

На правах рукописи



Кудрявцев Александр Николаевич

**ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ
ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ
В ИММУНОАНАЛИЗЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» – обособленном подразделении Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук.

Научный руководитель: **Франк Людмила Алексеевна,**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Генералов Владимир Михайлович,**
доктор технических наук
Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская
область, р.п. Кольцово, ведущий научный сотрудник отдела
биофизики и экологических исследований

Матвеев Андрей Леонидович,
кандидат биологических наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук,
г. Новосибирск, старший научный сотрудник, заведующий
лабораторией противомикробных препаратов

Ведущая организация: Федеральное государственное образовательное
учреждение высшего образования «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ имени М.В.
Ломоносова), г. Москва

Защита состоится «10» февраля 2026 года в 11:00 на заседании диссертационного совета 24.1.228.03
на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный
исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской
академии наук» по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КНЦ СО РАН и на
сайте <https://www.ibp.ru/diser/diser.php>

Автореферат разослан «___» декабря 2025 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Дементьев Дмитрий Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Создание новых высокочувствительных и специфичных аналитических систем для биомедицинских приложений является одной из актуальных научных задач. Исследования по изучению фундаментальных основ биолюминесценции морских организмов проводятся в Институте биофизики СО РАН на протяжении почти 50 лет. Активно разрабатываются способы применения биолюминесценции в молекулярной аналитике: ферментативные реакции, лежащие в основе этого явления, обладают высоким квантовым выходом и способны обеспечить высокую чувствительность анализа. Ключевым ферментом большинства известных на сегодня биолюминесцентных систем морских животных являются целентеразин-зависимые люциферазы – сравнительно небольшие (16-35 кДа), как правило, одноцепочечные белки, катализирующие окисление субстрата – целентеразина (или его близких природных аналогов) молекулярным кислородом. К настоящему времени стали доступны рекомбинантные аналоги многих из этих люцифераз, получены их генетические аналоги с улучшенными свойствами и показана перспективность применения этих ферментов как высокочувствительных репортеров в различных аналитических системах, в том числе иммуноанализе.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) вызывает тяжелейшее нейроразболевание, поражающее центральную нервную систему и отличающееся полиморфизмом клинического течения. Он переносится иксодовыми клещами, ареал распространения которых – вся лесная и лесостепная зона умеренного пояса Евразийского континента, в том числе Сибирский регион Российской Федерации, Китай и Монголия. Современная эпидемиологическая ситуация в отношении КЭ характеризуется значительным ростом заболеваемости как в России, так и в мире.

Поскольку высокоэффективные этиотропные препараты для лечения до сих пор не созданы, единственной стратегией снижения заболеваемости КЭ является массовая вакцинопрофилактика населения эндемичных регионов. Несмотря на то, что разработаны эффективные и доступные вакцины для взрослых и детей, уровень вакцинации в европейских странах (около 25%) и России (менее 10%) остается недостаточным. Экстренная профилактика клещевого энцефалита, применяемая в России для невакцинированных укушенных пациентов, включает введение препарата иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита, полученного из сыворотки донорской крови. Однако она сопряжена с определенными биологическими рисками. Вместе с тем показано, что в среднем носителями вируса клещевого энцефалита являются лишь 5-10% клещей. В связи с этим возникает необходимость раннего выявления вируса в клещах, что могло бы существенно снизить вероятность возможных осложнений, связанных с необоснованной иммунопрофилактикой, и стать основой для своевременного терапевтического вмешательства.

В настоящее время для детекции ВКЭ в клещах используются коммерческие аналитические системы на основе колориметрического иммуноанализа или ОТ-ПЦР, производителями которых в России являются такие биотехнологические компании как Вектор-Бест и Микроген. Анализ клещей проводится квалифицированным персоналом в лабораториях, снабженных специализированным оборудованием. Доставка и анализ клещей из отдаленных районов занимает значительное время. Таким образом, задача разработки подходов, обеспечивающих быстрое и достоверное выявление ВКЭ, пригодных для применения, в том числе во внелабораторных условиях, является актуальной.

Степень разработанности темы исследования. Как следует из анализа научной литературы, а также результатов исследований, проводимых в Институте биофизики СО РАН, целентеразин-зависимые люциферазы широко используются как репортеры в анализе молекулярных мишеней в системах *in vitro* и *in vivo*. Показано, что их применение обеспечивает высокочувствительное выявление ряда диагностически важных биомолекул – гормонов,

инфекционных агентов, кардио- и онкомаркеров, олигонуклеотидов в иммуно- и гибридизационном анализе. Данные о биолюминесцентных диагностикумах, предназначенных для выявления ВКЭ, в литературе отсутствуют.

Целью исследования являлось создание систем биолюминесцентного иммунологического микронализа вириуса клещевого энцефалита в клещах с использованием преимуществ репортеров на основе ряда генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**:

- 1 Разработать способ получения целевых репортерных белков – гибридных производных генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз, изучить их свойства как потенциальных репортерных белков для выявления ВКЭ биолюминесцентным иммуноанализом.
- 2 Разработать способ выявления ВКЭ в клещах гетерогенным биолюминесцентным иммуноанализом с использованием гибридного производного генетически модифицированной люциферазы *Renilla muelleri* в качестве метки и оценить пригодность этого способа для тестирования природных клещей.
- 3 Разработать способ выявления ВКЭ в клещах гомогенным биолюминесцентным иммуноанализом на основе гибридных производных искусственной люциферазы NLuc и исследовать возможности его применения для экспрессного тестирования природных клещей.
- 4 Разработать готовый к использованию лиофилизированный реагент, включающий все компоненты реакционной смеси, для однофазного биолюминесцентного иммуноанализа ВКЭ в клещах.

Научная новизна. Получены и исследованы свойства ряда новых бифункциональных гибридных белков. Установлена перспективность их использования для быстрого выявления ВКЭ микропланшетным биолюминесцентным иммуноанализом. Разработан и испытан способ тестирования клещей однофазным биолюминесцентным иммуноанализом, пригодный для использования во внелабораторных условиях. Получен готовый к использованию лиофилизированный реагент, позволяющий одностадийно выявлять наличие ВКЭ в экстракте клеща.

Теоретическая и практическая значимость. Разработаны эффективные способы получения бифункциональных гибридных белков, обладающих свойствами исходных полипептидов – люцифераз, антител или антигенов. Получены препараты новых гибридных белков высокой степени чистоты и изучены их свойства: кинетические параметры биолюминесцентной реакции люциферазных доменов, аффинные свойства доменов анти-ВКЭ миниантитела и его антигенной детерминантой – рекомбинантного белка prED3.

Разработан способ твердофазного иммуноанализа ВКЭ в клещах на основе гибридного белка sc14D5a-Rm7 и проведены его успешные испытания при тестировании природных клещей.

Продемонстрирован эффект комплементации фрагментов искусственной люциферазы NLuc с восстановлением субстрат-зависимой биолюминесцентной реакции при сборке иммунокомплекса биоспецифичных доменов гибридных белков – анти-ВКЭ миниантитела и белка prED3. На основе выявленного эффекта разработан дизайн биолюминесцентного однофазного конкурентного иммуноанализа по выявлению ВКЭ.

Получен готовый к использованию реагент, включающий контрольные и рабочие смеси гибридных белков и субстрат люциферазы. Показана его применимость для достоверного выявления ВКЭ однофазным биолюминесцентным анализом.

Все результаты получены впервые и могут быть использованы для создания отечественных высокоэффективных и чувствительных биолюминесцентных диагностикумов для выявления ВКЭ

в клещах как в санитарно-эпидемиологических лабораториях, так и в полевых условиях. Предложенный подход однофазного анализа на основе комплементации фрагментов люциферазы NLuc может быть использован для детекции других молекулярных мишеней путем замены биоспецифических доменов гибридных белков-репортеров.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны способы получения высокоочищенных препаратов, генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз, генетически слитых с иммуноглобулинами или антигенами, изучены свойства этих гибридных белков как репортеров для иммуноанализа ВКЭ.
2. Биолюминесцентный твердофазный иммуноанализ ВКЭ в клещах на основе гибридного белка генетически модифицированной люциферазы Rm7 и миниантитела sc14D5a позволяет выявлять вирус с диагностической чувствительностью 100% и специфичностью 98,9%.
3. Однофазный конкурентный биолюминесцентный иммуноанализ ВКЭ на основе комплементации фрагментов искусственной люциферазы NLuc позволяет достоверно выявлять вирус в инфицированных природных клещах ($p=0,000013$, $N=86$).
4. Разработан и успешно испытан готовый к использованию лиофилизированный реагент, включающий все компоненты для однофазного биолюминесцентного иммуноанализа ВКЭ в клещах.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования – от постановки задач, проведения экспериментов и анализа полученных результатов до подготовки публикаций.

Степень достоверности и аprobация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждена достаточным объемом данных, а также выполнением работы с использованием современных методов исследования и статистического анализа.

Результаты работы были представлены в виде докладов и тезисов на следующих научных конференциях: 19-ом Международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (Цукуба, Япония, 2016); Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018); Всероссийской мультиконференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2019); 9-ом съезде Российского фотобиологического общества (п. Шепси, 2021); Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 2022); 13-ой международной научной конференции «Биокатализ: фундаментальные исследования и применения» (Сузdalь, 2023); на семинарах лаборатории фотобиологии и лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий Института биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН.

Исследования проводили при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (проект № 16-44-240648); Сибирского отделения Российской академии наук в рамках Междисциплинарного интеграционного проекта № 139 и государственного бюджета, выделенного на фундаментальные исследования в Российской академии наук: проекты № VI 57.1.1, № 0356-2016-0712 и № 0287-2022-0002.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе: 7 статей в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных изданий и журналов (Scopus, WoS, Белый список) и рекомендованных ВАК; 8 публикаций в сборниках докладов научных конференций; 4 патента РФ.

Структура и объем работы. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста и

включает: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы (172 источника, из них 163 иностранных). Диссертационная работа содержит 7 таблиц и 40 рисунков.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности **1.5.6. Биотехнология** по п. 7. и п. 22.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Плазмиды, содержащие генетические конструкции, кодирующие рекомбинантные белки, в том числе и гибридные, получены коллегами лаборатории фотобиологии и лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН к.б.н. Л.П. Бураковой и к.б.н. Е.Е. Денисовой (Башмаковой). Плазмида, несущая ген люциферазы NLuc, кодон-оптимизированный для экспрессии в бактериальных клетках, синтезирована фирмой Evrogen (Россия). Люцифераза была разделена генетически на большой (NLucL, N-конец NanoLuc, 17,6 кДа) и малый (NLucS, C-конец NanoLuc, 11 а.о.) фрагменты, как рекомендовано в [Dixon et al., 2016], без дополнительных мутаций. Рекомбинантные штаммы *E. coli* получали стандартной процедурой трансформации компетентных клеток BL21 Codon Plus (DE3) и Rosetta-gami2 (Novagen, США) соответствующими плазмидами.

Моноклональные мышиные иммуноглобулины (клоны 1B1 и 14D5) к белку E вируса клещевого энцефалита получены от ЗАО «БИОСАН», Россия. Белок prED3 (третий домен белка E, капсидного белка ВКЭ) получен по [Байков с соавт., 2018]; модифицированную люциферазу NanoLuc(C164S)LCTPSR получали, как описано в [Krasitskaya et al., 2013]; модифицированную люциферазу *Renilla muelleri* (Rm7) получали, как описано в работе [Burakova et al., 2015]; рекомбинантный Ca^{2+} -зависимый целентеразин-связывающий белок Renilla (CBP) получали, как описано в работе [Titushin et al., 2008]. Рекомбинантный стрептавидин – экспрессией в созданном нами штамме-продуценте *E. coli* /pET19b-SAV [Патент РФ №2728652, 2020] разработанным нами способом [Башмакова с соавт., 2020].

Синтетический целентеразин (CTZ) был получен от Prolume Ltd. (Pinetop, США). Синтетический фуримазин (FMZ) – от TargetMol (США).

Чистоту препаратов при выделении белков контролировали электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% SDS по методу Лэммли.

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически с помощью набора DC Protein Assay (Bio-Rad) по протоколу производителя.

Экстракти природных клещей были получены от Центра гигиены и эпидемиологии Красноярского края. Более 40% исследованных образцов экстрактов было приготовлено из целых клещей самостоятельно. Клещи для исследований предоставлены добровольцами, а также работниками ветеринарных клиник г. Красноярска. ВКЭ в клещах выявляли колориметрическим иммуноанализом с использованием «Набора реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита D-1154» (Вектор Бест, Россия).

В качестве антигена использовали вакцину Клещ-Э-Вак, содержащую инактивированный вирус клещевого энцефалита, штамм Софын (рабочий титр не менее 1:128) производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН (Россия).

Экспрессию целевых белков проводили в трансформированных соответствующими плазмидами клетках *E. coli* штамм Rosetta-gami2, которые культивировали в LB-среде, содержащей 200 мг/л ампциллина, при активном перемешивании при 37°C до $\text{OD}_{590} = 0,6-0,7$. Далее культуру охлаждали до 23°C, индуцировали 0,5 мМ ИПТГ и культивировали при 23°C в течение 20 ч. Клетки

осаждали центрифугированием (4000 g, 20 мин), разрушали ультразвуковой обработкой, центрифугировали и очищали целевые белки хроматографией на колонке HisTrap Ni-NTA Agarose.

Биолюминесцентный сигнал люцифераз измеряли с помощью кюветного люминометра (модель БЛМ 8802, СКТБ "Наука", Красноярск), а также планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 8.1, статистического программного обеспечения STATISTICA 12 (Statsoft, Россия).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 Получение и свойства новых гибридных белков – биоспецифичных репортёров для биолюминесцентного иммуноанализа ВКЭ

В состав гибридных белков, полученных в работе (Рис. 1), в качестве биоспецифичной части входит одноцепочечное миниантитело sc14D5a (м.м. 27 кДа), которое с высокой аффинностью связывает капсидный гликопротеин Е вируса ВКЭ ($\text{Каф} = 8,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Этот белок состоит из вариабельных участков тяжелой и легкой цепей V_H и V_L мышиных моноклональных антител 14D5, соединенных гибким линкером. Антитело было получено в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН на основе моноклонального антитела 14D5, которое, в свою очередь, получено иммунизацией мышей одним из дальневосточных типов ВКЭ. Ряд гибридных белков в качестве биоспецифичной части содержал белок prED3 (м.м. 11,6 кДа) – домен D3 капсидного белка Е вируса ВКЭ, антигеннную детерминанту миниантитела sc14D5a.

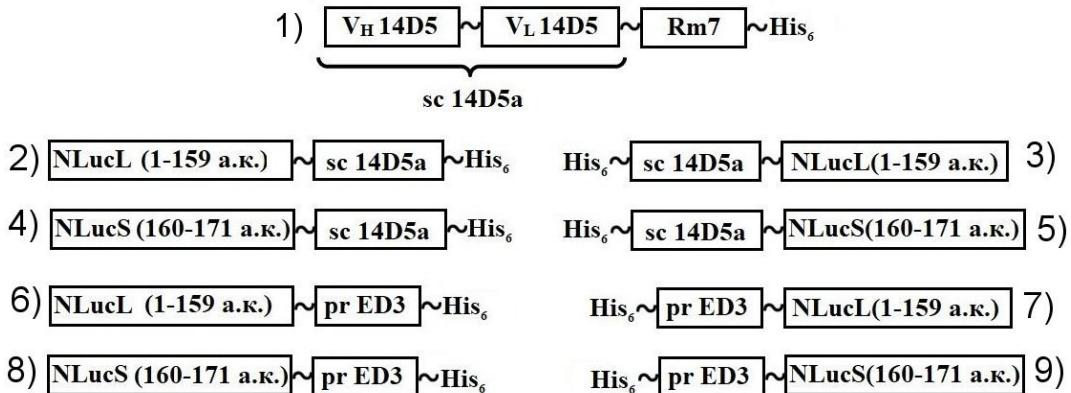


Рис. 1. Доменный состав полученных гибридных белков.

В качестве сигнальной части гибридов использовали люциферазу Rm7, термостабильный вариант люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri*, полученную в ИБФ СО РАН, а также фрагменты искусственной люциферазы NLuc. Сигнальную и специфическую части гибридных белков соединяли гибким линкером (GGS)₄ в случае получения гибрида с люциферазой Rm7, либо (GGS)₅ в случае гибридов с фрагментами люциферазы NLuc.

Все белки содержали полигистидиновый фрагмент His₆, благодаря чему их очистку проводили металл-аффинной хроматографией.

2.2 Получение и свойства гибридного белка sc14D5a-Rm7

В ходе эмпирического поиска были получены образцы грубой очистки гибридов

миниантитела и люциферазы Rm7 с разной последовательностью доменов и пептида His₆, в которых определяли активность домена Rm7. Было установлено, что максимальной активностью люциферазы обладает гибрид, в котором к домену антитела по его С-концу присоединены домены люциферазы и His₆ (Рис. 1, белок № 1). Этот белок использовали в последующих экспериментах. Бактериальный синтез целевых гибридных белков должен обеспечивать их получение в значительном количестве. Важно при этом, чтобы каждый из доменов формировал правильную функционально активную структуру «родительских» белков, обеспечивая бифункциональные свойства гибридов. В рамках нашего исследования для бактериального синтеза sc14D5a-Rm7 использовали два варианта генетических конструкций, обеспечивающих локализацию: (а) в периплазматическом пространстве клеток *E. coli*, штамм BL21 Codon Plus (DE3) RIPL, окислительный потенциал которого и наличие ферментов дисульфидизомеразной системы обеспечивают образование дисульфидной связи в миниантителе (для этого ген целевого белка включал последовательность, кодирующую лидерный пептид отрA); (б) в цитоплазме клеток *E. coli* Rosetta gami2, содержащих мутированные гены тиоредоксин редуктазы и глутатион редуктазы, которые активируют образование дисульфидных связей в белках. Выход белка, выделяемого из периплазматического пространства клеток *E. coli* BL21 (Рис. 2А), составил 0,02-0,03 мг на литр культуры. Значительное количество белка локализовано в виде нерастворимой фракции телец включения, однако гибрид из этой фракции не обладает биолюминесцентной активностью.

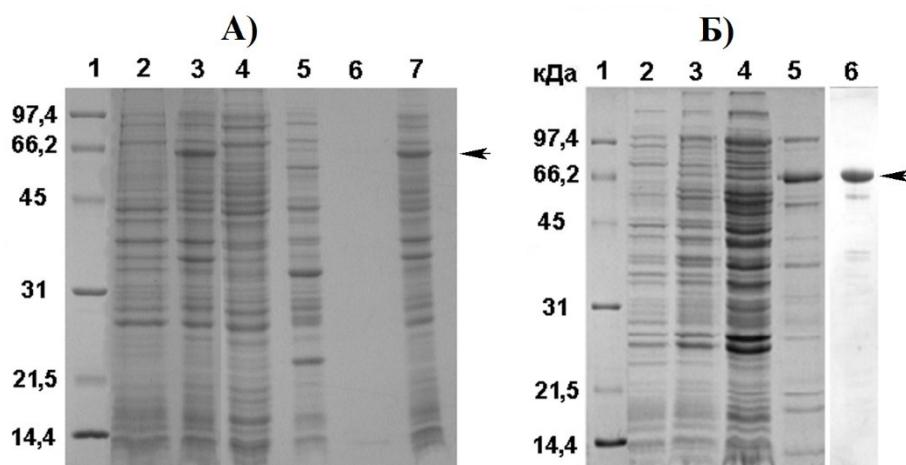


Рис. 2. Электрофореграммы белковых препаратов при выделении гибридного белка sc14D5a-Rm7 из клеток А) штамма BL21 Codon Plus (DE3) RIPL и Б) *E. coli* Rosetta-gami2: 1 – стандартные белки маркеры молекулярной массы; 2, 3 – клеточные белки до и после ИПТГ индукции; 4 – цитоплазматическая фракция; 5, 6 – препараты после первой и второй хроматографий; 7 – экстракт телец включения в 6 М мочевину. Стрелками показана полоса целевого гибридного белка.

Очевидно, перенос белка в периплазму затруднен из-за его высокой мол. массы (65,5 кДа) или особенностей его пространственной структуры. Выход белка из цитоплазмы клеток Rosetta gami2 составил 2-3 мг на литр культуры; чистота препарата – 87% (Рис. 2Б), белок обладает целентеразин-зависимой биолюминесцентной активностью. Каталитические свойства домена люциферазы изучены при взаимодействии с двумя формами субстрата – целентеразином (CTZ) и Ca²⁺- зависимым целентеразин-связывающим белком Renilla (CBP) (Рис. 3). В Табл. 1 приведены значения кинетических параметров этой реакции в сравнении с таковыми для рекомбинантной люциферазы Rm7.

Необходимо заметить, что биолюминесцентная реакция люциферазы протекает с определенным квантовым выходом и полученные по биолюминесценции значения кинетических параметров следует считать кажущимися (термин, который далее опускаем).

Таблица 1. Кинетические параметры биолюминесцентной реакции Rm7 и 14D5a-Rm7 с разными формами субстрата

Параметр	Люцифераза Rm7		14D5a-Rm7	
	Целентеразин	СВР	Целентеразин	СВР
K_M	3,98	0,61	0,91	0,43
V_{max}	8664	4073	588	1094
k_{cat}	656	2715	44,5	729
k_{cat}/K_M	164,8	4451	48,9	1696

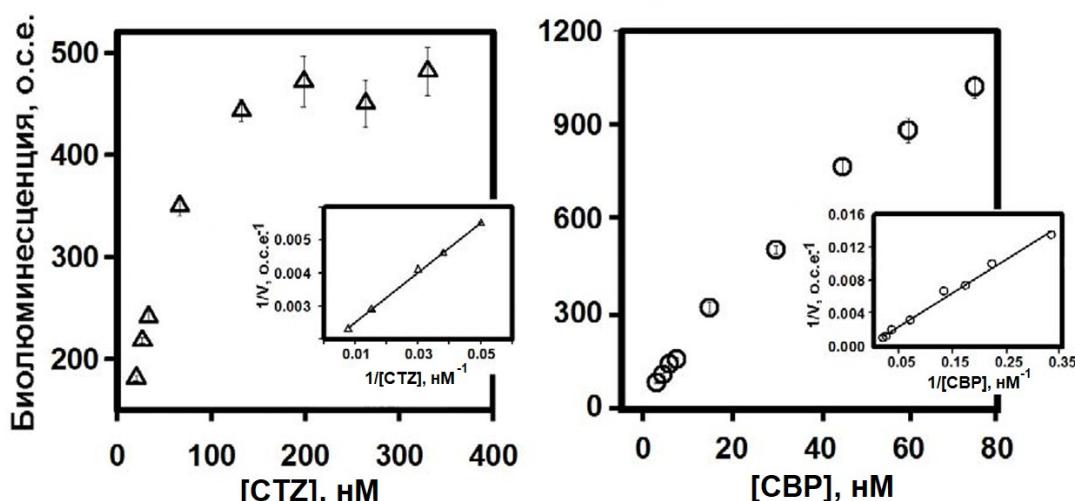


Рис. 3. Зависимость биолюминесцентного сигнала sc14D5a-Rm7 от концентрации целентеразина (CTZ, слева) и СВР (справа). Каждая точка – среднее от трех измерений. На врезках – графики Лайнуивера-Берка. о.с.е. – относительные световые единицы.

Из таблицы видно, что для обоих белков значение k_{cat} , отражающее число оборотов фермента в единицу времени, а также параметр k_{cat}/K_M существенно выше для случая СВР, чем для свободного целентеразина, что свидетельствует в пользу более высокой эффективности биолюминесцентной реакции. Таким образом, использование СВР как субстрата в разрабатываемой тест-системе имеет определенные преимущества по сравнению со «свободным» целентеразином.

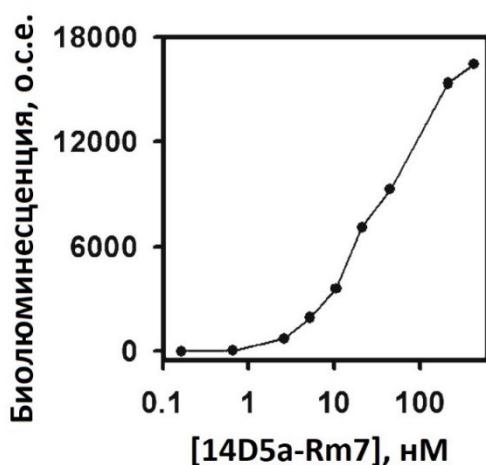


Рис. 4. Биолюминесцентный сигнал гибридного белка, связавшегося с рекомбинантным белком Е ВКЭ, иммобилизованным на поверхности пластика.

При изучении аффинных свойств гибрида на поверхность лунок микропланшета сорбировали рекомбинантный белок Е ВКЭ, а затем вносили растворы гибридного белка разной концентрации. Полученную зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации гибрида (Рис. 4) использовали для расчета константы аффинности белка. Полученное значение константы аффинности $K_{\text{аф}} = 2,65 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ близко к таковому для исходного рекомбинантного антитела мыши sc14D5a – $1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, рассчитанному с помощью технологии SPR (Baikov et al., 2021).

Таким образом, нами получен бифункциональный гибридный белок sc14D5a-Rm7, домены которого обладают специфическими свойствами, близкими к таковым исходных белков – биолюминесцентной активностью люциферазы и способностью миниантитела sc14D5a связывать капсидный белок Е вируса.

2.3 Твердофазный биолюминесцентный иммуноанализ ВКЭ на основе белка sc14D5a-Rm7

Аналитический потенциал гибридного белка 14D5a-Rm7 как репортера в твердофазном иммуноанализе ВКЭ изучали с помощью модельных экспериментов по выявлению гликопротеина Е параллельно биолюминесцентным методом и с помощью коммерческого колориметрического набора Вектор Бест на основе пероксидазы хрена (Рис. 5).

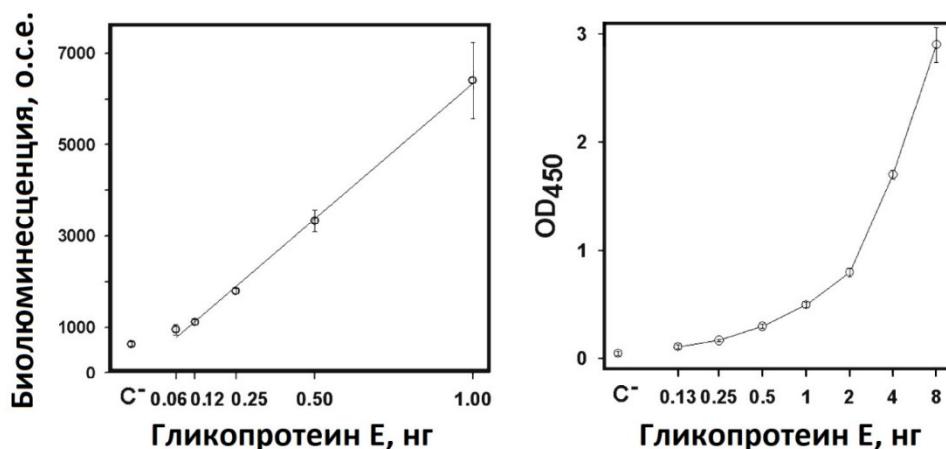


Рис. 5. Биолюминесцентный (слева) и колориметрический (справа) твердофазный иммуноанализ гликопротеина Е. о.с.е. – относительные световые единицы; OD_{450} – оптическая плотность образца при длине волны 450 нм. Каждая точка – среднее значение \pm стандартное отклонение, $N=3$.

Сигнал биолюминесцентного репортера линейно зависит от концентрации белка Е в диапазоне 0,015-1 нг, ($R^2=0,997$). Используя эту зависимость как калибровочную, определили предел обнаружения аналита как среднее значение от контрольного отрицательного образца (С-) плюс 2 стандартных отклонения. Оно составило 0,056 нг. Это в 4,5 раза ниже предела обнаружения колориметрического определения – 0,25 нг.

Результаты биолюминесцентного иммуноанализа ВКЭ сравнили с таковыми анализа на основе ОТ-ПЦР. Клещи, искусственно инфицированные ВКЭ (5 особей), и «здоровые» клещи (3 особи), предоставленные Омским НИИ природно-очаговых инфекций, параллельно тестировали методом РТ-ПЦР (набор Вектор Бест D-1154) и биолюминесцентным иммуноанализом (Рис. 6).

Колориметрическое исследование не выявило вируса ни в одном из этих образцов. Результаты биолюминесцентного и ПЦР-анализа совпали. По данным последнего, биолюминесцентный анализ позволяет определять около 10^4 - 10^5 вирусных частиц, что составляет около 1 пг вирионов. При этом он гораздо проще, дешевле и быстрее – сигнал от образца

интегрируется всего 5 секунд. Высокопроизводительный планшетный формат позволяет одновременно анализировать от 8 (отдельный стрип) до 96 (стандартный иммунологический микропланшет) образцов.

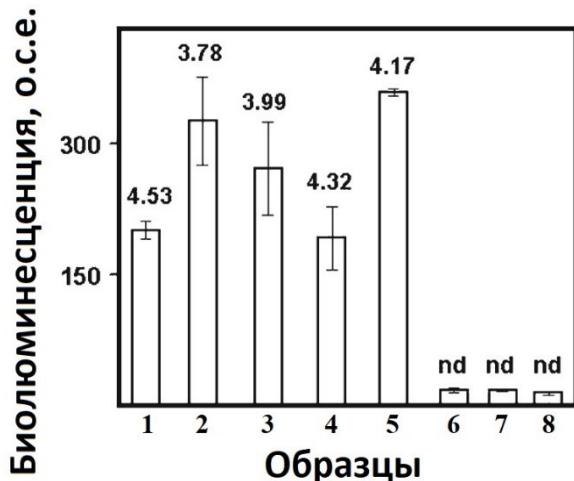


Рис. 6. Анализ экстрактов ВКЭ-инфицированных (№ 1-5) и «здоровых» (№ 6-8) клещей. Колонки показывают величину биолюминесцентного сигнала. Числа над колонками – логарифм количества копий РНК ВКЭ, определенных с помощью ОТ-ПЦР в соответствующих образцах. nd – отсутствие сигнала. Каждая колонка – среднее значение \pm стандартное отклонение, $N=3$. o.c.e. – относительные световые единицы.

Тестирование природных клещей на наличие ВКЭ проводили твердофазным иммуноанализом по схеме, представленной на Рис. 7: в лунки планшета, активированные мышими анти-ВКЭ антителами, вносили анализируемый образец и метку последовательно, инкубировали и промывали лунки на каждой стадии, а затем добавляли субстрат – свежеприготовленный раствор целентеразина или раствор СВР Renilla в буфере, содержащем CaCl_2 .

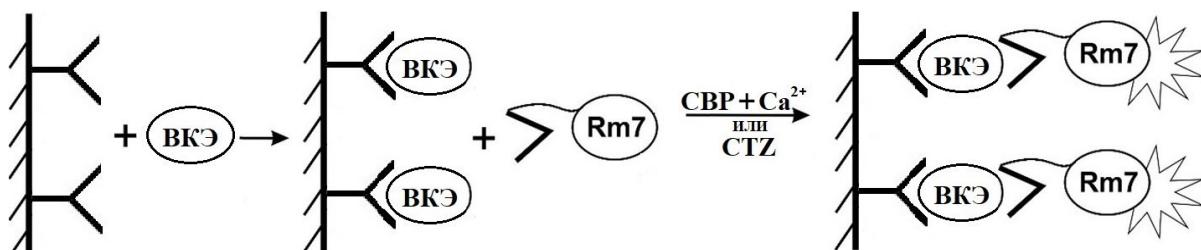


Рис. 7. Твердофазный биолюминесцентный анализ ВКЭ.

В 2016 г. было исследовано 502 клеща, из них, по данным колориметрического анализа, 15 образцов содержали ВКЭ. В качестве субстрата использовали СВР и, для сравнения, около 30% из этих же образцов анализировали с использованием свежеприготовленного раствора СТЗ. В качестве критерия наличия вируса использовали значение дискриминационного фактора Δ , равного отношению биолюминесцентного сигнала от образца к сигналу контрольного негативного образца (С-, набор D-1154, Вектор Бест, Россия). При $\Delta \geq 1$ образец считали ВКЭ-положительным. Все образцы параллельно были исследованы с помощью набора для колориметрического иммуноанализа, результаты которого принимали как истинные.

Таблица 2. Выявление ВКЭ твердофазным биолюминесцентным способом в природных клещах с запуском биолюминесценции разными субстратами (2016 г.)

Субстрат	Δ , ВКЭ-/С-	Δ , ВКЭ+/С-	Δ , С+/С-
СТЗ	$1,41 \pm 0,25$, n=157	$4,86 \pm 2,4$, n=14	$24,3 \pm 3,6$, n=4
СВР	$1,15 \pm 0,28$, n=487	$2,8 \pm 0,8$, n=15	$5,2 \pm 1,33$, n=9

Возможность замены плохо растворимого в водных средах и подверженного автоокислению целентеразина на стабильный, хорошо растворимый субстрат СВР делает анализ с его использованием более удобным для рутинного применения. В то же время, его получение требует дополнительных трудозатрат по получению и выделению активированного целентеразином СВР. Кроме того, как видно из Табл. 2, в целом значение D у образцов, исследованных с помощью СТЗ, выше, чем с СВР. Тестирование клещей в последующие сезоны было проведено с применением СТЗ (Табл. 3).

Таблица 3. Выявление ВКЭ в природных клещах твердофазным биолюминесцентным иммуноанализом

Год	D , образец-/С-	D , образец+/С-	С+/С-
2017	$1,1 \pm 0,3$ (n=414)	$5,3 \pm 1,1$ (n=4)	$16,6 \pm 5,8$ (n=17)
2019	$0,9 \pm 0,32$ (n=96)	6,84 (n=1)	$42,6 \pm 14,9$ (n=3)
2020	$1,07 \pm 0,27$ (n=124)	$3,17 \pm 1,02$ (n=4)	$30,1 \pm 6,3$ (n=3)
2021	$1,11 \pm 0,39$ (n=155)	$4,66 \pm 0,17$ (n=2)	$18,3 \pm 6,2$ (n=2)
2022	$0,88 \pm 0,39$ (n=104)	2,65 (n=1)	$9,6 \pm 2,3$ (n=2)
2023	$0,81 \pm 0,30$ (n=124)	2,5 (n=1)	$10,2 \pm 3,3$ (n=3)

Всего нами исследовано более 1500 образцов экстрактов клещей, из которых положительными оказались 28, т.е. около 2%.

Полученное по результатам 2017-2023 сезонов значение диагностической чувствительности биолюминесцентного способа выявления ВКЭ составило 100%. Специфичность анализа составила 98,9 %, т.е. ложноположительными оказались 17 образцов. Нельзя исключить, что это обусловлено более высокой чувствительностью биолюминесцентного анализа.

В целом, по сравнению с колориметрическим иммуноанализом ВКЭ в клещах биолюминесцентный при равной чувствительности проводится быстрее: сигнал измеряется в течение 5 сек, в процедуре отсутствуют стадии инкубирования субстрата фермента, а также добавления стоп-реагента (2M H₂SO₄). По сравнению с анализом на основе ОТ-ПЦР предложенный способ существенно проще, поскольку не требует специального оборудования, ферментов и высокой квалификации персонала.

2.4 Получение и свойства гибридных белков, включающих фрагменты люциферазы NLuc

Синтез гибридных белков, содержащих домен того же антитела к ВКЭ и фрагменты NLuc – искусственного варианта целентеразин-связывающей люциферазы *Oplophorus gracilirostris*, проводили в клетках *E. coli* Rosetta-gami2, трансформированных соответствующими плазмидами, с локализацией целевых белков в цитоплазме (белки, включающие sc14D5a, №№ 2-5, Рис. 1) либо из телец включений (белки, включающие prED3 №№ 6-9, Рис. 1). Как было показано выше, такой вариант экспрессии обеспечивал правильный фолдинг домена миниантитела. Всего было получено 8 вариантов гибридных белков, отличающихся последовательностью доменов (белки №№ 2-9, Рис. 1). Для примера на Рис. 8 и 9 приведены результаты электрофоретического анализа белковых фракций при выделении 4-х из перечисленных гибридных белков, из которого видно, что в результате очистки получены препараты высокой чистоты.

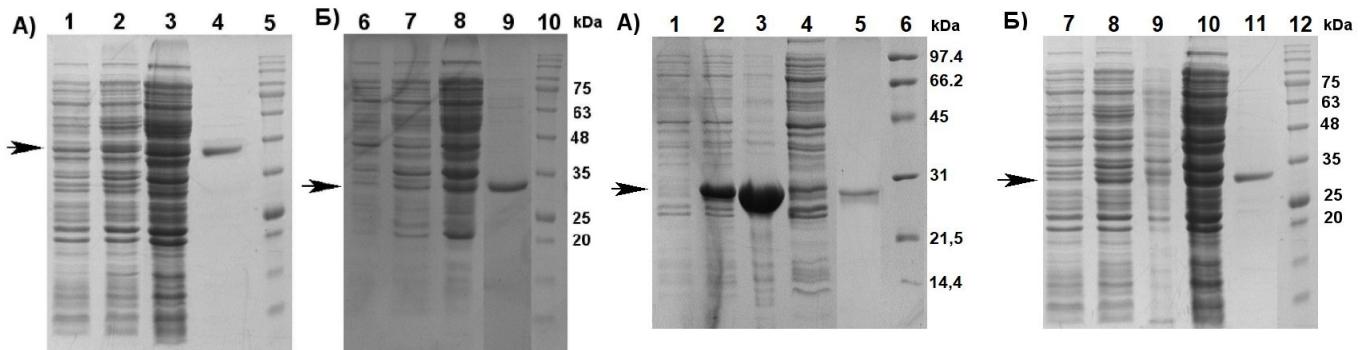


Рис. 8. Электрофореграммы белковых препаратов при выделении гибридных белков *sc14D5a-NLucL* (А) и *NLucS-sc14D5a* (Б): 1, 6 и 2, 7 – клеточные белки до и после ИПТГ-индуциции, соответственно; 3 и 8 – белки цитоплазматической фракции; 4 и 9 – образцы после очистки; 5 и 10 – маркеры молекулярных масс. Стрелками показаны полосы целевых гибридных белков.

Рис. 9. Электрофореграммы белковых препаратов при выделении гибридных белков: *prED3-NLucL* (А) и *sc14D5a-NLucS* (Б). Дорожки: 1, 7 и 2, 8 – клеточные белки до и после ИПТГ-индуциции, соответственно; 3, 9 – экстракты телец включения в 6 М мочевину; 4, 10 – белки цитоплазматической фракции; 5, 11 – белки после очистки; 6, 12 – маркеры молекулярных масс. Стрелками показаны полосы целевых гибридных белков.

Гибридные белки, содержащие малый С-концевой фрагмент люциферазы (NLucS), состоящий из 11 аминокислотных остатков, биолюминесцентной активностью не обладали. Белки, содержащие большой N-концевой фрагмент люциферазы (NLucL), обладали слабой фуримазин-активируемой биолюминесценцией, интенсивность которой составляла 0,005% от таковой полноразмерной NLuc.

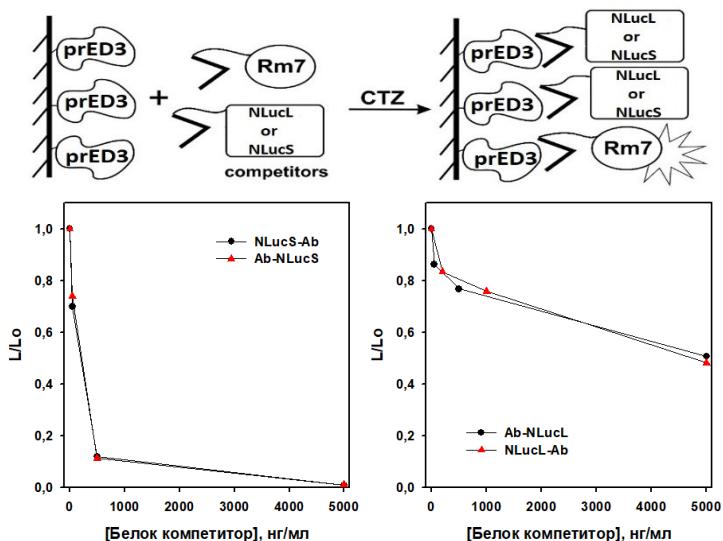


Рис. 10. Твердофазный конкурентный анализ связывания исследуемых гибридных белков в конкуренции с аналогичным гибридом люциферазы *Renilla* (*Rm7*) с белком-мишенью *prED3*. *Ab* – антитело *sc15D5a*.

Антиген-связывающую способность гибридных белков, включающих домен миниантитела, демонстрировали с помощью твердофазного анализа конкурентного типа (Рис. 10). В лунки, активированные белком *prED3*, вносили смеси белка *sc14D5a-Rm7* и в качестве компетиторов за связывание с антигеном – исследуемые гибридды в разной концентрации. Как видно из рисунка 10,

при увеличении концентрации исследуемых гибридов наблюдается падение биолюминесцентного сигнала, что свидетельствует о том, что миниантитело в составе соответствующих гибридных белков конкурирует с белком sc14D5a-Rm7 за связывание с prED3, и образующиеся при этом на поверхности комплексы не обладают биолюминесценцией.

Связывание домена prED3 в составе белков №№ 6-9 с антителом твердофазным анализом, как показано на Рис. 11. Как можно видеть, антиген prED3 связывается с анти-ВКЭ антителами 14D5a и 14D5, о чем свидетельствуют СТЗ-зависимые биолюминесцентные сигналы Rm7 (Рис. 11А) и фрагмента NLucL (Рис. 11Б).

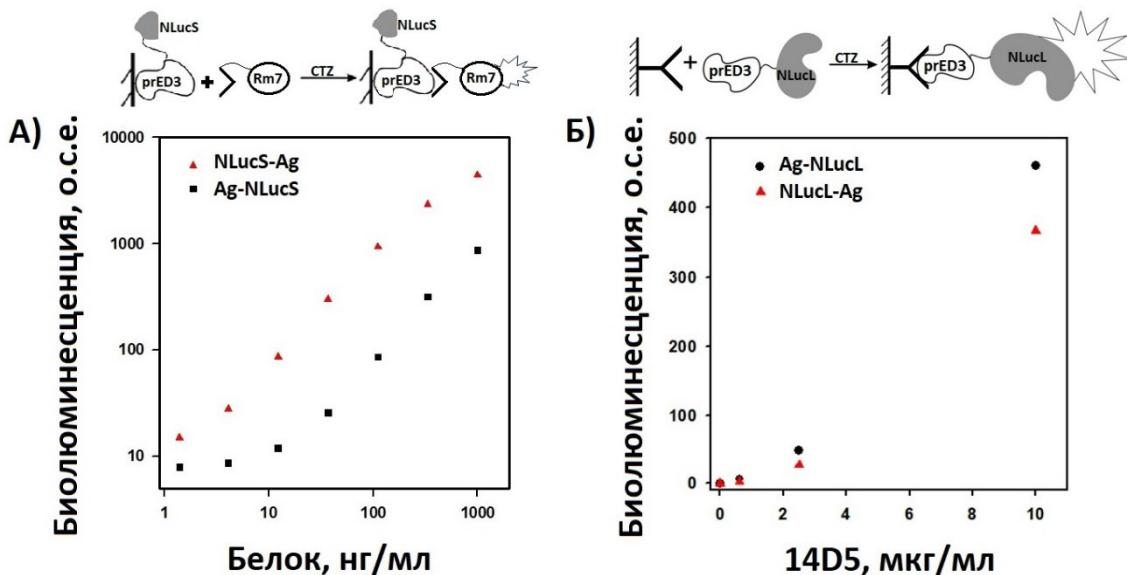


Рис. 11. Твердофазный биолюминесцентный анализ связывания со специфичным антителом гибридных белков, включающих домен prED3: А) – гибиды с малым фрагментом люциферазы NLucS выявляли по биолюминесцентному сигналу 14D5a-Rm7; Б) – комплексы специфичного антитела 14D5 и гибридов prED3 с большим фрагментом NLucL выявляли благодаря его остаточной биолюминесценции.

2.5 Однофазный конкурентный биолюминесцентный анализ ВКЭ-ассоциированных мишеней

Восемь возможных вариантов эквимолярных бинарных смесей гибридных белков, включающих разные комбинации доменов sc14D5a, prED3, NLucS и NLucL, исследовали на восстановление фуримазин-зависимой биолюминесцентной активности фрагментов люциферазы, сближенных при образовании комплекса антиген-антитело (Рис. 12). Максимальная величина сигнала была получена в случае пары sc14D5a-NLucS + prED3-NLucL, что свидетельствует о наиболее оптимальном сближении и взаимной ориентации фрагментов люциферазы, обеспечивающих восстановление биолюминесцентной активности. Эта пара гибридов была использована для последующих экспериментов.

При близкой кинетике сигнала, 5-секундная интегральная биолюминесценция полученного комплекса составляет 2,4% от таковой исходной полноразмерной люциферазы (Рис. 13А). Кинетические параметры биолюминесцентной реакции комплекса в присутствии фуримазина, а также СВР (Рис. 13 Б, В) в сравнении с таковыми исходной полноразмерной люциферазы приведены в Табл. 4. Можно видеть, что значение k_{cat} для смеси sc14D5a-NLucS + prED3-NLucL, отражающее число оборотов фермента в единицу времени, а также параметр k_{cat}/K_m , характеризующий эффективность реакции при использовании СВР, существенно ниже, чем для свободного фуримазина. Это свидетельствует о более низкой эффективности реакции «собранной» люциферазы

с этим субстратом. Очевидно, что для эффективного окисления целентеразина в составе СВР требуется образование специфического белкового комплекса, чего не происходит в случае собранной люциферазы в комплексе sc14D5a-NLucS + prED3-NLucL.

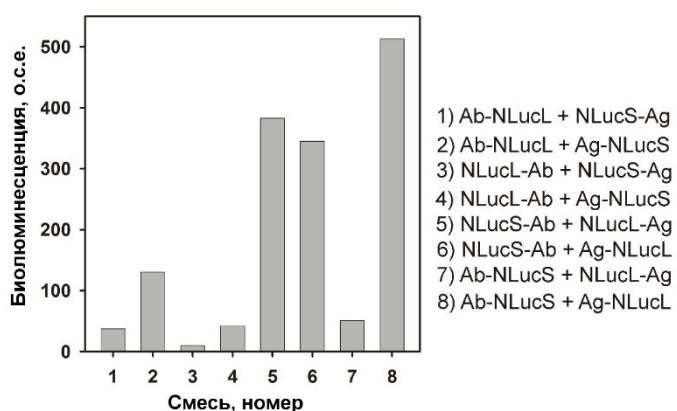


Рис. 12. Биолюминесцентный сигнал эквимолярных бинарных смесей полученных гибридных белков. Справа показан состав смесей. $N=2$.

В то же время и эффективность фуримазин-зависимой люминесцентной реакции собранной люциферазы, определенная как отношение k_{cat}/K_M , почти на 2 порядка меньше, чем эффективность реакции полноразмерной люциферазы: $2,9 \times 10^3$ против $4,5 \times 10^5 \text{ мкM}^{-1} \text{с}^{-1}$.

Связывание доменов sc14D5a-NLucS и prED3-NLucL оценивали с помощью конкурентного твердофазного биолюминесцентного анализа. В лунки планшета а) пустые, либо б) содержащие белок prDE3, параллельно вносили растворы эквимолярной смеси гибридов в разной концентрации. Биолюминесценцию инициировали добавлением фуримазина. Полученные зависимости биолюминесцентного сигнала от концентрации гибрида показаны на Рис. 14. Наблюдаемая разница сигналов от лунок с одинаковым содержанием смеси связана как с падением концентрации смеси, так и с диссоциацией комплекса.

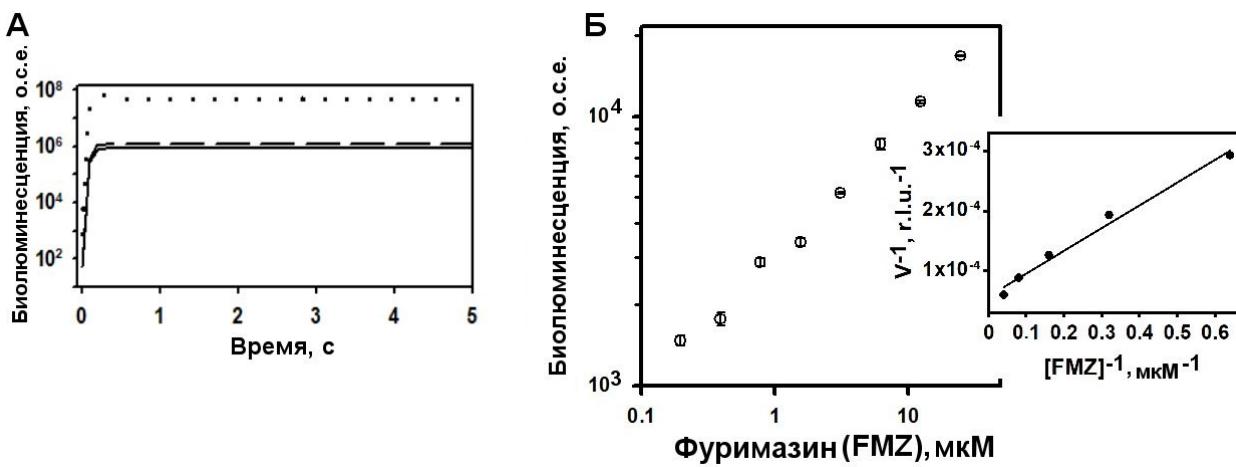


Рис. 13. А) Нормированные на белок фуримазин-индуцированные сигналы биолюминесценции исходной люциферазы (…), эквимолярной смеси sc14D5a-NLucS + prED3-NLucL (---) и этой же смеси после лиофильного высушивания (—). Б) Log-log график зависимости биолюминесцентного сигнала смеси гибридных белков от концентрации фуримазина; на вставке график Лайнувера-Берка. Концентрация гибридных белков 1 нМ во всех экспериментах. $N=3$.

Таблица 4. Кинетические параметры биолюминесцентной реакции *NanoLuc* и смеси (Ab-NLucS+Ag-NLucL) с разными субстратами

Параметр	NanoLuc		Ag-NLucL+Ab-NLucS	
	FMZ	CBP	FMZ	CBP
K_M ,	0,6	0,47	5,51	9,17
V_{max}	$2,6 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^4$	$1,57 \cdot 10^4$	$1,23 \cdot 10^3$
k_{cat}	$2,6 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^4$	$1,57 \cdot 10^4$	$1,23 \cdot 10^3$
k_{cat}/K_M	$4,5 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^2$

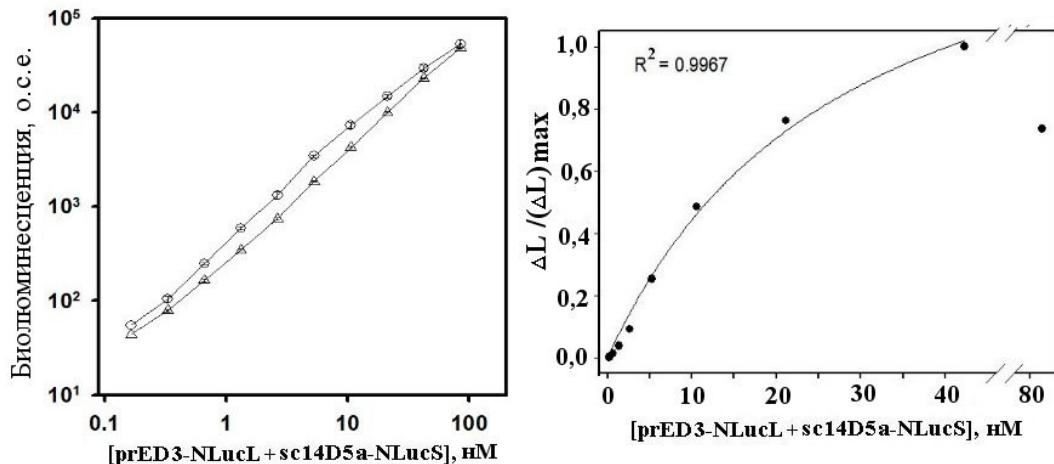


Рис. 14. Слева: биолюминесценция смеси Ag-NLucL+Ab-NLuc в отсутствие антигена DE3 (-○-) и его присутствии (-Δ-). Справа: зависимость разницы сигналов от соответствующих смесей (ΔL), нормализованная на максимальную разницу (ΔL)_{max}. $N=3$.

В присутствии избытка антигена в лунки варианта б) диссоциированный гибрид sc14D5a-NLucS образует с ним комплекс, не обладающий биолюминесценцией. Таким образом, разницу сигналов от параллельных лунок можно использовать как показатель для расчета константы аффинности этих гибридных белков. Константа аффинности Каф для смеси Ag-NLucL+Ab-NLucS составила $3,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, что близко к таковой для исходного рекомбинантного антитела мыши sc14D5a и рекомбинантного белка ED3 – $1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, а также гибридного антитела 14D5a-Rm7 – $2,65 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Таким образом, нами получена пара гибридных белков, образующих иммунокомплекс с высокой аффинностью, что приводит к комплементации люциферазных доменов гибридных белков с восстановлением биолюминесцентной активности. Невысокий процент восстановления можно, по всей вероятности, объяснить возникающими стерическими препятствиями при образовании комплекса, а также неоптимальной взаимной ориентацией фрагментов люциферазы. Мы полагаем, что изменение состава гибридных белков (например, удаление полигистидиновых фрагментов) или модификация линкеров могут способствовать формированию комплекса с более удачной пространственной ориентацией.

2.6 Однофазный биолюминесцентный иммуноанализ конкурентного типа ВКЭ-ассоциированных мишеней и ВКЭ в природных клещах

В качестве компетиторов комплекса prED3-NLucL+sc14D5a-NLucS были исследованы рекомбинантный белок prED3 и вакцина Клещ-Э-Вак, содержащая инактивированный вирус штамма Софын. Как видно из Рис. 15 А,Б, в обоих случаях их добавление приводит к падению

биолюминесцентного сигнала с увеличением концентрации компетитора. Предел обнаружения как среднее от трех значений, полученных от раствора PBS минус три стандартных отклонения, составил 0,3 нг. По грубой оценке, это соответствует 10^8 вирионам в образце (учитывая значение мол. массы белка 12 кДа и наличие на поверхности вируса 180 копий белка E). Известно, что один клещ может содержать 10^7 - 10^{10} вирионов, это означает, что полученное значение предела обнаружения является клинически значимым. Предел чувствительности ВКЭ коммерческим набором Вектор Бест составляет $2,3 \times 10^7$ вирионов. В случае вакцины с рабочим титром 1:128 (по инструкции производителя) эффект наблюдается даже при большем разведении – 1:200.

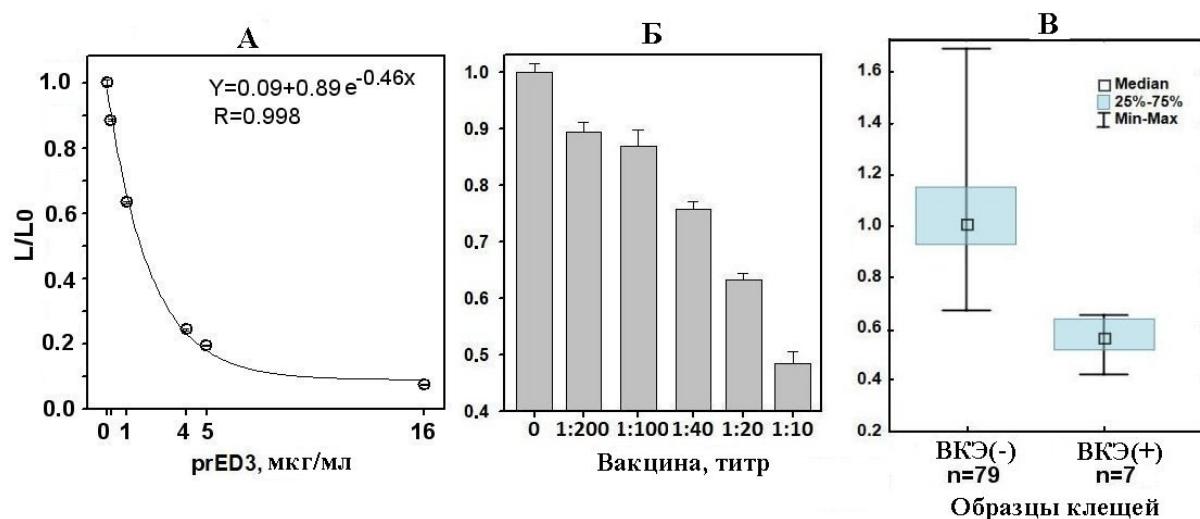


Рис. 15. Гомогенный биолюминесцентный иммуноанализ *prED3* (А) и вакцины Клец-Э-Вак (Б); $N=3$. Результаты анализа природных клещей (В). Во всех экспериментах в качестве субстрата использовали фуримазин. L/L_0 – фактор дискриминации D .

При тестировании образцов специально отобранных природных клещей – 7 ВКЭ-позитивных и 79 ВКЭ-негативных, использовали величину L/L_0 как дискриминационный фактор (D), где L_0 – это биолюминесцентный сигнал от независимого негативного контроля (Вектор Бест), L – сигнал от образца. Предложенный нами вариант анализа достоверно разделяет группу «здоровых» и ВКЭ-инфицированных клещей ($p=0,000013$, U тест Манна-Уитни, величина $Me(C_{25}-C_{75})$ составила 1 (0,93-1,2) и 0,56 (0,53-0,65), соответственно (Рис. 15В). Результаты тестирования полностью совпали с таковыми, полученными коммерческим набором для колориметрического иммуноанализа фирмы Вектор Бест. Таким образом, на основе полученных результатов при значении D фактора ниже 0,65 образец может считаться ВКЭ-положительным.

2.7 Дизайн лиофилизированного реагента, готового к использованию для одностадийного тестирования клещей

Известно, что при лиофильном высушивании, которое включает стадию замораживания их растворов, белки часто теряют значительную часть специфической активности, поскольку, как правило, содержат молекулы воды в своем составе. В нашей работе в качестве стабилизаторов использованы 5% трегалоза и 0,1% БСА и показано, что последний обеспечивает полную регенерацию смеси *prED3-NLucL+sc14D5a-NLucS* при растворении после лиофилизации.

При создании реагента, готового к анализу образца, были приготовлены следующие лиофилизированные смеси: а) образцы бинарной смеси *prED3-NLucL+sc14D5a-NLucS*, представляющие собой отрицательный контроль (С-); б) образцы трехкомпонентной смеси, где в

дополнение присутствует антиген prED3, представляющие собой положительный контроль (C+); в образцы C+ и C-, лиофилизированные вместе с субстратом – фуримазином, C-(f) и C+(f), или СВР C-(c) и C+(c).

Регенерацию белков в C+ и C- после высушивания проверяли в исходном объеме дистиллированной воды при добавлении фуримазина (Рис. 16а). В образце C+ наблюдается 4-кратное падение сигнала по сравнению с сигналом C- в результате конкурентного связывания антигена prED3 с доменом sc14D5a, вызывающего разрушение иммунокомплекса. Биолюминесцентный сигнал характеризуется длительной кинетикой и через 30 мин его интенсивность в обоих образцах снизилась только в полтора раза, при этом их соотношение практически не изменилось. Это создает возможность многократной записи сигнала, а также его накопления при анализе образцов с низкой концентрацией мишени.

На Рис. 16б видно, что после растворения лиофилизированных с фуримазином контрольных смесей абсолютные значения сигналов уменьшились примерно в 3 раза, однако соотношение сигналов C+(f)/C-(f) равно 3,8, т.е. практически не отличается от такового для смесей, лиофилизированных без субстрата.

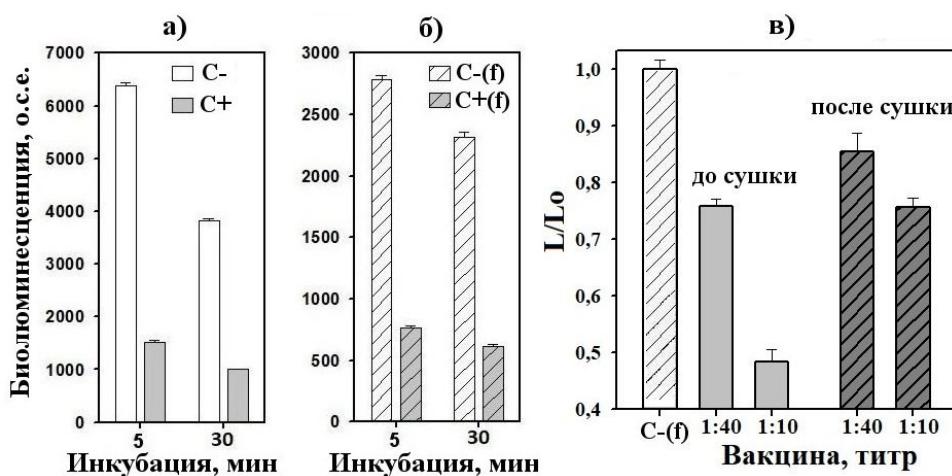


Рис. 16. Регенерация биолюминесценции лиофилизированных смесей после растворения: (а) сигналы C- и C+, инициированные фуримазином; (б) сигналы C+(f) и C-(f); (в) падение сигнала C-(f) в присутствии вакцины до и после лиофильного высушивания.

Моделируя условия анализа, к лиофилизированному раствору C-(f) добавили образцы вакцины, как одной из ВКЭ-ассоциированных мишеней. Как видно из Рис. 16в, при добавлении вакцины с титром 1:10 наблюдается 20% падение сигнала, что существенно хуже, чем в случае использования образца C-(f) до сушки, где добавление вакцины с таким разбавлением вызывает 55% падение сигнала.

Лиофилизированные образцы C+(f) и C-(f) хранили при температурах +5 и -20°C и проверяли регенерацию биолюминесцентного сигнала сразу после высушивания, а также через определенные промежутки времени. Независимо от температуры хранения уже через месяц в образцах биолюминесценция не обнаружена, что может быть результатом каталитического, а также самопроизвольного окисления фуримазина. Чтобы предотвратить его преждевременное окисление, перед лиофилизацией вначале замораживали смесь гибридных белков, а затем охлажденную аликвоту субстрата. Полученный таким образом препарат C-(f) через 3 месяца хранения при -20°C сохранил 18%, а через 6 месяцев 9% биолюминесцентной активности. Соотношение сигналов C+(f)/C-(f) находился в диапазоне 0,1-0,19. В модельном варианте анализа в качестве ВКЭ-

ассоциированной мишени использовали белок prED3. Было обнаружено, что конкуренция этого белка за связывание с миниантителом существенно ослаблена: prED3 в концентрации 5 мкг/мл вызывает падение сигнала всего на 30%, тогда как в свежеприготовленном образце C-(f) это количество вызывает 80%-ное падение сигнала (см. Рис. 15). Вероятно, связывание мишени с антителом гибрида sc14D5a-NLucS, уже находящимся в комплексе с prED3-NLucL, затруднено в силу стабильности этого комплекса и стерических препятствий. Чтобы создать равные условия для конкуренции за связывание с миниантителом, необходимо избежать образования иммунокомплекса до лиофилизации. Обеспечивая минимальный контакт между гибридными белками и субстратом, их растворы замораживали последовательно по очереди, а затем сушили. В лиофилизированном таким образом образце C- через 3 месяца обнаружено 50 и 15% исходной активности при хранении при -20°C и +5°C, соответственно.

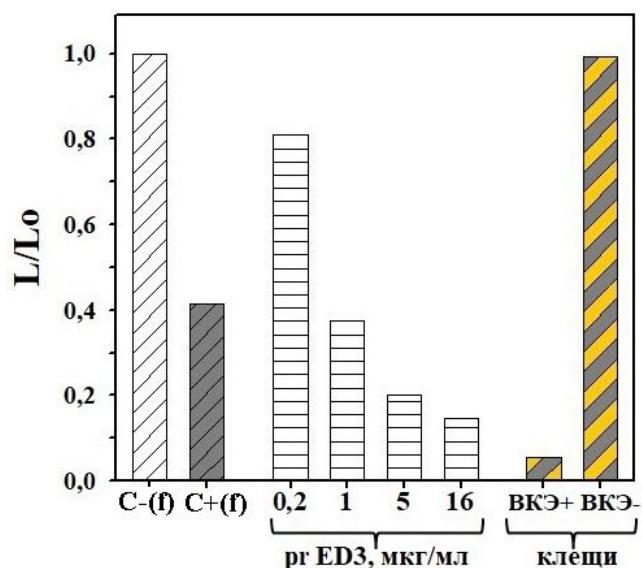


Рис. 17. Регенерация биолюминесцентной активности при хранении лиофилизированных реагентов C-(f), C+(f) при 5°C в течение 3-х месяцев. Однофазный биолюминесцентный анализ антигена prED3 и тестирование образцов ВКЭ-инфицированного (ВКЭ+) и «здорового» (ВКЭ-) клещей.

Соотношение сигналов C+(f)/C-(f) в обоих случаях составило около 0,4 (Рис. 17). Образец C- использовали для однофазного анализа белка prED3, а также экстрактов «здорового» и ВКЭ-инфицированного клещей. Как видно из Рис. 17, падение относительного биолюминесцентного сигнала при prED3 в концентрации 5 мкг/мл составляет почти 80%, что близко к таковому при использовании свежеприготовленного реагента (Рис. 15). Сигналы от экстрактов ВКЭ-инфицированного и «здорового» клещей различаются почти на порядок. Можно заключить, что разработанный нами лиофилизированный реагент, включающий контрольные и рабочий (для тестирования клеша) образцы, при хранении в течение 3-х месяцев при -20°C пригоден для достоверного выявления ВКЭ в клещах однофазным анализом, в формате «Все в одном».

Помимо фуримазина в качестве субстрата в составе реагентов был исследован Ca^{2+} -зависимый целентеразин-связывающий белок Renilla (CBP). Растворы C+(c) и C-(c), содержащие помимо гибридных белков избыток CBP, лиофилизировали, хранили при +5 и -20°C и контролировали регенерацию биолюминесценции через определенные промежутки времени, запуская сигнал добавлением раствора CaCl_2 . Как видно из Рис. 18, работоспособность такой аналитической системы существенно выше: при хранении в течение 6 месяцев при +5°C в системе

регенерируется более 30% исходной активности. Хранение при -20°C приводит даже почти к 1,5 - кратному увеличению активности. Соотношение сигналов $\text{C}-(\text{c})/\text{C}+(\text{c})$ изменяется слабо и колеблется в диапазоне 0,1-0,17. В целом использование этого субстрата выглядит перспективным, хотя, как отмечалось выше, требует дополнительных затрат на получение рекомбинантного белка СВР. Следует отметить, что эффективность биолюминесцентной реакции в случае использования этого субстрата существенно снижена (Табл. 4). Вопрос о целесообразности применения СВР в составе реагента требует дополнительного исследования.

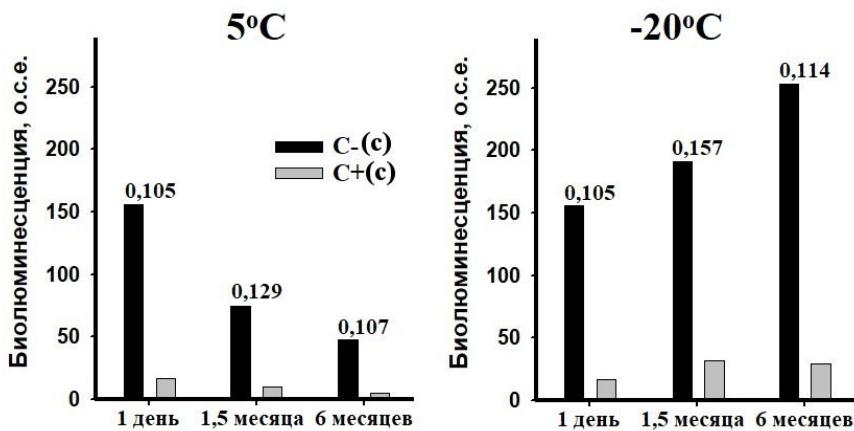


Рис. 18. Регенерация биолюминесценции из лиофилизированных образцов $\text{C}+(\text{c})$ и $\text{C}-(\text{c})$ после хранения в разных условиях. Цифры над колонками отражают соотношение сигналов $\text{C}-(\text{c})/\text{C}+(\text{c})$.

Таким образом, нами получен работоспособный лиофилизированный реагент «Все в одном», пригодный для быстрого тестирования клеща на присутствие ВКЭ. Каталитическое окисление субстрата удалось существенно замедлить изолированием белковых компонентов при последовательном замораживании их растворов. Анализ проводится добавлением анализируемого образца, а процедуры промывки, дополнительного инкубирования, добавления субстрата и пр. при этом отсутствуют. Это обеспечивает быстрое тестирование, в том числе в условиях удаления от лабораторий при наличии портативного фотометра.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ получения высокоочищенных гибридных белков, включающих домены одноцепочечного анти-ВКЭ-миниантитела либо антигенных детерминанты вируса и домены целентеразин-зависимых люцифераз: генетически модифицированной люциферазы Rm7, либо фрагментов искусственной люциферазы NLuc.
2. Показано, что во всех гибридных белках домены образуют реакционно способные пространственные структуры, сохраняя специфические свойства исходных белков: анти-ВКЭ-миниантитело во всех гибридных белках связывает ВКЭ-ассоциированные антигены с аффинностью, близкой к таковой исходного миниантитела; домен люциферазы Rm7 обладает субстрат-зависимой биолюминесценцией; домены фрагментов люциферазы NLuc комплементируют с восстановлением субстрат-зависимой биолюминесценции при образовании комплексов между доменами антитела и антигена.
3. Показано, что гибридный белок 14D5a-Rm7 является высокочувствительным репортером для иммуноанализа ВКЭ. Разработан способ выявления ВКЭ твердофазным микроанализом в клещах; протестированы экстракты более чем 1500 природных клещей, диагностическая чувствительность и специфичность анализа соответственно составили 100% и 98,9%.

- Получена пара гибридных белков, пригодных для высокочувствительного выявления ВКЭ однофазным конкурентным иммуноанализом. Разработан дизайн анализа для тестирования природных клещей. Биотест достоверно разделяет группу «здоровых» и ВКЭ-инфицированных клещей ($p=0,000013$, U тест Манна-Уитни, величина $Me(C_{25}-C_{75})$ составила 1 (0,93-1,2) и 0,56 (0,53-0,65).
- Разработаны условия хранения компонентов биолюминесцентного выявления ВКЭ твердофазным иммуноанализом сэнвич-типа (поверхностно активированные планшеты, лиофилизованный биолюминесцентный гибридный белок 14D5a-Rm7), при которых не меняются поверхностные свойства планшет и бифункциональные свойства гибридного белка.
- Получен и успешно испытан готовый к использованию лиофилизованный реагент «Все в одном», включающий образцы положительного и отрицательного контролей и рабочий образец, для выявления ВКЭ в клещах однофазным биолюминесцентным анализом конкурентного типа.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

- L.P. Burakova, **A.N. Kudryavtsev**, G.A. Stepanyuk, I.K. Baykov, V.V. Morozova, N.V. Tikunova, M.A. Dubova, V.N. Lyapustin, V.V. Yakimenko, L.A. Frank. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015 407:5417–5423 DOI: 10.1007/s00216-015-8710-6 (Scopus, WoS, Белый список К1, IF 3.8. Q1).
- A.N. Kudryavtsev**, L. P. Burakova and L. A. Frank. Bioluminescent detection of tick-borne encephalitis virus in native ticks. *Anal. Methods*, 2017, 9, 2252 DOI: 10.1039/C7AY00535K (Scopus, WoS, Белый список К1, IF 2.6. Q2).
- L.A. Frank, E.E. Bashmakova, V.V. Krasitskaya, **A.N. Kudryavtsev**. Genetically modified coelenterazine-dependent luciferases as reporters for in vitro assay. *Журн. Сиб. федер. ун-та. Серия: Биология*, 2017, Т. 10(2), С. 199 – 210. DOI: 10.17516/1997-1389-0023 (Scopus, Белый список К1, ВАК, IF 0,5. Q4).
- А.Н. Кудрявцев**, Л.П. Буракова, К.А. Баринова, Л.А. Франк. Тест-система для выявления вируса клещевого энцефалита биолюминесцентным иммуноанализом. *Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология*, 2020. 13(3). С. 310–321. DOI: 10.17516/1997-1389-0296 (Scopus, Белый список К1, ВАК, IF 0,5. Q4).
- Е.Е. Башмакова, **А.Н. Кудрявцев**, Л.А. Франк. Разработка способа получения функционально активного рекомбинантного стрептавидина в клетках *Escherichia coli*. *Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология*, 2020. 13(2). С. 218-229. DOI: 10.17516/1997-1389-0324 (Scopus, Белый список К1, ВАК, IF 0,5. Q4).
- Kudryavtsev A.N.**, Krasitskaya V.V., Efremov M.K., Zangeeva S.V., Rogova A.V., Tomilin F.N., Frank L.A. Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein Renilla: expected and unexpected features. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 2144. <https://doi.org/10.3390/ijms24032144> (Scopus, WoS, Белый список К1, IF 4.9. Q1).
- A.N. Kudryavtsev**, E.E. Denisova, V.V. Krasitskaya, I.K. Baykov, N.V. Tikunova, L.A. Frank. Designing the homogeneous competitive bioluminescence-based assay for tick-borne encephalitis virus (TBEV) point-of-care detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2025, 417: 5931-5939, <https://doi.org/10.1007/s00216-025-06090-w>. (Scopus, WoS, Белый список К1, IF 4.9. Q1).

Патенты РФ на изобретение

- Л.А. Франк, Н.В. Тикунова, Л.П. Буракова, И.К. Байков, **А.Н. Кудрявцев**, Морозова В.В. Рекомбинантная плазмидная ДНК pFLAG-sc14D5a-Rm7, обеспечивающая синтез гибридного белка sc14D5a-Rm7, штамм бактерий *Escherichia coli* - продуцент гибридного белка sc14D5a-Rm7 и гибридный белок sc14D5a-Rm7, связывающий белок Е вируса клещевого энцефалита и обладающий биолюминесцентной активностью. Патент РФ № 2 565 545 С1 Опубликовано: 20.10.2015 Бюл. № 29.

2. Е.Е. Башмакова, **А.Н. Кудрявцев**, Л.А. Франк. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET19b-SAV, обеспечивающая синтез полноразмерного белка стрептавидина *Streptomyces avidinii*, штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент растворимого полноразмерного белка стрептавидина *Streptomyces avidinii*. Патент РФ №2728652. Опубликовано 30.07.2020. Бюл. № 22
3. Е.Е. Башмакова, **А.Н. Кудрявцев**, Л.А. Франк. Рекомбинантные плазмидные днк pFLAG-sc14d5a-NLuc-r1 и pFLAG-NLuc-r2-sc14d5a, обеспечивающие синтез гибридных белков sc14d5a-NLuc-r1 и NLuc-r2-sc14d5a, и гибридные белки sc14d5a-NLuc-r1 и NLuc-r2-sc14d5a, связывающие белок Е вириуса клещевого энцефалита с комплементацией фрагментов NLuc-r1 и NLuc-r2 и появлением биолюминесцентной активности. Патент РФ № 2784817. Опубликовано 29.11.2022. Бюл. № 34
4. **А.Н. Кудрявцев**, Е.Е. Денисова, И.К. Байков, Н.В. Тикунова, Л.А. Франк. Рекомбинантные плазмидные ДНК pFLAG-sc14D5a-NLuc-r2 и pFLAG-rED3-NLuc-r1, обеспечивающие синтез гибридных белков sc14D5a-NLuc-r2 и rED3-NLuc-r1, и гибридные белки sc14D5a-NLuc-r2 и rED3-NLuc-r1, образующие специфические комплексы антиген-антитело с комплементацией фрагментов NLuc-r1 и NLuc-r2 и появлением биолюминесцентной активности, способ выявления белка Е вириуса клещевого энцефалита на их основе. Патент РФ № 2844 579. Опубликовано 04.08.2025. Бюл. № 22

Тезисы в сборниках материалов конференции

1. Frank L.A., Bashmakova E.E., **Kudryavtsev A.N.**, Krasitskaya V.V. Bioluminescent genetically fused proteins as effective and versatile labels for bioassay // 19th International symposium on bioluminescence & chemiluminesce (Tsukuba, Japan) 2016, С. A1-7.
2. Kudryavtsev A.N., Burakova L.P., Tikunova N.V., Frank L.A. Bioluminescent immunoassay for encephalitis virus in native ticks bioassay // 19th International symposium on bioluminescence & chemiluminesce (Tsukuba, Japan) 2016, С. PA-26.
3. Франк Л.А., Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., **Кудрявцев А.Н.** Высокочувствительные биолюминесцентные репортеры для микроанализа на основе целентеразин-зависимых люцифераз // международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва) 2018, С. 96-97.
4. Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., **Кудрявцев А.Н.**, Франк Л.А. Целентеразин- зависимые люциферазы как аналитический инструмент для фундаментальных и прикладных исследований // Материалы всероссийской мультиконференции с международным участием. «Биотехнология - медицине будущего» (Новосибирск) 2019, С. 181.
5. **Кудрявцев А.Н.**, Франк Л.А. Биолюминесцентный микроанализ ВКЭ в природных клещах // 9-й съезд Российского фотобиологического общества (п. Шепси) 2021, с 130.
6. **Кудрявцев А.Н.**, Башмакова Е., Франк Л.А. Выявление ВКЭ биолюминесцентным гетеро- и гомофазным иммуноанализом // Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск) 2022, С. 30.
7. **Кудрявцев А.Н.**, Башмакова Е.Е., Франк Л.А. Одностадийное определение вириуса клещевого энцефалита биолюминесцентным иммуноанализом // 13-я международная научная конференция «биокатализ фундаментальные исследования и применения» (Сузdalь) 2023, С. 188.
8. Франк Л.А., Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., **Кудрявцев А.Н.**, Панамарев Н.С. Целентеразин- зависимые люциферазы: свойства и применение в микроанализе // 13-я международная научная конференция «биокатализ фундаментальные исследования и применения» (Сузdalь) 2023, С. 148.