного белка N-6Нis позволяют получить чистый препарат, который может быть использован для дальнейших исследований его антигенной активности.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках гранта AP09259103 «Выявление геномных и субгеномных характеристик циркулирующих в РК штаммов SARS-CoV-2 для разработки научно-обоснованных подходов к диагностике COVID-19» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Конфликт интересов. Авторы статьи подтверждают отсутствие финансовой или какой-либо иной поддержки исследования или конфликта интересов.

Литература

1. "Weekly epidemiological update on COVID-19 – 27 July 2021". World Health Organization. Retrieved 28 July 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---27-july-2021>.
2. "WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020". World Health Organization. 11 March 2020. Retrieved 12 March 2020.
3. "COVID-19: Laboratory and diagnosis. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Interim guidance". World Health Organization. Retrieved 11 September 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>
4. Alsharif W., Qurashi A. (2021) Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Radiography (Lond)*, vol. 27, no 2. pp. 682-687.
5. Peña M., Ampuero M., Garcés C., Gaggero A., García P., Velasquez M.S., et al. (2021) Performance of SARS-CoV-2 rapid antigen test compared with real-time RT-PCR in asymptomatic individuals. *Int J Infect Dis.*, vol. 107, pp. 201-204.
6. Baro B., Rodo P., Ouchi D., Bordoy A.E., Saya Amaro E.N., Salsench S.V., et al. (2021) Performance characteristics of five antigen-detecting rapid diagnostic test (Ag-RDT) for SARS-CoV-2 asymptomatic infection: a head-to-head benchmark comparison. *J Infect.*, vol. 82, no 6, pp. 269-275.
7. La Marca A., Capuzzo M., Paglia T., Roli L., Trenti T., Nelson S.M. (2020) Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod. Biomed. Online.*, vol. 41, no 3, pp. 483-499.
8. ul Qamar M.T., Alqahtani S.M., Alamri M.A., Chen L-L. (2020) Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *J. Pharm. Anal.*, vol. 10, no 4, pp. 313-319.

9. Pal M., Berhanu G., Desalegn C., Kandi V. (2020) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus*, vol. 12, no 3, e7423.
10. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*. New York: Springer, 2015. pp. 1–23.
11. Schoeman D., Fielding B.C. (2019) Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Viol. J.*, vol. 16, pp.69.
12. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, vol. 227, pp. 680-685.
13. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: A laboratory manual: 3 volumes. – Third edition. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 pp.
14. Yoshimoto F.K. (2020) The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J.*, vol. 39, pp. 198–216.
15. Tsoi H., Li L., Chen Z.S., Lau K-F., Tsui S.K.W., Chan H.Y.E. (2014) The SARS-coronavirus membrane protein induces apoptosis via interfering with PDK1-PKB/Akt signalling. *Biochem. J.*, vol. 464, pp. 439–447.
16. Liao Y., Lescar J., Tam J.P., Liu D.X. (2004) Expression of SARS-coronavirus envelope protein in *Escherichia coli* cells alters membrane permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 325, no 1, pp. 374-380.
17. Oliveira S.C., de Magalhães M.T.Q., Homan E.J. (2020) Immunoinformatic Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Identification of COVID-19 Vaccine Targets. *Front. Immunol.*, vol. 11, pp. 587615.
18. Wage H., Schliephake A., Korner H., Flory E., Wage H. (1993) An immunodominant CD4+ T cells site on the nucleocapsid protein of murine coronavirus contributes to protection against encephalomyelitis. *J. Gen. Virol.*, vol. 74, pp. 1287–1294.
19. Akin A., Lin T.L., Wu C.C., Bryan T.A., Hooper T., Schrader D. (2001) Nucleocapsid protein gene sequence analysis reveals close genomic relationship between Turkey coronavirus and avian infectious bronchitis virus. *Acta. Virol.*, vol. 45, pp. 31–38.
20. Casal J.I., Rodriguez M.J., Sarraseca J., Garcia J., Plana-Duran J., Sanz A. (1998) Identification of a common antigenic site in the nucleocapsid protein of European and North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 440, pp. 469–477.
21. Collisson E.W., Pei J., Dzielawa J., Seo S.H. (2000) Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. *Dev. Comput. Immunol.*, vol. 24, pp. 187–200.
22. Bai Z., Cao Y., Liu W., Li J. (2021) The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses*, vol. 13, no 6, pp. 1115.
23. Hiscox J.A., Caavanagh D., Britton P. (1995) Quantification of individual subgenomic mRNA species during replication of the coronavirus transmissible gastroenteritis. *Virus. Res.*, vol. 36, pp. 119–130.
24. Keck J.G., Hogue B.G., Brian D.A., Lai M.M.C. (1988) Temporal regulation of bovine coronavirus RNA synthesis. *Virus. Res.*, vol. 9, pp. 343–356.
25. Dutta N.K., Mazumdar K., Gordy J.T. (2020) The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. *J. Virol.*, vol. 94, no 13, e00647-20.

References

1. “Weekly epidemiological update on COVID-19 – 27 July 2021”. World Health Organization. Retrieved 28 July 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---27-july-2021>.
2. “WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020”. World Health Organization. 11 March 2020. Retrieved 12 March 2020.
3. “COVID-19: Laboratory and diagnosis. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Interim guidance”. World Health Organization. Retrieved 11 September 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>
4. Alsharif W., Qurashi A. (2021) Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Radiography (Lond)*, vol. 27, no 2. pp. 682-687.
5. Peña M., Ampuero M., Garcés C., Gaggero A., García P., Velasquez M.S., et al. (2021) Performance of SARS-CoV-2 rapid antigen test compared with real-time RT-PCR in asymptomatic individuals. *Int J Infect Dis.*, vol. 107, pp. 201-204.
6. Baro B., Rodo P., Ouchi D., Bordoy A.E., Saya Amaro E.N., Salsench S.V., et al. (2021) Performance characteristics of five antigen-detecting rapid diagnostic test (Ag-RDT) for SARS-CoV-2 asymptomatic infection: a head-to-head benchmark comparison. *J Infect.*, vol. 82, no 6, pp. 269-275.
7. La Marca A., Capuzzo M., Paglia T., Roli L., Trenti T., Nelson S.M. (2020) Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod. Biomed. Online.*, vol. 41, no 3, pp. 483-499.
8. ul Qamar M.T., Alqahtani S.M., Alamri M.A., Chen L-L. (2020) Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *J. Pharm. Anal.*, vol. 10, no 4, pp. 313-319.
9. Pal M., Berhanu G., Desalegn C., Kandi V. (2020) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus*, vol. 12, no 3, e7423.
10. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*. New York: Springer, 2015. pp. 1–23.

11. Schoeman D., Fielding B.C. (2019) Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Viol. J.*, vol. 16, pp.69.
12. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, vol. 227, pp. 680-685.
13. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: A laboratory manual: 3 volumes. – Third edition. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 pp.
14. Yoshimoto F.K. (2020) The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J.*, vol. 39, pp. 198–216.
15. Tsoi H., Li L., Chen Z.S., Lau K-F., Tsui S.K.W., Chan H.Y.E. (2014) The SARS-coronavirus membrane protein induces apoptosis via interfering with PDK1-PKB/Akt signalling. *Biochem. J.*, vol. 464, pp. 439–447.
16. Liao Y., Lescar J., Tam J.P., Liu D.X. (2004) Expression of SARS-coronavirus envelope protein in Escherichia coli cells alters membrane permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 325, no 1, pp. 374-380.
17. Oliveira S.C., de Magalhães M.T.Q., Homan E.J. (2020) Immunoinformatic Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Identification of COVID-19 Vaccine Targets. *Front. Immunol.*, vol. 11, pp. 587615.
18. Wage H., Schliephake A., Korner H., Flory E., Wage H. (1993) An immunodominant CD4+ T cells site on the nucleocapsid protein of murine coronavirus contributes to protection against encephalomyelitis. *J. Gen. Virol.*, vol. 74, pp. 1287–1294.
19. Akin A., Lin T.L., Wu C.C., Bryan T.A., Hooper T., Schrader D. (2001) Nucleocapsid protein gene sequence analysis reveals close genomic relationship between Turkey coronavirus and avian infectious bronchitis virus. *Acta. Virol.*, vol. 45, pp. 31–38.
20. Casal J.I., Rodriguez M.J., Sarraseca J., Garcia J., Plana-Duran J., Sanz A. (1998) Identification of a common antigenic site in the nucleocapsid protein of European and North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 440, pp. 469–477.
21. Collisson E.W., Pei J., Dzielawa J., Seo S.H. (2000) Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. *Dev. Comput. Immunol.*, vol. 24, pp. 187–200.
22. Bai Z., Cao Y., Liu W., Li J. (2021) The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses*, vol. 13, no 6, pp. 1115.
23. Hiscox J.A., Caavanagh D., Britton P. (1995) Quantification of individual subgenomic mRNA species during replication of the coronavirus transmissible gastroenteritis. *Virus. Res.*, vol. 36, pp. 119–130.
24. Keck J.G., Hogue B.G., Brian D.A., Lai M.M.C. (1988) Temporal regulation of bovine coronavirus RNA synthesis. *Virus. Res.*, vol. 9, pp. 343–356.
25. Dutta N.K., Mazumdar K., Gordy J.T. (2020) The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. *J. Virol.*, vol. 94, no 13, e00647-20.