

**Влияние температуры на хеликазную активность белка NS3 переносимых клещами флавивирусов млекопитающих**

**Научный руководитель – Литов Александр Геннадьевич**

**Охезин Егор Валерьевич**

*Студент (магистр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра вирусологии, Москва, Россия

*E-mail: oe-74@mail.ru*

Вирион флавивирусов представляет собой небольшого размера частицу (диаметр ~ 50 нм) и имеет одноцепочечный РНК геном положительной полярности длиной около 11 000 оснований. Семь неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5) необходимы для репликации вирусного генома. Белок NS3 имеет хеликазный и протеазный домены. Ранее в нашей лаборатории была проведена работа по адаптации вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и вируса Повассан (ПОВ) к клеткам СПЭВ при различных температурах культивирования (37°C, 32°C, 28°C) и была показана фиксация аминокислотной замены в хеликазном домене NS3 у вариантов при пониженной температуре. Предполагается, что такая мутация дает прямое или опосредованное эволюционное преимущество в репликации генома при пониженной температуре.

Целью нашего исследования стало клонирование и экспрессия хеликазного домена белка NS3 лабораторных штаммов этих вирусов без и с аминокислотной мутацией в 400/401 позиции и определение хеликазной активности *in vitro* полученных белков при разной температуре.

Тотальный препарат РНК выделяли из культуральной жидкости инфицированных клеток с последующим синтезом комплементарной цепи ДНК. Хеликазный домен белка NS3 амплифицировали при помощи ПЦР с использованием олигонуклеотидов, фланкированных сайтами для рестриктаз BamHI и HindIII. Аминокислотную замену вводили путём использования fusion-ПЦР с праймеров, имеющих в своём составе целевой кодон требуемой аминокислоты, характерной для низкотемпературной изоформы белка. ПЦР-продукт вставляли в экспрессионный плазмидный вектор (pQE30), имеющий на N-конце 6xHis tag, путем рестрикции и дальнейшего лигирования липких концов лигазой фага T4. После этого, плазмиду секвенировали по методу Сэнгера. Экспрессию белка осуществляли в клетках *E. coli*, штамм JM 109. Белок выделяли на колонках с никелевой агарозой и его концентрацию определяли анализом по Брэдфорду. Хеликазную реакцию проводили в буферной смеси с добавлением красителя SYBRgreenI и пары комплементарных олигонуклеотидов. Флуоресценцию измеряли по проценту снижения флуоресценции SYBRgreenI относительно реакции без добавления хеликазы [1].

В результате работы были получены изоформы хеликазного домена NS3 белка для лабораторных штаммов и низкотемпературных вариантов, имеющих аминокислотную замену: тирозин на гистидин. Хеликазная активность этих вариантов белка в реакции *in vitro* была определена при температурах инкубации 32°C и 37°C. Хеликазная активность для исходных штаммов соответствует хеликазной активности NS3 белка вируса гепатита С и большого Т антигена SV40 [1]. Отработанная методика может служить скрининговой системой для тестирования химических соединений, ингибирующих хеликазную активность флавивирусов.

**Источники и литература**

- 1) Sammer Siddiqui, Irfan Khan, Shamshad Zarina, Syed Ali. Use of the SYBR Green dye for measuring helicase activity // Enzyme and Microbial Technology. 2013. Vol. 52. P. 196-198.