

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-86-93

УДК 616.98:578.824.11

М.А. Ефимова^{1,2}, Р.М. Ахмадеев¹, А.Г. Галеева¹, А.Р. Валеева³, Н.Р. Мифтахов¹, М.Н. Мукминов^{3,4},
К.С. Хаертынов^{1,3}, Э.А. Шуралев^{2,3,4}

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА МЕТОДОМ ТРЕХФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЕГО АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», Казань, Российская Федерация;

³Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Казань, Российская Федерация;

⁴ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Российская Федерация

Цель работы – разработка методического подхода к выделению гликопротеина вируса бешенства с использованием трехфазной экстракции и характеристика его антигенных свойств. **Материалы и методы.** Инфекционную активность вируса бешенства (производственный штамм «Овечий» ГНКИ) после длительного хранения восстанавливали на белых мышах линии BALB/c. Штамм использовали для культивирования на клетках линии ВНК-21; культуральную жидкость концентрировали методом ультрацентрифугирования с последующим разделением ее по плавучей плотности в градиенте сахарозы, отбором визуально опалесцирующих зон, фазовым концентрированием, хроматографическим разделением на колонке ENrich™ SEC650 (Bio-Rad, США) и отбором мономерных фракций с высокой серологической активностью по результатам вестерн-блоттинга. **Результаты и обсуждение.** Показано, что предварительное механическое разрушение суспензии головного мозга, извлечение вирусосодержащего материала из клеточной суспензии путем последовательных этапов центрифугирования, разделение осадка, полученного в градиенте сахарозы, с дальнейшей очисткой фазовым концентрированием и хроматографическим разделением преципитата позволяет получать мономерный препарат с высокой серологической активностью. Данный подход позволил получить антиген, представляющий собой гликопротеин вируса бешенства с молекулярной массой 67 кДа и две его изоформы с молекулярной массой 60 и 54 кДа. Описанный подход можно рассматривать в качестве варианта выделения специфического антигена вируса бешенства при проведении работ по совершенствованию методов лабораторной диагностики. Полученный антиген является мономерным дискретом и содержит одну фракцию молекулярной массой 67 кДа. Результаты исследований подтверждают высокую специфичность антигена и его пригодность для конструирования иммуоферментных и иммунохроматографических тестов, получения специфических иммуноглобулинов, рецепторного изучения взаимодействия антиген/антитело, а также для оценки напряженности протективного иммунитета после вакцинации.

Ключевые слова: гликопротеин вируса бешенства, фазовая экстракция, вестерн-блоттинг, гель-фильтрационная хроматография.

Корреспондирующий автор: Галеева Антонина Глебовна, e-mail: antonina-95@yandex.ru.

Для цитирования: Ефимова М.А., Ахмадеев Р.М., Галеева А.Г., Валеева А.Р., Мифтахов Н.Р., Мукминов М.Н., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А. Выделение гликопротеина вируса бешенства методом трехфазной экстракции и характеристика его антигенных свойств. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 1:86–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-86-93

Поступила 09.01.2022. Отправлена на доработку 26.01.2022. Принята к публ. 15.02.2022.

М.А. Efimova^{1,2}, R.M. Akhmadeev¹, A.G. Galeeva¹, A.R. Valeeva³, N.R. Miftakhov¹,
M.N. Mukminov^{3,4}, K.S. Khaertynov^{1,3}, E.A. Shuralev^{2,3,4}

Isolation of Rabies Virus Glycoprotein Using Three-Phase Extraction and Characteristics of its Antigenic Properties

¹Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation;

²Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan, Russian Federation;

³Kazan State Medical Academy – affiliated branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Health of Russia, Kazan, Russian Federation;

⁴Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to develop an approach to isolation of rabies virus glycoprotein applying three-phase extraction and to characterize its antigenic properties. **Materials and methods.** Infectious activity of the rabies virus (production strain, “Ovine” GNKI) after long-term storage was restored on white BALB/c mice. The strain was used for cultivation on BHK-21 cells; the culture liquid was concentrated applying ultracentrifugation followed by separation by buoyant density in a sucrose gradient, selection of visually opalescent zones, phase concentration, chromatographic separation on an ENrich™ SEC650 column (Bio-Rad, USA) and selection of monomeric fractions with high serological activity according to the results of Western blotting. **Results and discussion.** We have demonstrated that preliminary mechanical destruction of brain suspension, extraction of the virus-containing material from the cell suspension through successive low-speed and high-speed centrifugation, separation of the sediment produced in sucrose gradient with further phase concentration and chromatographic separation of the precipitate allows to obtain monomeric antigenic preparations with high serological activity. This methodology has made it possible to obtain an antigen, which is rabies virus glycoprotein with a molecular weight of 67 kDa, and two of its isoforms, having molecular weights of 60 and 54 kDa. The described approach can be viewed as an option for isolation of the rabies virus specific antigen when improving laboratory diagnostics techniques. The resulting antigen is a monomeric discrete containing one fraction with a molecu-

lar weight of 67 kDa. The data obtained corroborate the high specificity of the antigen and its suitability for the design of enzyme immunoassay and immunochromatographic tests, production of specific immunoglobulins, the study of the antigen/antibody interaction, as well as for the assessment of the protective immunity intensity after vaccination.

Key words: rabies virus glycoprotein, phase extraction, Western blotting, gel filtration chromatography.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Antonina G. Galeeva, e-mail: antonina-95@yandex.ru.

Citation: Efimova M.A., Akhmadeev R.M., Galeeva A.G., Valeeva A.R., Miftakhov N.R., Mukminov M.N., Khaertynov K.S., Shuralev E.A. Isolation of Rabies Virus Glycoprotein Using Three-Phase Extraction and Characteristics of its Antigenic Properties. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 1:86–93. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-86-93

Received 09.01.2022. Revised 26.01.2022. Accepted 15.02.2022.

Efimova M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8786-1310>

Galeeva A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2650-6459>

Valeeva A.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5218-9341>

Mukminov M.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5996-0271>

Khaertynov K.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4764-560X>

Shuralev E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0650-3090>

Бешенство – особо опасная летальная зооантропонозная болезнь всех видов теплокровных животных, в том числе человека, характеризующаяся поражением центральной нервной системы. Возбудителем бешенства является РНК-содержащий вирус семейства *Rhabdoviridae*, рода *Lyssavirus*. В настоящее время установлено, что вирус бешенства имеет четыре серотипа [1]. Центральная нервная система является избирательным местом нахождения возбудителя бешенства. В наибольшем титре вирус обнаруживается в головном мозге (аммоновых рогах, мозжечке и продолговатом мозге), а также в слюнных железах, биоптатах кожи [2] и спинномозговой жидкости [3].

Эпизоотическая ситуация по бешенству животных в некоторых регионах Российской Федерации остается нестабильной, выявляются природные очаги, отмечается рост заболеваемости диких плотоядных животных, в эпизоотический процесс интенсивно вовлекаются домашние животные, создавая угрозу для людей [4]. В настоящее время одним из ключевых звеньев существующей тактики предупреждения распространения инфекции является вакцинация. Несмотря на значительный прогресс вакцинопрофилактики, проблема бешенства остается актуальной в связи с распространением инфекции среди диких животных – так называемого природного бешенства [5].

Диагноз «бешенство» ставится на основании комплекса эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований. Применяемые на сегодняшний день диагностические средства исключают возможность индикации возбудителя бешенства до манифестации клинических симптомов болезни. Прижизненное и посмертное подтверждение бешенства производится посредством диагностических методов, направленных на выявление цельного вириона, вирусных антигенов или нуклеиновых кислот в инфицированных тканях [6]. Точность выставления достоверного диагноза и определения напряженности иммунного ответа вакцинированных против бешенства диких и домашних животных требует наличия специфических антигенов и является важной составляющей для организации профилактических мероприятий. Расширение номенклатуры, повыше-

ние качества диагностических тест-систем остаются первостепенными задачами для лабораторной практики. Современные достижения биотехнологии позволяют получать высокоспецифичные антигенные препараты для дальнейшего совершенствования методов диагностики бешенства.

Перспективным направлением является конструирование вирусоподобных частиц (VLP), содержащих гликопротеины вируса бешенства (RVG) – наиболее активные видоспецифичные иммуногены [7, 8]. Гликопротеин вируса бешенства является единственным вирусным белком, обнаруженным в липидной оболочке. Эта молекула массой 65–67 кДа соответствует N-гликозилированному трансмембранному белку, является гликопротеином I типа, имеет тримерную структуру, распознает рецепторы и вызывает рН-индуцированное слияние мембран [9]. Он идентифицирован как основная детерминанта патогенности, участвующая в процессах почкования, аксонального оттока вириона во время инфекции, апоптоза и толерантности иммунной системы [10], а также в процессах блокирования активации дендритных клеток [11]. Более того, гликопротеин является основным антигеном, индуцирующим защитный иммунный ответ, который используется в коммерческих рекомбинантных вакцинах [12–14]. Также индукцию защитного ответа вызывает рибонуклеопротеин (RNP) вируса бешенства [15–17], однако именно гликопротеин играет ведущую роль в выявлении вируснейтрализующих антител (VNA) [18]. Данные о структуре гликопротеина, его антигенных свойствах, роли в патогенезе позволяют рассматривать его как базовый компонент для конструирования диагностических тест-систем [19].

В отечественной и зарубежной литературе есть сведения о способах получения очищенных антигенов вируса бешенства, основанных на дезинтеграции вирионов, наиболее широко применимыми среди которых являются ультрацентрифугирование в градиентах плотности сахарозы и хлористого цезия [20–22], обработка неионными и цвиттерионными детергентами [13] с последующей хроматографической очисткой [23, 24], однако изыскание доступных технологий выделения мономерных антигенных препаратов является по-прежнему актуальным направлением исследований.

Целью настоящей работы явилась разработка методического подхода к получению гликопротеина вируса с использованием трехфазной экстракции и характеристика его антигенных свойств.

Материалы и методы

Все стадии исследования соответствовали законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам и нормативным документам ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»).

Штамм вируса. В работе использовали производственный штамм фиксированного вируса бешенства «Овечий» ГНКИ органо-тканевого происхождения с инфекционным титром $5,25 \lg LD_{50}/0,1$ мл.

Репродукция вируса бешенства. Для повышения инфекционной активности вируса белых мышей линии BALB/c живой массой 6–7 г заражали интрацеребрально вирусом бешенства под ингаляционным наркозом (изофлуран). Мышей, павших с признаками неврологических нарушений через 5–8 суток после заражения, декапитировали, стерильно извлекали мозг и готовили 20 % суспензию в 0,05 М фосфатно-буферном растворе ($pH=7,2\pm 0,1$), которую дополнительно обрабатывали в стеклянном гомогенизаторе. С целью максимального механического разрушения мозговой ткани использовали прибор FastPrep®-24 Classic Instrument (MP Biomedicals, США) и пробирки Lysing Matrix E (MP Biomedicals, США) (режим обработки: скорость вибрации – 6,0 м/с, время обработки – 40 с). Механически разрушенную мозговую ткань осаждали центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5430 R (Eppendorf, Германия) при 5000 g в течение 10 мин при 4 °С для удаления разрушенных клеток, далее супернатант концентрировали ультрацентрифугированием на центрифуге Beckman L-7 Series Preparative ultracentrifuges (Beckman Coulter, США) при 180000 g в течение 1 часа. Осадок ресуспендировали в объеме, равном 1/10 части от исходного.

Для культивирования вируса бешенства использовали перевиваемую монослойно-суспензионную сублинию клеток почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/13 (Институт цитологии РАН, Россия) [25]; после накопления вируса в титре не менее $6,0 \lg LD_{50}/0,1$ мл при множественности инфицирования 0,01 MOI суспензию клеток осаждали путем центрифугирования при 3000 g и приступали к дальнейшей очистке.

Фракционирование в градиенте плотности сахарозы. Очистку вируса проводили в ступенчатом (10–60 %) градиенте сахарозы (Sigma, США) методом ультрацентрифугирования при 180000 g в течение 3 часов. Разделенные по плавучей плотности зоны опалесценции отбирали в отдельные флаконы. На каждом этапе очистки вируса проводили контроль с использованием вестерн-блоттинга для определе-

ния локализации серологически активных фракций. Для дальнейшего концентрирования вирусного материала после разделения по плавучей плотности использовали метод трехфазового концентрирования.

Фазовое разделение (экстракция) вирусного белка. В качестве фазовой системы использовали n-бутанол («Химпром», Россия) и насыщенный раствор сульфата аммония (НСА) («Ленреактив», Россия). К конечному супернатанту вирусосодержащего материала приливали НСА в соотношении 1:1 и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре, добавляли 2 объема n-бутанола, смесь энергично встряхивали, фазы разделяли центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5804 R (Eppendorf, Германия) при 3000 g в течение 40 мин при 15 °С. Смесь разделялась на три фазы: верхняя фаза содержала бутанол, средняя фаза представляла собой взвесь в виде тонкого диска-таблетки, нижняя фаза – раствор НСА. Верхнюю фазу удаляли, нижнюю фазу отбирали в отдельный флакон, к средней фазе после подсушивания добавляли 0,5 исходного объема 0,01 М трис-НСI буфера, встряхивали и получали опалесцирующий раствор, после чего оставляли на сутки при температуре 4–6 °С и центрифугировали 10 мин при 10000 g для удаления взвешенных частиц.

Гель-фильтрационная хроматография. В качестве метода разделения использовали гель-проникающую хроматографию, которую проводили на приборе NGC Quest 10 Plus System (Bio-Rad, США) с использованием колонки ENrich SEC 650 (в соответствии с протоколом), препарат для разделения вносили при помощи петли 250 мкл, элюцию проводили 0,01 М трис-НСI буфером ($pH 7,2$), детекцию осуществляли при длине волны 280 нм, фракции собирали на коллекторе фракций BioFrac (Bio-Rad, США) в объеме 500 мкл (скорость элюции – 1 мл/мин, давление – 600 psi). Концентрацию белка определяли на спектрофотометре UV5 (Mettler Toledo, Швейцария) при длине волны 280 нм. Контроль полученного материала осуществляли с использованием вестерн-блоттинга для определения локализации серологически активных фракций.

Анализ вирусных белков в SDS-PAGE и вестерн-блоттинге. Электрофоретический анализ проводили в 12,5 % полиакриламидном геле (ПААГ) на приборе Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad, США) по Лэммли [26]. Перенос разделенного в ПААГ материала на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 μm , Bio-Rad, США) осуществляли при помощи системы полусухого блоттинга Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, США). Вестерн-блоттинг проводили с антирабическими кроличьими иммуноглобулинами, выделенными из гипериммунной сыворотки, полученной против производственного штамма вируса бешенства «Овечий» ГНКИ (коллекция ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), в разведении 1:1000. В качестве отрицательного контроля использовали неиммунные кроличьи иммуноглобулины, в каче-

стве гетерологичного – кроличьи иммуноглобулины против болезни Ауески в аналогичном разведении.

Документирование результатов электрофореза и вестерн-блоттинга проводили на приборе Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США), статистическую обработку осуществляли при помощи программы Image Lab Software 6.0. Специфические иммунореактивные полипептиды определяли при помощи набора маркера молекулярной массы 6,5–200,0 кДа (Broad Range, Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение

Ранее проведенные исследования [27] по получению вирусного материала в градиенте плотности сахарозы (10–60 %) с последующим анализом при помощи электрофореза в 12,5 % ПААГ показали наличие большого количества белков, представляющих полипептидный состав клеточной суспензии как источника вируса бешенства. Установлено, что на фоне большого количества полипептидов доля специфических и серологически активных дискретов в процентном отношении к общему количеству белков оказалась мала из-за присутствия балластного материала. В то же время наблюдалась высокая серологическая активность полученного материала в зоне молекулярной массы 67 кДа, соответствующей гликопротеину. Результаты аналитического электрофореза очищенного в градиенте плотности сахарозы вируса бешенства, полученного из суспензии инфицированных клеток ВНК-21, и вестерн-блоттинга представлены на рис. 1.

Как видно из результатов вестерн-блоттинга, серологическая активность разделенного на ультрацентрифуге вирусного материала распределена в

зоне с 10 до 60 % сахарозы. Разделение материала по плавучей плотности не позволило добиться локализации серологической активности только в одной зоне. По всей видимости, на разделение вирусной массы по плавучей плотности повлияли три фактора: перегрузка разделяемого материала, рецепторная связь вирусного материала с клеточными структурами, отсутствие полной дезинтеграции клеток. Фракционированный материал, визуально представляющий четкие зоны опалесценции, был отобран и объединен для дальнейшей очистки.

Фазовая экстракция вирусного белка. Для достижения поставленной цели – получения очищенного вирусного препарата с более высокой дискретностью – нами взята за основу математическая модель фазовой экстракции белка [28, 29], которая позволяет минимизировать денатурирующие свойства органических растворителей (в случае их отдельного использования). В качестве фазовой системы использован *n*-бутанол/сульфат аммония, исходным материалом служили пять объединенных опалесцирующих зон (рис. 1) после фракционирования в градиенте плотности сахарозы.

В результате фазового концентрирования образовавшийся преципитат перемещался из двух несмешивающихся растворов в середину, которая была сформирована при низкоскоростном центрифугировании (тонкий диск-таблетка) и представляла собой десольбилизованный биологический материал. После удаления верхней и нижней фаз диск подсушивали и вносили 0,01 М трис-НСl буфер (pH 7,0±0,1) в половинном объеме от исходного, получали опалесцирующий раствор, инкубировали при температуре 4–6 °С и центрифугировали 10 мин при 10000 g для удаления взвешенных частиц. Результаты вестерн-

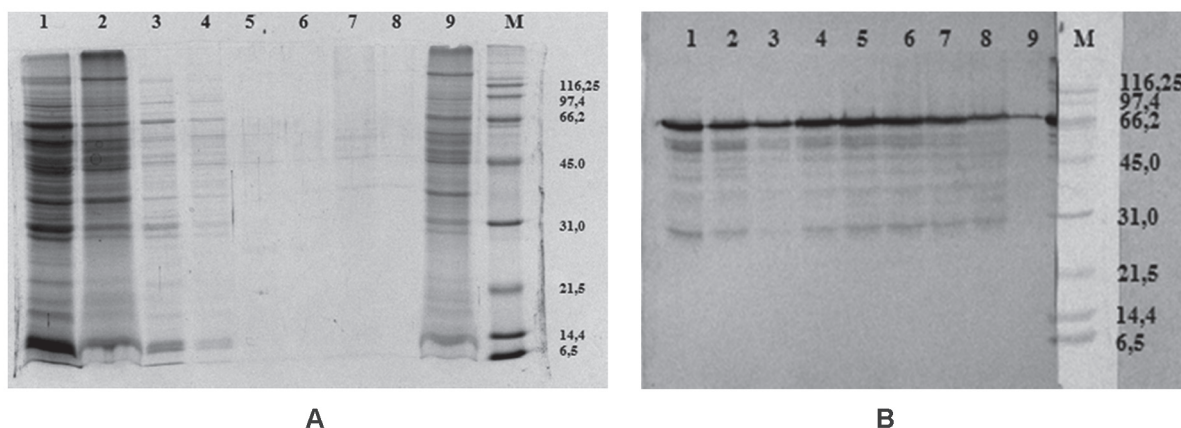


Рис. 1. Результаты аналитического электрофореза (А) и вестерн-блоттинга (В):

А – аналитический электрофорез вирусного материала, отобранного с зон 1–9 концентрации сахарозы: 1 – до 10 %; 2 – с 10 до 20 %; 3 – с 20 до 30 %; 4 – с 30 до 35 %; 5 – с 35 до 40 %; 6 – с 40 до 45 %; 7 – с 45 до 50 %; 8 – с 50 до 60 %; 9 – с 60 % до дна пробирки; М – маркер молекулярных масс Broad Range (Bio-Rad, США); В – вестерн-блоттинг разделенного по плавучей плотности осадка вирусного материала в ступенчатом градиенте сахарозы (10–60 %) с кроличьими иммуноглобулинами (разведение 1:1000): 1 – до 10 %; 2 – с 10 до 20 %; 3 – с 20 до 30 %; 4 – с 30 до 35 %; 5 – с 35 до 40 %; 6 – с 40 до 45 %; 7 – с 45 до 50 %; 8 – с 50 до 60 %; 9 – с 60 % до дна пробирки; М – маркер молекулярных масс Broad Range (Bio-Rad, США)

Fig. 1. Results of analytical electrophoresis (A) and Western blotting (B):

A – analytical electrophoresis of viral material taken from zones 1–9 of sucrose concentration: 1 – below 10 %; 2 – from 10 to 20 %; 3 – from 20 to 30 %; 4 – from 30 to 35 %; 5 – from 35 to 40 %; 6 – from 40 to 45 %; 7 – from 45 to 50 %; 8 – from 50 to 60 %; 9 – from 60 % to the bottom of the test tube; M – Broad Range molecular weight marker (Bio-Rad, USA); B – Western blotting of the viral material sediment separated by buoyant density in a stepwise sucrose gradient (10–60 %) with rabbit immunoglobulins (1:1000 dilution): 1 – below 10 %; 2 – from 10 to 20 %; 3 – from 20 to 30 %; 4 – from 30 to 35 %; 5 – from 35 to 40 %; 6 – from 40 to 45 %; 7 – from 45 to 50 %; 8 – from 50 to 60 %; 9 – from 60 % to the bottom of the test tube; M – Broad Range molecular weight marker (Bio-Rad, USA)

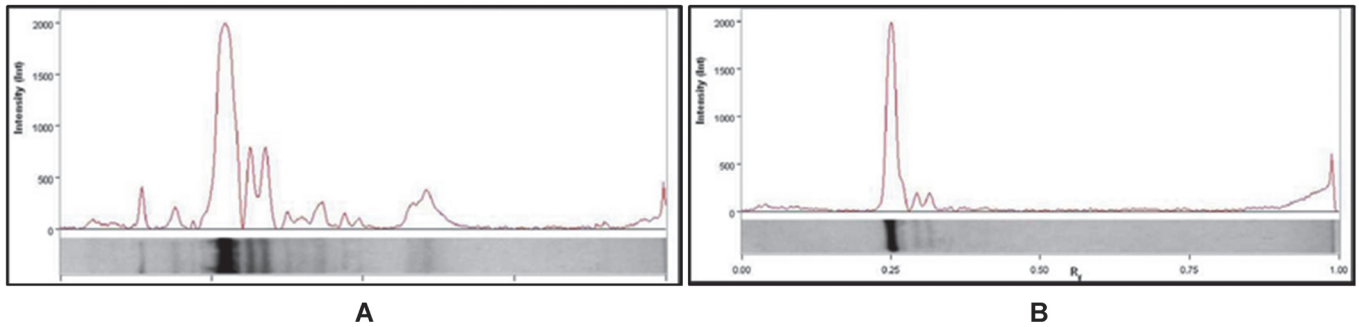


Рис. 2. Вестерн-блоттинг супернатанта фазового преципитата с кроличьими иммуноглобулинами, выделенными из гипериммунной сыворотки, полученной против производственного штамма вируса бешенства «Овечий» ГНКИ (коллекция ФЦТРБ-ВНИВИ): **A** – исходный вирусный материал; **B** – супернатант экстракта средней фазы

Fig. 2. Western blotting of the supernatant of the phase precipitate with rabbit immunoglobulins isolated from hyperimmune serum obtained against the production strain of the rabies virus “Ovine” GNKI (collection of the FCTRBS-ARRVI): **A** – original viral material; **B** – supernatant of the middle phase extract

блоттинга с использованием кроличьих иммуноглобулинов, выделенных из гипериммунных сывороток, полученных против производственного штамма вируса бешенства «Овечий» ГНКИ (коллекция ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») представлены на рис. 2.

В материале после фазового концентрирования определяются основной гликопротеин (67 кДа) и два пика с молекулярными массами 65 и 60 кДа, представляющие собой гликопротеины различной олигомеризации трансмембранных и цитоплазматических доменов. По всей видимости, это связано со свойствами сульфатных анионов, вызывающих в растворе белков конформационные изменения. На основании изучения серологической активности определены три антигена: один мажорный и два минорных, которые показали высокую специфичность. По сравнению с исходным вирусным материалом (рис. 2, A) очевидна эффективность использования метода трехфазной очистки.

Гель-фильтрационная хроматография. Анализ профиля белков. Материал после трехфазного концентрирования был разделен по молекулярным массам методом гель-фильтрации, результаты которой представлены на рис. 3.

Профиль элюции представлен двумя пиками, обозначенными № 1 и № 2 соответственно. Электрофоретический анализ пика № 1 в ПААГ показал, что гликопротеин, степень очистки которого составила >90 %, являлся мономером, представляющим одну четкую полосу молекулярной массой около 67 кДа; чистота и мономерность пика № 2 была аналогичной, однако концентрация – в 4–5 раз меньше. Фракционированный материал также проанализирован методом вестерн-блоттинга с использованием кроличьих иммуноглобулинов, очищенных по ранее описанной методике [27, 30]. Результаты представлены на рис. 4.

Выделенный гликопротеин представляет собой мономерный препарат с молекулярной массой 67 кДа, по серологическим характеристикам имеет иммунодоминантную активность с антирабическими иммуноглобулинами и не реагирует с отрицатель-

ными и гетерологичными иммуноглобулинами кролика. Олигомеры гликопротеина 67 кДа после трехфазовой очистки и концентрирования образовывали едва заметные полосы – реплики, соответствующие молекулярным массам 60 и 65 кДа.

С целью усовершенствования протокола препаративного выделения и наработки очищенного гликопротеина вируса бешенства нами испытано последовательное сочетание методик зонального ультрацентрифугирования, трехфазового концентрирования и гель-фильтрации. В результате использования процедуры трехфазового концентрирования получены высокоактивные антигены вируса бешенства, сопоставимые по чистоте и активности с антигенами, полученными после гель-фильтрации.

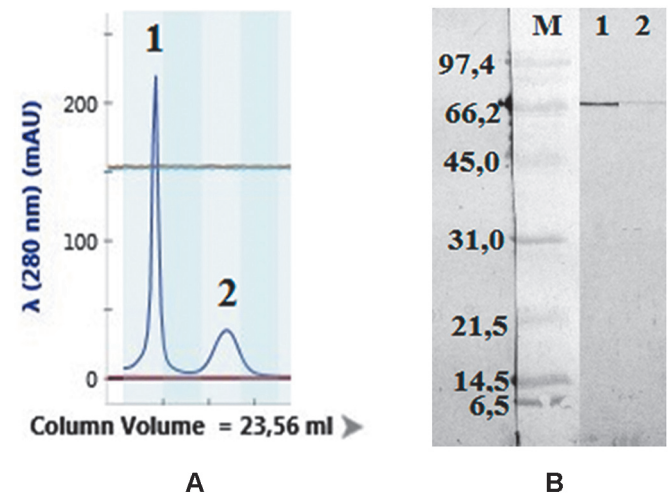


Рис. 3. Результат фракционирования вирусного материала: **A** – гистограмма гель-фильтрации (по оси абсцисс показано количество элюирующего буфера, прошедшего через колонку, по оси ординат – оптическая плотность, выраженная в единицах оптической плотности (OU) при длине волны 280 нм); **B** – вестерн-блоттинг: трек 1 – элюат № 1; трек 2 – элюат № 2; M – маркер молекулярных масс Broad Range (Bio-Rad, США)

Fig. 3. Result of viral material fractionation: **A** – gel filtration histogram (the abscissa shows the amount of elution buffer that passed through the column, the ordinate shows the optical density expressed in units of optical density (OU) at a wavelength of 280 nm); **B** – Western blotting: track 1 – eluate No. 1; track 2 – eluate No. 2; M – Broad Range molecular weight marker (Bio-Rad, USA)

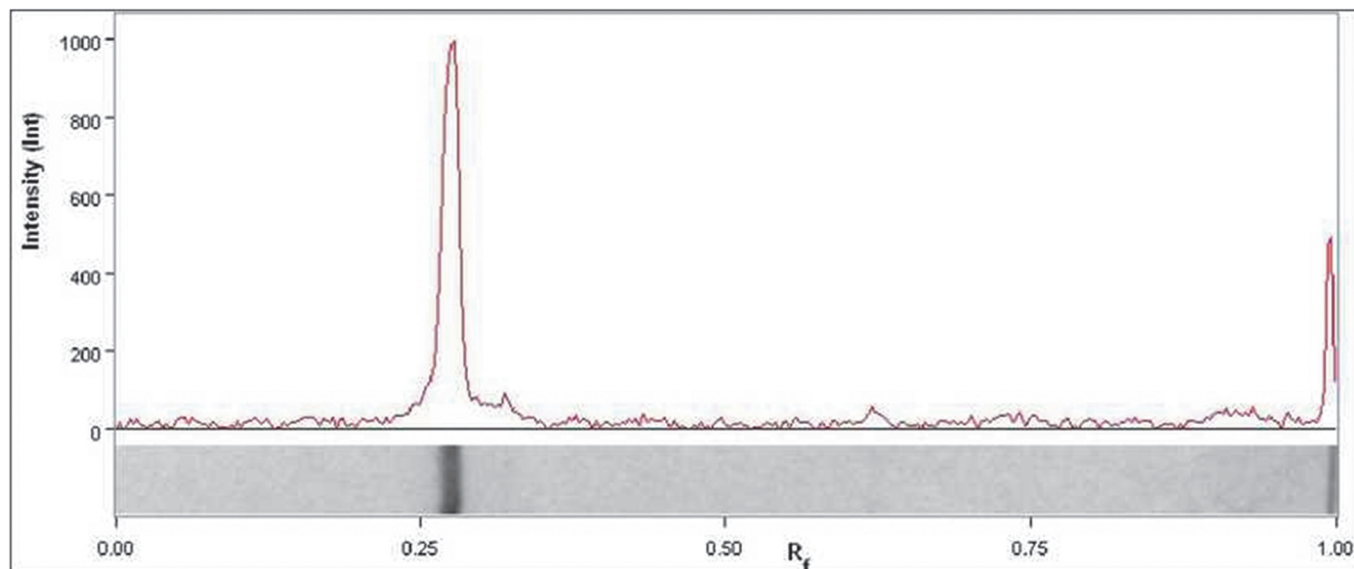


Рис. 4. Вестерн-блоттинг гликопротеиновой фракции после гель-фильтрации

Fig. 4. Western blotting of the glycoprotein fraction after gel filtration

На основании изучения серологической активности охарактеризованы три антигена: один мажорный и два минорных, которые показали высокую специфичность. Данные антигены представлены основным гликопротеином G (67 кДа) и двумя минорными полипептидами. Полученные результаты демонстрируют высокую степень чистоты выделенного гликопротеина и подтверждают его антигенную специфичность.

Полученные результаты являются важными для формирования технологических регламентов по наработке гликопротеина вируса бешенства. В соответствии с поставленными задачами упрощения процедуры получения очищенного гликопротеина без потери его антигенных и иммунохимических свойств возможно аргументированно исключить процесс гель-фильтрации. Кроме того, метод трехфазной экстракции совместим с другими методами, обладает преимуществом сочетания концентрирования и очистки за один-два этапа с минимальными трудозатратами.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Fooks A.R., Shipley R., Markotter W., Tordo N., Freuling C.M., Müller T., McElhinney L.M., Banyard A.C., Rupprecht C.E. Renewed public health threat from emerging lyssaviruses. *Viruses*. 2021; 13(9):1769. DOI: 10.3390/v13091769.
2. Elmgren L.D., Nadin-Davis S.A., Muldoon F.T., Wandeler A.I. Diagnosis and analysis of a recent case of human rabies in Canada. *Can. J. Infect. Dis.* 2002; 13(2):129–33. DOI: 10.1155/2002/235073.
3. Saengseesom W., Mitmoonpitak C., Kasempimolporn S., Sitprija V. Real-time PCR analysis of dog cerebrospinal fluid and saliva samples for ante-mortem diagnosis of rabies. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 2007; 38(1):53–7.
4. Shulpin M.I., Nazarov N.A., Chupin S.A., Korennoy F.I., Metlin A.Ye., Mischenko A.V. Rabies surveillance in the Russian Federation. *Rev. Sci. Tech.* 2018; 37(2):483–95. DOI: 10.20506/rst.37.2.2817.

5. Hicks D.J., Fooks A.R., Johnson N. Developments in rabies vaccines. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 169(3):199–204. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04592.x.
6. Mani R.S., Madhusudana S.N. Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances. *Sci. World J.* 2013; 2013:569712. DOI: 10.1155/2013/569712.
7. Fontana D., Kratje R., Etcheverrigaray M., Prieto C. Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells. *Vaccine*. 2014; 32(24):2799–804. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.031.
8. Kang H., Qi Y., Wang H., Zheng X., Gao Y., Li N., Yang S., Xia X. Chimeric rabies virus-like particles containing membrane-anchored GM-CSF enhances the immune response against rabies virus. *Viruses*. 2015; 7(3):1134–52. DOI: 10.3390/v7031134.
9. Gaudin Y., Ruigrok R.W., Tuffereau C., Knossow M., Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology*. 1992; 187(2):627–32. DOI: 10.1016/0042-6822(92)90465-2.
10. Morimoto K., Foley H.D., McGettigan J.P., Schnell M.J., Dietzschold B. Reinvestigation of the role of the rabies virus glycoprotein in viral pathogenesis using a reverse genetics approach. *J. Neurovirol.* 2000; 6(5):373–81. DOI: 10.3109/13550280009018301.
11. Li C., Zhang H., Ji L., Wang X., Wen Y., Li G., Fu Zh.F., Yang Y. Deficient incorporation of rabies virus glycoprotein into virions enhances virus-induced immune evasion and viral pathogenicity. *Viruses*. 2019; 11(3):218. DOI: 10.3390/v11030218.
12. Schnee M., Vogel A.B., Voss D., Petsch B., Baumhof P., Kramps T., Stütz L. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(6):e0004746. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004746.
13. Ramya R., Mohana Subramanian B., Sivakumar V., Senthilkumar R.L., Sambasiva Rao K.R.S., Srinivasan V.A. Expression and solubilization of insect cell-based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18(10):1673–9. DOI: 10.1128/CVI.05258-11.
14. Osakada F., Callaway E.M. Design and generation of recombinant rabies virus vectors. *Nat. Protoc.* 2013; 8(8):1583–601. DOI: 10.1038/nprot.2013.094.
15. Sokol F., Stancek D., Koprowski H. Structural proteins of rabies virus. *J. Virol.* 1971; 7(2):241–9. DOI: 10.1128/JVI.7.2.241-249.1971.
16. Koser M.L., McGettigan J.P., Tan G.S., Smith M.E., Koprowski H., Dietzschold B., Schnell M.J. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(25):9405–10. DOI: 10.1073/pnas.0403060101.
17. Masatani T., Ito N., Ito Yu., Nakagawa K., Abe M., Yamaoka S., Okadera K., Sugiyama M. Importance of rabies virus nucleoprotein in viral evasion of interferon response in the brain. *Microbiol Immunol.* 2013; 57(7):511–7. DOI: 10.1111/1348-0421.12058.
18. Faber M., Pulmanausahakul R., Hodawadekar S.S., Spitsin S., McGettigan J.P., Schnell M.J., Dietzschold B. Overexpression of the Rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis

and antiviral immune response. *J. Virol.* 2002; 76(7):3374–81. DOI: 10.1128/jvi.76.7.3374-3381.2002.

19. Gupta P.K., Sharma S., Walunj S.S., Chaturvedi V.K., Raut A.A., Patial S., Rai A., Pandey K.D., Saini M. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. *Vet. Microbiol.* 2005; 1:108(3-4):207–14. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.04.007.

20. Cox J.H., Dietzschold B., Schneider L.G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect. Immun.* 1977; 16(3):754–9. DOI: 10.1128/IAI.16.3.754-759.1977.

21. Dastkhosh M., Rahimi P., Haghight S., Biglari P., Howaizi N., Saghiri R., Roohandeh A. Cell culture extraction and purification of rabies virus nucleoprotein. *Jundishapur J. Microbiol.* 2014; 7(9):e11734. DOI: 10.5812/jjm.11734.

22. Smith G., Liu Y. Rabies glycoprotein virus-like particles (VLPs). 2012; WO/2012/061815.

23. Trabelsi K., Ben Zakour M., Kallel H. Purification of rabies virus produced in Vero cells grown in serum free medium. *Vaccine.* 2019; 37(47):7052–60. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.072.

24. Targovnik A.M., Ferrari A., Mc Callum G.J., Arregui M.B., Smith I., Bracco L.F., Alfonso V., Lopez M.G., Martinez-Solis M., Herrero S., Miranda M.V. Highly efficient production of rabies virus glycoprotein G ectodomain in Sf9 insect cells. *3 Biotech.* 2019; 9(11):385. DOI: 10.1007/s13205-019-1920-4.

25. Sokol F., Kuwert E., Wiktor T.J., Hummeler K., Koprowski H. Purification of rabies virus grown in tissue culture. *J. Virol.* 1968; 2(8):836–49. DOI: 10.1128/JVI.2.8.836-849.1968.

26. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

27. Ахмадеев Р.М., Ефимова М.А., Чернов А.Н., Мухамеджанова А.Г., Арсланова А.Ф., Шуралев Э.А., Хаертынов К.С., Никитин А.И., Макаев Х.Н. Способ получения антигена вируса бешенства для серологической диагностики. Патент РФ № 2694836. 14.12.2018, опубл. 17.07.2019. Бюл. № 20.

28. Asenjo J.A., Andrews B.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. *J. Chromatogr. A.* 2012; 18:1238:1–10. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.049.

29. Gaudin Y., Ruigrok R.W., Knossow M., Flamand A. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J. Virol.* 1993; 67(3):1365–72. DOI: 10.1128/JVI.67.3.1365-1372.1993.

30. Nadyrova A.I., Efimova M.A., Mukhamedzhanova A.G., Chernov A.N., Makaev H.N. Obtaining rabies virus purified antigen. *As. J. Pharm.* 2018; 12(4):1299–303. DOI: 10.22377/ajp.v12i04.2926.

References

1. Fooks A.R., Shipley R., Markotter W., Tordo N., Freuling C.M., Müller T., McElhinney L.M., Banyard A.C., Rupprecht C.E. Renewed public health threat from emerging lyssaviruses. *Viruses.* 2021; 13(9):1769. DOI: 10.3390/v13091769.

2. Elmgren L.D., Nadin-Davis S.A., Muldoon F.T., Wandeler A.I. Diagnosis and analysis of a recent case of human rabies in Canada. *Can. J. Infect. Dis.* 2002; 13(2):129–33. DOI: 10.1155/2002/235073.

3. Saengseesom W., Mitmoonpitak C., Kasempimolporn S., Sitprija V. Real-time PCR analysis of dog cerebrospinal fluid and saliva samples for ante-mortem diagnosis of rabies. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2007; 38(1):53–7.

4. Shulpin M.I., Nazarov N.A., Chupin S.A., Korennoy F.I., Metlin A.Ye., Mischenko A.V. Rabies surveillance in the Russian Federation. *Rev. Sci. Tech.* 2018; 37(2):483–95. DOI: 10.20506/rst.37.2.2817.

5. Hicks D.J., Fooks A.R., Johnson N. Developments in rabies vaccines. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 169(3):199–204. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04592.x.

6. Mani R.S., Madhusudana S.N. Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances. *Sci. World J.* 2013; 2013:569712. DOI: 10.1155/2013/569712.

7. Fontana D., Kratje R., Etcheverrigaray M., Prieto C. Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells. *Vaccine.* 2014; 32(24):2799–804. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.031.

8. Kang H., Qi Y., Wang H., Zheng X., Gao Y., Li N., Yang S., Xia X. Chimeric rabies virus-like particles containing membrane-anchored GM-CSF enhances the immune response against rabies virus. *Viruses.* 2015; 7(3):1134–52. DOI: 10.3390/v7031134.

9. Gaudin Y., Ruigrok R.W., Tuffereau C., Knossow M., Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology.* 1992; 187(2):627–32. DOI: 10.1016/0042-6822(92)90465-2.

10. Morimoto K., Foley H.D., McGettigan J.P., Schnell M.J., Dietzschold B. Reinvestigation of the role of the rabies virus glycoprotein in viral pathogenesis using a reverse genetics approach. *J. Neurovirol.* 2000; 6(5):373–81. DOI: 10.3109/13550280009018301.

11. Li C., Zhang H., Ji L., Wang X., Wen Y., Li G., Fu Z.H., Yang Y. Deficient incorporation of rabies virus glycoprotein into virions enhances virus-induced immune evasion and viral pathogenicity. *Viruses.* 2019; 11(3):218. DOI: 10.3390/v11030218.

12. Schnee M., Vogel A.B., Voss D., Petsch B., Baumhof P., Kramps T., Stitz L. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(6):e0004746. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004746.

13. Ramya R., Mohana Subramanian B., Sivakumar V., Senthilkumar R.L., Sambasiva Rao K.R.S., Srinivasan V.A. Expression and solubilization of insect cell-based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18(10):1673–9. DOI: 10.1128/CVI.05258-11.

14. Osakada F., Callaway E.M. Design and generation of recombinant rabies virus vectors. *Nat. Protoc.* 2013; 8(8):1583–601. DOI: 10.1038/nprot.2013.094.

15. Sokol F., Stancek D., Koprowski H. Structural proteins of rabies virus. *J. Virol.* 1971; 7(2):241–9. DOI: 10.1128/JVI.7.2.241-249.1971.

16. Koser M.L., McGettigan J.P., Tan G.S., Smith M.E., Koprowski H., Dietzschold B., Schnell M.J. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(25):9405–10. DOI: 10.1073/pnas.0403060101.

17. Masatani T., Ito N., Ito Yu., Nakagawa K., Abe M., Yamaoka S., Okadera K., Sugiyama M. Importance of rabies virus nucleoprotein in viral evasion of interferon response in the brain. *Microbiol Immunol.* 2013; 57(7):511–7. DOI: 10.1111/1348-0421.12058.

18. Faber M., Pulmanusahakul R., Hodawadekar S.S., Spitsin S., McGettigan J.P., Schnell M.J., Dietzschold B. Overexpression of the Rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.* 2002; 76(7):3374–81. DOI: 10.1128/jvi.76.7.3374-3381.2002.

19. Gupta P.K., Sharma S., Walunj S.S., Chaturvedi V.K., Raut A.A., Patial S., Rai A., Pandey K.D., Saini M. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. *Vet. Microbiol.* 2005; 1:108(3-4):207–14. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.04.007.

20. Cox J.H., Dietzschold B., Schneider L.G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect. Immun.* 1977; 16(3):754–9. DOI: 10.1128/IAI.16.3.754-759.1977.

21. Dastkhosh M., Rahimi P., Haghight S., Biglari P., Howaizi N., Saghiri R., Roohandeh A. Cell culture extraction and purification of rabies virus nucleoprotein. *Jundishapur J. Microbiol.* 2014; 7(9):e11734. DOI: 10.5812/jjm.11734.

22. Smith G., Liu Y. Rabies glycoprotein virus-like particles (VLPs). 2012; WO/2012/061815.

23. Trabelsi K., Ben Zakour M., Kallel H. Purification of rabies virus produced in Vero cells grown in serum free medium. *Vaccine.* 2019; 37(47):7052–60. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.072.

24. Targovnik A.M., Ferrari A., Mc Callum G.J., Arregui M.B., Smith I., Bracco L.F., Alfonso V., Lopez M.G., Martinez-Solis M., Herrero S., Miranda M.V. Highly efficient production of rabies virus glycoprotein G ectodomain in Sf9 insect cells. *3 Biotech.* 2019; 9(11):385. DOI: 10.1007/s13205-019-1920-4.

25. Sokol F., Kuwert E., Wiktor T.J., Hummeler K., Koprowski H. Purification of rabies virus grown in tissue culture. *J. Virol.* 1968; 2(8):836–49. DOI: 10.1128/JVI.2.8.836-849.1968.

26. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

27. Akhmadeev R.M., Efimova M.A., Chernov A.N., Mukhamedzhanova A.G., Arslanova A.F., Shuralev E.A., Khaertynov K.S., Nikitin A.I., Makaev Kh. N. [Method for obtaining rabies virus antigen for serological diagnostics]. Patent of the Russian Federation No. 2694836. 14.12.2018, publ. 17.07.2019. Bull. No. 20.

28. Asenjo J.A., Andrews B.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. *J. Chromatogr. A.* 2012; 18:1238:1–10. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.049.

29. Gaudin Y., Ruigrok R.W., Knossow M., Flamand A. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J. Virol.* 1993; 67(3):1365–72. DOI: 10.1128/JVI.67.3.1365-1372.1993.

30. Nadyrova A.I., Efimova M.A., Mukhamedzhanova A.G., Chernov A.N., Makaev H.N. Obtaining rabies virus purified antigen. *As. J. Pharm.* 2018; 12(4):1299–303. DOI: 10.22377/ajp.v12i04.2926.

Authors:

Efimova M.A. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety; Nauchny Gorodok-2, Kazan, 420075, Russian Federation. Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman; 35, Siberian Tract St., Kazan, 420029, Russian Federation.

Akhmadeev R.M., Galeeva A.G., Miftakhov N.R. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety. Nauchny Gorodok-2, Kazan, 420075, Russian Federation. E-mail: vnivi@vnivi.ru.

Valeeva A.R. Kazan State Medical Academy – affiliated branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Russian Ministry of Health. 11, Mushtari St., Kazan, 420012, Russian Federation.

Mukminov M.N. Kazan State Medical Academy – affiliated branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Russian Ministry of Health; 11, Mushtari St., Kazan, 420012, Russian Federation. Kazan (Volga Region) Federal University; 18, Kremlin St., Kazan, 420008, Russian Federation.

Khaertynov K.S. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety; Nauchny Gorodok-2, Kazan, 420075, Russian Federation. Kazan State Medical Academy – affiliated branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Russian Ministry of Health. 11, Mushtari St., Kazan, 420012, Russian Federation.

Shuralev E.A. Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman; 35, Siberian Tract St., Kazan, 420029, Russian Federation. Kazan State Medical Academy – affiliated branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Russian Ministry of Health; 11, Mushtari St., Kazan, 420012, Russian Federation. Kazan (Volga Region) Federal University; 18, Kremlin St., Kazan, 420008, Russian Federation.

Об авторах:

Ефимова М.А. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности; Российская Федерация, 420075, Казань, Научный городок-2. Казанская государственная академия ве-

теринарной медицины имени Н.Э. Баумана; Российская Федерация, 420029, Казань, ул. Сибирский Тракт, 35.

Ахмадеев Р.М., Галеева А.Г., Мифтахов Н.Р. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности. Российская Федерация, 420075, Республика Татарстан, Казань, Научный городок-2. E-mail: vnivi@vnivi.ru.

Валеева А.Р. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России. Российская Федерация, 420012, Казань, ул. Муштари, 11.

Мукминов М.Н. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»; Российская Федерация, 420012, Казань, ул. Муштари, 11. Казанский (Приволжский) федеральный университет; Российская Федерация, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18.

Хаертынов К.С. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности; Российская Федерация, 420075, Казань, Научный городок-2. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»; Российская Федерация, 420012, Казань, ул. Муштари, 11.

Шуралев Э.А. Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана; Российская Федерация, 420029, Казань, ул. Сибирский Тракт, 35. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»; Российская Федерация, 420012, Казань, ул. Муштари, 11. Казанский (Приволжский) федеральный университет; Российская Федерация, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18.