

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО S ДОМЕНА ПОВЕРХНОСТНОГО БЕЛКА VP1 НОРОВИРУСА

Лапин В. А.¹,
Новиков Д. В.¹,
Мохонова Е. В.¹,
Мелентьев Д. А.¹,
Цыганова М. И.¹,
Манакова Э. А.²,
Новиков В. В.¹

¹ ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия

² Общество с ограниченной ответственностью «ТИАС ЛОТУС», Нижний
Новгород, Россия

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF THE RECOMBINANT
NOROVIRUS VP1 SURFACE PROTEIN S DOMAIN**

Lapin V. A. ^a,
Novikov D. V. ^a,
Mokhonova E. V. ^a,
Melentyev D. A. ^a,
Tsyganova M. I. ^a,
Manakova A. A. ^b,
Novikov. V. V. ^a

^a Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of
Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia

^b TIAS LOTUS Limited Liability Company, Nizhny Novgorod, Russia

Резюме

Введение. Поверхностный VP1 норовируса состоит из двух доменов: оболочечного S домена и выступающего за пределы капсида Р домена. За формирование внутреннего каркаса капсида отвечает домен S, образованный N-концевой последовательностью белка.

Цель работы - получить рекомбинантный S домен белка VP1 норовируса и охарактеризовать его иммуногенные и антигенные свойства.

Материалы и методы. Клонирование последовательности, кодирующей S домен белка VP1 норовируса, моделирование структуры поверхностных белков с помощью ресурса Swiss-model, микробиологические методы работы с клетками *E.coli*, которые являются продуцентами рекомбинантных белков, полимеразная цепная реакция, электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле и белков в полиакриламидном геле, аффинная хроматография, иммуноферментный анализ, электронная микроскопия.

Результаты. Получена генетическая конструкция, кодирующая рекомбинантный S домен белка VP1 норовируса генотипа GII.4, оптимизированная для высокоэффективной экспрессии в *E.coli*. Генетической конструкцией были трансформированы клетки *E.coli* штамма Rosetta 2. Подобраны и оптимизированы условия продукции и очистки рекомбинантного белка. Получен стабильный, растворимый рекомбинантный белок, воспроизводящий S домен белка VP1 норовируса и образующий вирусоподобные частицы диаметром 30 нм. Иммунизация мышей полученным белком вызывала наработку антител к нему, в том числе наработку низкоавидных антител класса IgM. При оценке антигенных свойств было показано, что в крови волонтеров присутствуют антитела, способные специфически взаимодействовать с рекомбинантным S доменом. Титры этих антител соответствовали титрам антител к полноразмерному белку VP1, но авидность антител была существенно ниже авидности антител к

полноразмерному VP1. Вероятно это явление связано с локализацией S домена белка, который скрыт внутри вирусной частицы.

Заключение. Проведенные исследования позволили охарактеризовать антигенные и иммуногенные свойства рекомбинантного белка, воспроизводящего структуру S домена VP1 норовируса. Была показана способность S домена VP1 норовируса индуцировать иммунные реакции, а также формировать вирусоподобные частицы.

Ключевые слова: норовирус, S домен VP1, вирусоподобные частицы, антитела, иммуноферментный анализ, вакцины.

Abstract

Introduction. In the structure of the norovirus surface VP1, it consists of the S domain which N-terminal sequence is responsible for capsid formation, and P domain that extends beyond the capsid. Possibility of using S domain for preparing chimeric virus-like particles is shown.

The aim of the work is to obtain a recombinant VP1 protein S domain and to characterize its immunogenic and antigenic properties.

Materials and methods. Cloning of the sequence encoding VP1 protein S domain, modeling the structure of proteins, microbiological methods for working with *E. coli* cells producing recombinant proteins, polymerase chain reaction, electrophoresis of nucleic acids in an agarose gel and proteins in a polyacrylamide gel, affinity chromatography, enzyme immunoassay, electron microscopy were applied during the study.

Results. A genetic construct encoding the recombinant VP1 norovirus genotype GII.4 protein S domain optimized for highly efficient expression in *E. coli* is obtained. *E. coli* Rosetta 2 cells were transformed with the genetic construct. Conditions for protein production and purification were optimized. A soluble recombinant protein reproducing norovirus VP1 protein S domain and forming virus-like particles with a diameter of 30 nm is obtained. Immunization of mice with the obtained protein caused specific antibody production including low-avidity IgM antibodies. When assessing antigenic properties, it was shown that antibodies interacting with the recombinant S domain are found in the blood samples collected from volunteers. Antibody titers, but of lower avidity, specific to the latter corresponded to those against full-length VP1. Likely, it was due to the localization of the S domain inside the viral particle.

Conclusion. Antigenic and immunogenic properties of recombinant protein reproducing structure of norovirus VP1 S domain are characterized, and its ability to form virus-like particles is shown.

Keywords: norovirus, S domain VP1, virus-like particles, antibodies, immunoassay, vaccines.

1 Введение

Норовирусы (НВ) относятся к семейству *Caliciviridae*, род *Norovirus* и занимают второе место в этиологической структуре вирусных острых кишечных инфекций после ротавирусов. При этом, в странах, где проводится вакцинация против ротавирусной инфекции, НВ вышли на первое место [7, 12]. В 2024 году ВОЗ выделила приоритетные эндемичные патогены, в вакцинах против которых существует наибольшая необходимость, и включила в перечень таких патогенов НВ [11]. Геном НВ представлен позитивно-смысловой РНК и разделен на три открытые рамки считывания (ORF). ORF1 кодирует неструктурные белки, ORF2 кодирует главный структурный белок VP1, формирующий капсид, а ORF3 кодирует второстепенный структурный белок VP2, который обеспечивает стабильность вирусного капсида. На основании различий в строении VP1, выделяют несколько геногрупп НВ. Самой распространенной среди них является геногруппа GII, на долю которой в Российской Федерации приходится до 80–90% случаев норовирусного гастроэнтерита детей первых лет жизни. Геногруппа GII имеет несколько генотипов, наиболее распространенным является генотип GII.4 [5, 1]. Структура капсида расшифрована с помощью рентгеновской кристаллографии с разрешением 3,4 Å [17]. В соответствии с полученными данными капсидный белок VP1 состоит из двух доменов, соединенных шарниром: оболочечного S домена и выступающего за пределы капсида Р домена, который содержит два субдомена, Р1 и Р2. Домен S образован N-концевыми аминокислотными остатками 1-225. Остатки от 50 до 225 сворачиваются в восьмицепочечную антипараллельную β-структуру. Домен S содержит элементы, необходимые для образования капсида, а домен Р формирует дугообразные выступы на внешней поверхности капсида, обладающие высокой генетической изменчивостью и антигенностью.

Экспрессия VP1 приводит к образованию путем самосборки вирусоподобных частиц (ВПЧ), которые морфологически и антигенно

воспроизводят вирион вируса [15]. При этом рекомбинантные белки, воспроизводящие структуру отдельных доменов S и P, также способны к сборке в ВПЧ [6,8]. Разработан метод создания химерных вирусоподобных частиц, построенных из белков, в которых домен S VP1 сохранен, а домен P заменен на белки других вирусов [19]. Такие вирусоподобные частицы потенциально способны выступать в качестве кандидатов антигенной составляющей различных комбинированных вакцин. Нами ранее были получены и охарактеризованы ВПЧ, построенные из S домена VP1 норовируса и поверхностных белков энтеровируса ECHO-30 или RBD SARS-CoV-2 [3, 4]. Также был получен полноразмерный рекомбинантный VP1 норовирусного капсида и *in silico* осуществлен анализ его эпитопов [2, 21].

Однако, каков вклад эпитопов S домена VP1 НВ в иммуногенные свойства ВПЧ, построенных из химерных белков, остается неясным. Оценка иммуногенности S домена важна для понимания свойств химерных ВПЧ, являющихся антигенной основой кандидатных вакцин для профилактики вирусных инфекций [3, 4]. Изучения способности S домена VP1 НВ к индукции выработки антител ранее не проводилось. **Цель** настоящей работы состояла в получении рекомбинантного S домена белка VP1 НВ и в характеристике его иммуногенных и антигенных свойств.

2 Материалы и методы

Анализ и конструирование нуклеотидных последовательностей, дизайн олигонуклеотидов, расчёт молекулярной массы белка, изоэлектрической точки и коэффициента экстинкции осуществляли с помощью пакета программного обеспечения «Lasergene 7.1.0» («Dnastar, Inc.»). В работу была взята нуклеотидная последовательность VP1 эпидемического варианта НВ генотипа GI.4, выделенного на территории Нижегородской области Российской Федерации. Верификацию нуклеотидных последовательностей проводили с помощью секвенирования с использованием генетического анализатора «ABI Prism 310» («Thermo Fisher Scientific»). Клетки *Escherichia*

59 *coli*, штамм Rosetta 2 (DE3), трансформированные генетической конструкцией
60 на основе плазмиды pET22b и кодирующей SN HB, выращивали в среде LB-
61 Miller pH 7,0. Индукцию синтеза белка проводили путём добавления
62 изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида до конечной концентрации 0,5 mM к
63 каждой культуре. Биомассу клеток получали центрифугированием,
64 лизировали в растворе, содержащем 25 mM HEPES (pH 7,5), 1 M NaCl, 10%
65 глицерина, 1% Triton X-100, ДНКазы I (10 мкг/мл), РНКазы А (10 мкг/мл),
66 лизоцима (50 мкг/мл), 0,2 mM фенилметилсульфонилфторида,
67 дезинтегрировали ультразвуком с помощью «QSonica Q55» («QSonica
68 sonicators»), центрифугировали и добавляли промывочный буфер,
69 содержащий 25 mM HEPES pH 7,5, 1 M NaCl, 10% глицерина, 1 M мочевины с
70 последующим центрифугированием. Выделение SN HB проводили с помощью
71 металлохелатной хроматографии в денатурирующих условиях с помощью
72 сорбента Ni-NTA Superflow («GEHealthcare»). Ренатурацию полученного
73 белка осуществляли путем диализа. Электрофорез в 12% полиакриламидном
74 геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили общепринятым
75 методом. Микрофотографии вирусоподобных частиц, образуемых SN,
76 получали с помощью электронного микроскопа «HT7700» («Hitachi»). Для
77 иммунизации использовали самок мышей линии BALB/c возрастом 8 недель
78 и массой 16–18 г. Животных содержали в условиях вивария в соответствии с
79 межгосударственными стандартами ГОСТ 33216-2014 и ГОСТ 33215-2014.
80 Биоматериал для исследования брали у мышей с соблюдением принципов
81 гуманности, изложенных в директивах европейского сообщества (86/609/ЕС).
82 Исследования проводили согласно биоэтическим и этическим принципам,
83 установленным Хельсинкской декларацией (принятой в июне 1964 г. и
84 пересмотренной в октябре 2013 г). Для оценки антигенных свойств
85 рекомбинантного белка использовали 95 образцов плазмы крови, полученных
86 из диагностического центра «Гемохелп» (ООО «ТИАС ЛОТУС») от лиц в
87 возрасте 19–44 лет, обратившихся для проведения диагностических

исследований и давших письменное согласие на использование их биоматериала в исследовании. АТ к SN НВ определяли с помощью твёрдофазного иммуноферментного анализа. В качестве сравнения использовали полноразмерный рекомбинантный белок VP1, полученный ранее [2]. Белки сорбировали в лунки планшетов в концентрации 1 мкг/мл в течение 18 ч при 20°C. Тестируемую сыворотку крови мышей разводили с шагом 2, тестируемую плазму крови волонтеров разводили перед тестированием с шагом 10. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку не иммунизированных мышей. При определении суммарных АТ в крови лабораторных животных использовали конъюгированные с пероксидазой корня хрена кроличьи АТ против суммарной фракции иммуноглобулинов мыши и IgM-антител. Для предотвращения неспецифических реакций образцы сыворотки крови преинкубировали в объемном соотношении 2:1 с лизатом клеток *E. coli* Rosetta 2 (DE3), полученным обработкой бактериальных клеток 1%-ным Triton X-100 и четырехкратным замораживанием-оттаиванием с последующим осветлением с помощью центрифугирования.

При определении АТ человека использовали конъюгированные с пероксидазой хрена кроличьи АТ против иммуноглобулинов классов G и M (IgG и IgM). Реакцию визуализировали добавлением 100 мкл раствора 0,02% тетраметилбензидина, содержащего 0,004% перекиси водорода, pH 5,0. Оставляли планшет на 10 минут в темном месте. Во все лунки добавляли по 50 мкл стоп-реагента (1N NaOH) и измеряли оптическую плотность в двухволновом режиме, при основной длине волны 450 нм и при референсной длине волны в диапазоне 620 нм. Для измерения оптической плотности использовали микропланшетный ридер Infinite M200 Pro (TECAN, Austria) с программным обеспечением Magellan 7.2 (TECAN, Austria). За положительную реакцию принимали значение оптической плотности больше среднего значения отрицательного контроля, умноженного на 3. При

определении авидности антител образцы анализировали в дублях иммуноферментным методом, с описанными ниже модификациями. Перед добавлением конъюгата в одну из двух лунок каждого из образцов вносили 100 мкл раствора 8М мочевины в ФСБ-Т, инкубировали в течение 3 мин, отмывали 5 раз, и проводили ИФА как описано выше. Индекс авидности рассчитывали, как отношение величины ОП в лунках с 8М мочевиной, к величине ОП в лунках без мочевины, полученной для одного образца сыворотки крови, выраженной в процентах. Каждый тест выполняли в трех повторностях. Трехмерные модели SN и НВА строили с использованием веб-сервера Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive/EVMn7a/models/>) специализирующегося на моделировании трёхмерных структур белков, на основе их аминокислотной последовательности.

Анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения «Microsoft Excel» («Microsoft»). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Graph Pad Prism 8» («Graph Pad Software»). Различия в данных считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

3 Результаты

Для получения плазмиды, кодирующей SN, использовали созданную ранее генетическую конструкцию на основе плазмиды pET22b, кодирующую полноразмерный белок VP1 НВ с сайтом расщепления для эндонуклеазы рестрикции NdeI и нуклеотидной последовательностью, кодирующей на С-конце шесть остатков гистидина, стоп-кодон (ТАА) и сайт для рестриктазы XhoI. На границе регионов, кодирующих шарнирный и Р регионы белка VP1 НВ, был внесен сайт для эндонуклеазы рестрикции Hind III [2]. Плазмиду расщепляли с использованием рестриктазы HindIII, что приводило к выпадению последовательности, кодирующей Р регион белка VP1 (Рис. 1). Оставшийся фрагмент плазмидной ДНК, содержащий последовательность, кодирующую S-домен и шарнирный участок VP1 (SN), лигировали и затем

методами молекулярного клонирования отбирали корректные клоны. Правильность нуклеотидной последовательности верифицировали с помощью секвенирования.

Кодирующей SN плазмидой трансформировали штамм *E. coli* Rosetta 2 (DE3). Был подобран оптимальный состав среды и условия культивирования клеток *E. coli*. Максимальная плотность культуры клеток *E. coli* (OD600 = 2,8) соответствовала 4,5 г биомассы на 1 л культуры в среде LB, содержащей 0,5% глицерина и 25 мМ фосфатного буфера pH 7,4. Оптимальная концентрация изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозида составила 0,5 мМ, оптимальная температура для экспрессии белков — 30°C, время индукции — 4–6 ч. Эффективность продукции белка, составила 25–40 мг белка на 1 л клеточной культуры. Белок формировал «тельца включения».

Очистка рекомбинантного белка с помощью металл-хелатной хроматографии в присутствии 8 М мочевины и последующий рефолдинг путём диализа против раствора, содержащего 25 мМ HEPES pH 7,5, 150 мМ NaCl и 5% глюкозы, позволили получить растворимый белок, состоящий из 234 аминокислот. Белок имел расчётную молекулярную массу 25,3 кДа, изоэлектрическую точку, равную 5,86, и коэффициент экстинкции 1,23. Электрофореграмма очищенного белка представлена на рисунке 2а. Как видно из представленного рисунка, полученный белок имеет молекулярную массу, соответствующую расчётной.

Белок наработан в препаративных количествах и использован для оценки способности формировать ВПЧ вирусеноподобные—частицы, определения антигенных свойств и для иммунизации лабораторных мышей. На рис. 2б представлена электронно-микроскопическая фотография, свидетельствующая о способности рекомбинантного SN образовывать ВПЧ диаметром 30 нм, что соответствует данным других авторов [6].

С помощью ресурса Swiss-model использующего шаблоны из базы данных PDB (Protein Data Bank) и полученных нуклеотидных

последовательностей были спроектированы трехмерные модели рекомбинантных белков SN и HB. На рисунке 3 продемонстрировано, что N-концевая часть молекулы VP1, расположенная в основании модели, соответствует трехмерной модели рекомбинантного SN.

С помощью иммуноферментного анализа проведена сравнительная оценка антигенных свойств белка SN в сопоставлении со свойствами полноразмерного VP1. Частота обнаружения АТ класса IgG против SN в плазме крови волонтеров составила 13,4%, частота обнаружения антител класса IgG против полноразмерного VP1 HB у волонтеров составила 11,4 %. Статистически значимые различия в частоте встречаемости АТ-положительных волонтеров не обнаружены ($P > 0,05$). Частота выявления АТ класса IgM против SN и VP1 составила соответственно 9,4 и 7,2% ($P < 0,05$). АТ против SN обнаруживались в плазме крови всех анти-VP1 положительных волонтеров. Сопоставлена оптическая плотность иммуноферментной реакции при определении АТ классов IgG и IgM к двум указанным белкам в плазме крови АТ-положительных волонтеров и проведен корреляционный анализ полученных данных. Результаты представлены на рис. 4. Средняя оптическая плотность, зарегистрированная при определении АТ классов IgG и IgM против SN, была статистически значимо в 1,41 и в 1,78 раза выше, чем для антител против VP1 ($P < 0,05$), что вероятно связано с более высокой молярностью сорбируемого в лунки планшетов раствора SN. При этом величины оптической плотности с высокой степенью достоверности положительно коррелировали друг с другом. Авидность АТ классов IgG и IgM к SN составила 22,7 и 10,2%. Представленные результаты свидетельствуют о том, что у части волонтеров в плазме крови присутствуют АТ классов IgG и IgM, взаимодействующие с рекомбинантным SN. Однако, антитела имеют невысокий индекс авидности, который значительно ниже индекса авидности антител класса IgG против VP1, составившего, в соответствии с полученными ранее данными, величину, равную 54% [2].

Иммунизация мышей очищенным SN приводила к образованию АТ, имеющих в среднем титр, соответствующий 1:2000 с максимальным значением, равным 1:4000. Использование в качестве адъюванта гидроокиси алюминия вызывало намного более высокий антительный ответ, достигавших у отдельных мышей титров 1:100000 и выше. Среднее значение титра суммарных АТ составило 1:56000 и соответствовало среднему титру АТ при иммунизации полноразмерным VP1. Среднее значение титра IgM-антител против SN при иммунизации животных чистым SN было значительно ниже и равнялось 1:1300 с максимальными значениями, достигавшими у отдельных животных 1:4000. Использование адъюванта приводило к повышению среднего титра IgM-антител в два раза.

Для оценки ~~специфичность~~ специфичности иммуноферментного определения анти-SN проводили реакцию нейтрализации антител рекомбинантными белками в повышающихся концентрациях. Преинкубация сыворотки крови иммунизированных мышей с равным объемом раствора, содержащего рекомбинантные белки в концентрации от $4,5 \times 10^{-11}$ до $4,5 \times 10^{-5}$ мг/мл, приводила к постепенному снижению интенсивности иммуноферментной реакции до фоновых значений, что свидетельствует о специфичности реакции.

Авидность суммарных мышиных АТ, полученных при иммунизации животных рекомбинантным SN без адъюванта, составила 13%, в присутствии адъюванта - 40%. В то же время авидность АТ против VP1 НВ без адъюванта равнялась 60%. Сходная картина получена для антител класса IgM. Таким образом, мыши, иммунизированные рекомбинантным SN, продуцировали АТ, взаимодействующие с этим белком, но авидность АТ оказалась ниже, чем у АТ против полноразмерного VP1 НВ.

4 Обсуждение

Норовирусный белок VP1 обладает несколькими функциями в составе вирусной частицы. Первая заключается в формировании капсида вируса.

Самосборка вирусных частиц идет за счет межмолекулярных контактов S домена белка VP1. При этом Р домен, стабилизируя вирусную частицу, несет основные антигенные детерминанты, распознаваемые иммунной системой. Однако, S домен, несмотря на то, что он в основном скрыт в глубине капсида, также несет ряд идентифицированных с помощью моноклональных антител В-клеточных антигенных детерминант [7,14,16]. Полученный нами рекомбинантный SN обладал способностью формировать вирусоподобные частицы, которые ожидаемо имели несколько меньший диаметр в сравнении с диаметром частиц, образуемых полноразмерным белком VP1 [6]. Анализ способности SN связываться с антителами крови волонтеров показал, что частота обнаружения АТ класса IgG против SN оказалась сопоставимой с частотой обнаружения АТ против полноразмерного белка. Более того, АТ против SN содержались в крови волонтеров несколько чаще, чем антитела против VP1. При этом они выявлялись у всех волонтеров, у которых обнаруживались АТ против VP1, что свидетельствует о согласованной наработке АТ к эпитопам S домена и полноразмерного VP1. Более высокая частота обнаружения АТ к SN видимо связана с наличием в крови волонтеров АТ к эпитопам, скрытым в структуре целой вирусной частицы, но открывающимся для антител в отсутствие Р домена. Выполненное ранее на основе анализа электронно-микроскопических изображений моделирование структуры ВПЧ, построенных из полноразмерного белка VP1 НВ, показало, что Р домен обладает высокой подвижностью. Это приводит к доступности участков S домена для распознавания антителами. Кроме того, в составе ВПЧ S может быть доступен антителам за счет частичного протеолиза VP1, приводящего к отщеплению домена Р [18].

Считается, что вирус-нейтрализующие антитела обычно имеют высокую, превышающую 50% авидность, позволяющую им выполнять свои антивирусные свойства [13, 10]. Авидность АТ к полученному нами рекомбинантному SN как в крови волонтеров, так и иммунизированных SN

мышей, оказалась для антител класса IgG ниже 50%, что предполагает их невысокую способность к нейтрализации вируса в отличие от АТ к полноразмерному VP1. То есть, SN несет В-клеточные эпитопы, взаимодействующие с антителами с авидностью, меньшей чем эпитопы полноразмерного VP1. Вероятно это связано с наличием в его структуре Р домена.

Заметим, что с применением анализа *in silico* в составе S домена идентифицировано несколько Т-клеточных эпитопов, презентруемых молекулами HLA I и II классов, то есть способных активировать как цитотоксический ответ Т-клеток, так и Т-хелперный ответ [21]. При этом S домен более консервативен в эволюционном плане, чем Р домен, что не удивительно, поскольку сохранение его структуры обеспечивает способность к формированию вирусного капсида. Одновременно консервативность структуры обеспечивает его способность к индукции иммунных реакций, направленных против норовирусов разных генотипов и разных геногрупп [9]. Это является важным свойством при потенциальном использовании рекомбинантных норовирусных ВПЧ в качестве основы вакцины не только для профилактики норовирусной инфекции, но и в качестве основы комбинированных вакцин, основанных на ВПЧ, построенных из химерных белков, включающих в свой состав SN. В результате выполнения настоящей работы получен рекомбинантный SN. Продемонстрировано, что в крови здоровых волонтеров присутствуют антитела классов IgM и IgG к данному белку, частота встречаемости которых коррелирует с частотой встречаемости антител к полноразмерному VP1 НВ. Мыши, иммунизированные рекомбинантным SN, нарабатывали антитела к этому белку, хотя их авидность была ниже авидности антител к полноразмерному VP1 НВ.

Полученные результаты подтверждают способность S домена VP1 норовируса к индукции иммунных реакций на примере рекомбинантного SN и указывают на возможность получения комбинированных вакцин на основе

291 химерных ВПЧ, направленных против разных инфекций, одна из которых
292 норовирусная.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Схема получения генетической конструкции для экспрессии SN в клетках *E. coli*.

Figure 1. Schematic of obtaining a genetic construct for SN expression in *E. coli* cells.

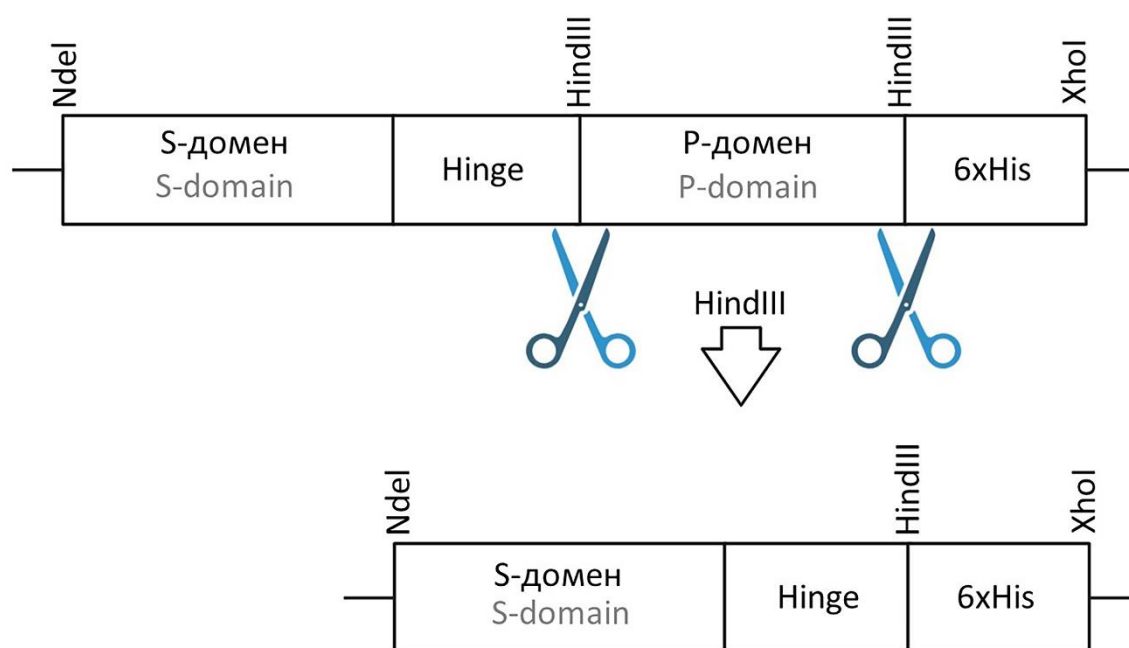


Рисунок 2а. Электрофореграммы хроматографически очищенных полноразмерного VP1 и белка SN НВ.

Figure 2a. Electrophoregrams of chromatographically purified full-length VP1 and SN norovirus protein.

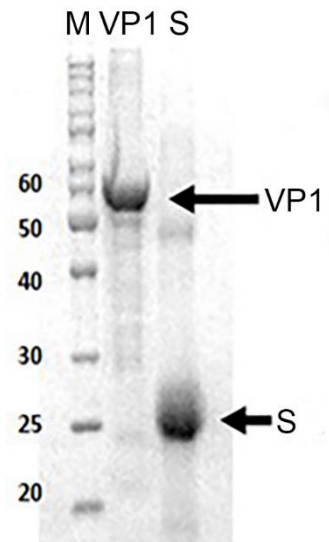


Рисунок 2б. Электронно-микроскопические фотографии ВПЧ, образованных рекомбинантным SN НВ.

Figure 2b. Electron microscopic photographs of VLP formed by recombinant SN norovirus.

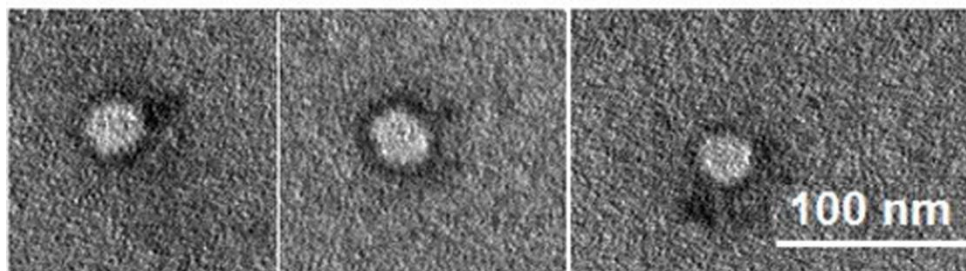


Рисунок 3. Трехмерные модели рекомбинантного SN (А) и рекомбинантного VP1 (Б).

Figure 3. Three-dimensional models of recombinant SN (A) and recombinant VP1 (B).

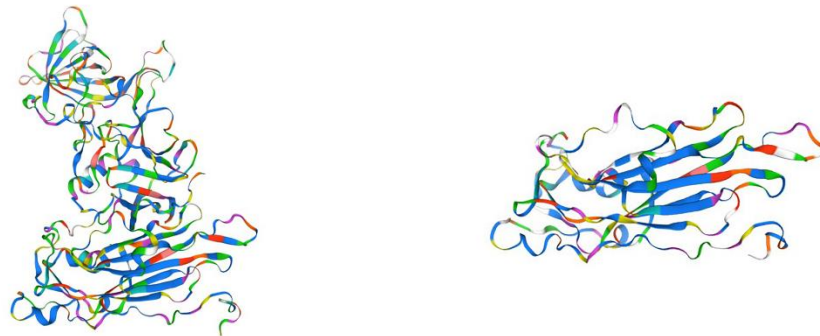
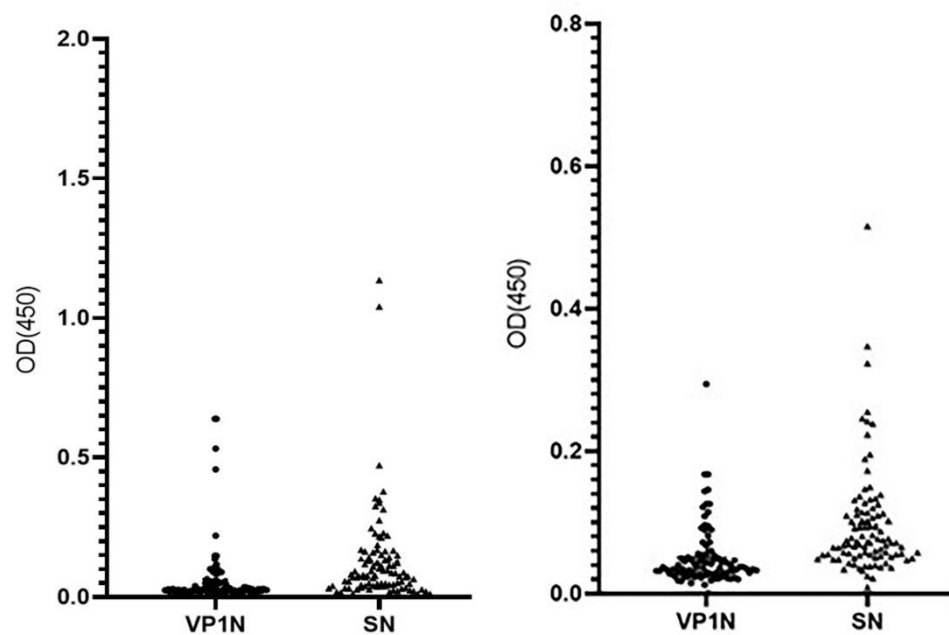


Рисунок 4. Точечная диаграмма результатов определения АТ класса IgG (А) и IgM (Б) к рекомбинантным белкам SN и VP1 НВ в крови волонтеров.

Figure 4. Dot plot of the results of IgG (A) and IgM (B) class antibodies to recombinant SN and VP1 norovirus proteins in the blood of volunteers.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Лапин Владислав Александрович – м.н.с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. академика. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

адрес: ул. Малая Ямская д. 71, Нижний Новгород, Россия;

телефон: 89101414550;

ORCID: [0000-0002-5905-5722](https://orcid.org/0000-0002-5905-5722)

e-mail: fridens.95@yandex.ru

Lapin Vladislav Alexandrovich – M.N.S. lab. Immunochemistry of the NNIEM named after Academician I.N. Blokhina of Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russia;

address: 71 Malaya Yamskaya Str., Nizhny Novgorod 603950, Russian Federation;

telephone: 89101414550;

ORCID: [0000-0002-5905-5722](https://orcid.org/0000-0002-5905-5722)

e-mail: fridens.95@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Новиков Дмитрий Викторович – к.б.н., в.н.с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. академика. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

ORCID: [0000-0001-7049-6935](https://orcid.org/0000-0001-7049-6935)

Novikov Dmitry Viktorovich – Candidate of Biological Sciences, V.N.S. lab. Immunochemistry of the NNIEM named after Academician I.N. Blokhina of Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russia;

ORCID: [0000-0001-7049-6935](https://orcid.org/0000-0001-7049-6935)

Мохонова Екатерина Валерьевна – н.с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. академика. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

ORCID: 0000-0002-9742-7646

Mokhonova Ekaterina Valeryevna – N.S. lab. Immunochemistry of the NNIEM named after Academician I.N. Blokhina of Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russia;

ORCID: 0000-0002-9742-7646

Мелентьев Дмитрий Александрович - м.н.с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. академика. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

ORCID: [0000-0002-2441-6874](https://orcid.org/0000-0002-2441-6874)

Melentyev Dmitry Alexandrovich - M.N.S. lab. Immunochemistry of the NNIEM named after Academician I.N. Blokhina of Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russia;

ORCID: [0000-0002-2441-6874](https://orcid.org/0000-0002-2441-6874)

Цыганова Мария Игоревна - к.б.н., в.н.с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. академика. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

ORCID: 0000-0002-2811-6844

Tsyganova Maria Igorevna - Candidate of Biological Sciences, V.N.S. lab. Immunochemistry of the NNIEM named after Academician I.N. Blokhina of Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russia;

ORCID: 0000-0002-2811-6844

Манакова Эльвира Александровна – к.м.н., директор по медицинской работе ООО «ТИАС ЛОТУС», Нижний Новгород, Россия

ORCID: 0000-0003-2317-2780

Manakova E.A., PhD (Medicine), Director of Medicine, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostic, LLC “Centralized laboratory “AVK Med”, Nizhny Novgorod, Russia;

ORCID: 0000-0003-2317-2780

Новиков Виктор Владимирович – д.б.н., проф., зав. лаб. иммунохимии
ННИИЭМ им. академика. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний
Новгород, Россия

ORCID: 0000-0002-2449-7213

e-mail: mbre@mail.ru

Novikov Viktor Vladimirovich – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head
of the laboratory. Immunochemistry of the NNIEM named after Academician I.N.
Blokina of Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russia;

ORCID: 0000-0002-2449-7213

e-mail: mbre@mail.ru

Блок 3. Метаданные статьи

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО S ДОМЕНА
ПОВЕРХНОСТНОГО БЕЛКА VP1 НОРОВИРУСА

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF THE RECOMBINANT S
DOMAIN OF THE NOROVIRUS VP1 SURFACE PROTEIN

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

S ДОМЕН БЕЛКА VP1 НОРОВИРУСА

S DOMAIN OF NOROVIRUS VP1 PROTEIN

Ключевые слова: норовирус, S домен VP1, вирусоподобные частицы, антитела, иммуноферментный анализ, вакцины.

Keywords: norovirus, S domain VP1, virus-like particles, antibodies, immunoassay, vaccines.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 10,

количество таблиц – 0,

количество рисунков – 4.

05.05.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1	Быков Р.О., Скрыбина С.В., Килячина А.С., Итани Т.М., Чалапа В.И., Старикова П.К., Колтунов С.В., Пономарева А.В., Семенов А.В. Молекулярно-генетическая характеристика и филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека отдельных муниципалитетов в Свердловской области за 2022 год. <i>Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии</i> . 2023. Т.100, № 4. С. 306–313.	Genetic characterization and phylogenetic analysis of human norovirus infection in individual municipalities of the Sverdlovsk region in 2022. <i>Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology</i> . 2023.	https://microbiol.crie.ru/jour/article/view/9992 [DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-402.]
2	Лاپин В.А., Новиков Д.В., Мохонова Е.В., Мелентьев Д.А., Цыганова М.И., Зайцев Д.Е., Новиков В.В. Получение рекомбинантного белка VP1 норовируса и его антигенные и иммуногенные свойства.	Production of recombinant norovirus VP1 protein and its antigenic and immunogenic properties <i>Journal of microbiology, epidemiology and</i>	https://microbiol.crie.ru/jour/article/view/18687 [DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-552]

	<i>Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии</i> . 2024. Т. 101, № 5. С. 661–667.	<i>immunobiology</i> . 2024, vol. 101, no. 5, pp. 661–667.	
3	Новиков Д. В., Мелентьев Д. А., Мохонов В. В., Кашников А. Ю., Новикова Н. А., Лапин В. А., Мохонова Е. В., Новиков В. В. Получение вирусоподобных частиц норовируса, содержащих VP1 эховируса 30. <i>Вопросы вирусологии</i> . 2021; 66(5):383–9.	Construction of norovirus (Caliciviridae: Norovirus) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (Piconaviridae: Enterovirus: Enterovirus B). <i>Problems of Virology</i> . 2021, vol. 66, no. 5, pp.383–9.	https://virusjour.crie.ru/jour/article/view/563 [DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-79 .]
4	Талаев В.Ю., Новиков Д.В., Заиченко И.Е., Светлова М.В., Воронина Е.В., Бабайкина О.Н., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., Новикова Н.А., Кашников А.Ю., Новиков В.В. Химерные вирусоподобные частицы, содержащие фрагмент белка шипа коронавируса, стимулируют	Coronavirus spike protein fragment-containing chimeric virus-like particles stimulate human dendritic cell maturation. <i>Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet</i> . 2024 vol. 14, no. 2, pp. 227–237.	https://iimmun.ru/iimm/article/view/17612 [DOI: 10.15789/2220-7619-CSP-17612]

	созревание дендритных клеток человека. <i>Инфекция и иммунитет</i> . 2024. Т 14, №2. 227–237.		
5	Beek J., de Graaf M., Al-Hello H., et al. Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. <i>Lancet Infect. Dis.</i> 2018, vol. 18, no. 5, pp. 545–553.		https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309918300598?via%3Dihub [DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30059-8.]
6	Bertolotti-Ciarlet A., White L.J., Chen R., et al. Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-Like Particles. <i>J Virol.</i> 2002, vol. 76, pp. 4044–4055.		https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.76.8.4044-4055.2002 [DOI: 10.1128/jvi.76.8.4044-4055.2002.]
7	Black R.E., Perin J., Yeung D., et al. Estimated global and regional causes of deaths from diarrhea in children younger than 5 years during 2000-21: a systematic review		https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(24)00078-0/fulltext [DOI:

	and Bayesian multinomial analysis. <i>Lancet Glob. Health</i> . 2024, vol. 12, no. 6, pp. 919–928.		https://doi.org/10.1016/S2214-109X(24)00078-02.]
8	Fang H., Tan M., Xia M., et al. Norovirus P particle efficiently elicits innate, humoral and cellular immunity. <i>PLoS ONE</i> . 2013, vol. 8, no. 4, pp. 63269.		https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063269 [DOI: 10.1371/journal.pone.0063269.]
9	Ford-Siltz L.A. Tohma K., Parra G.I. Understanding the relationship between norovirus diversity and immunity gut. <i>Microbes</i> . 2021, vol. 13, no. 1, pp. 1-13.		https://www.tandfonline.com/doi/10.1080/19490976.2021.1900994?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed#abstract [DOI: 10.1080/19490976.2021.1900994.]

10	Gulati U., Kumari K., Wu W., et al. Amount and avidity of serum antibodies against native glycoproteins and denatured virus after repeated influenza whole-virus vaccination. <i>Vaccine</i> . 2005, vol. 23, no. 11, pp.1414-1425.	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X04006802?via%3Dihub [DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.08.053]
11	Hasso-Agopsowicz M., Hwang A., Hollm-Delgado M.-G., et al. Identifying WHO global priority endemic pathogens for vaccine research and development (R&D) using multi-criteria decision analysis (MCDA): an objective of the Immunization Agenda 2030. <i>EBioMedicine</i> . 2024, vol. 110.	https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(24)00460-2/fulltext [DOI: 10.1016/j.ebiom.2024.105424.]
12	Jeon K., Lee S.K., Jeong S., et al. Trends in the detection of viruses causing gastroenteritis over a 10-year period and impact of	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653224000386?via%3Dihub [DOI:

	nonharmaceutical interventions. <i>J. Clin. Virol.</i> 2024, vol. 172, pp. 105676.		https://doi.org/10.1016/j.jcv.2024.105676.]
13)	Kanno A., Kazuyamal Y. Immunoglobulin G Antibody Avidity Assay for Serodiagnosis of Hepatitis C Virus Infection. <i>Journal of Medical Virology</i> . 2002, vol. 68, no. 2, pp. 229-33.		https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.10186?sid=nlm%3Apubmed [DOI: 10.1002/jmv.10186.]
14	Li X., Zhou R., Tian X. et al. Characterization of a cross-reactive monoclonal antibody against Norovirus genogroups I, II, III and V. <i>Virus Res.</i> 2010, vol. 151, no. 2, pp. 142-147.		https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170210001462?via%3Dihub [DOI: 10.1016/j.virusres.2010.04.005.]

15	Ludwig-Begall L.F., Mauroy A., Thiry E. Noroviruses — The State of the Art, Nearly Fifty Years after Their Initial Discovery. <i>Viruses</i> . 2021, vol. 13, no. 8, pp. 1541.		https://www.mdpi.com/1999-4915/13/8/1541 [DOI: 10.3390/v13081541.]
16	Parra G. I., Azure J., Fischer R. et al. Identification of a Broadly Cross-Reactive Epitope in the Inner Shell of the Norovirus Capsid. <i>PLoS One</i> . 2013, vol. 8, no. 6.		https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0067592 [DOI:10.1371/journal.pone.0067592]
17	Prasad B.V.V., Hardy M. E., et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. <i>Science</i> . 1999, vol. 286, pp. 287-290.		https://www.science.org/doi/10.1126/science.286.5438.287?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pu

			bmed [DOI: 10.1126/science.286.5438.287]
18	Smith H.Q., Smith T.J. The Dynamic Capsid Structures of the Noroviruses. <i>Viruses</i> . 2019, vol. 11, no. 3, pp. 235.		https://www.mdpi.com/1999-4915/11/3/235 [doi: 10.3390/v11030235.]
19	Xia M., Huang P., Sun C., et al. Bioengineered Norovirus S(60) Nanoparticles as a Multifunctional Vaccine Platform. <i>ACS Nano</i> . 2018, vol. 12, no. 11, pp. 10665-10682.		https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.8b02776 [DOI: 10.1021/acsnano.8b02776.]
20	Yoda T., Suzuki Y., Terano Y. et al. Precise Characterization of Norovirus (Norwalk-Like Virus)-Specific Monoclonal Antibodies with Broad Reactivity. <i>J Clin Microbiol</i> . 2003, vol. 41, no. 6, pp. 2367–2371.		https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.41.6.2367-2371.2003?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acr.ossref.org&rfr_dat=cr_pub++0

			pubmed [DOI: 10.1128/JCM.41.6.2367- 2371.2003.]
21	Zharova A.-M.D., Talayev V.Yu., Perenkov A.D., et al. In silico analysis of the antigenic properties of norovirus GII.4 Sydney [P16] VP1 proein. <i>Opera Med.Physiol.</i> 2023, vol. 10, no. 3, pp. 140-151.		https://operamedphys.org/content/silico-analysis-antigenic-properties-norovirus-gii4-sydney-p16-vp1-protein-0 [DOI: 10.24412/2500-2295-2023-3-140-151.]