

ANTIVIRAL ACTIVITY OF FUKOIDANS OF NATURAL ORIGIN AT THE EXPERIMENTAL INFECTION CAUSED BY HANTAVIRUS

I.G. Maksema, I.D. Makarenkova

Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok)

Summary — The virus inhibiting activity of the fukoidans of the brown seaweed in view of their structural features in experiences in vivo at hantavirus infection at mice is investigated. It is found, that fukoidans from brown seaweed *Laminaria japonica* and

Laminaria cichorioides possess property to suppress the hantavirus infection to the peritoneal macrophages of mice mainly in an initial phase of infectious process. The positive effect of fukoidans from fukus and laminaria seaweed has been to some extent revealed for each of the tested preparations on 10, 14 and 21st day. High antiviral activity of preparations in peak of an infection (10–14th day) is connected, with their immune modulating action.

Keywords: hantavirus infection, fukoidans, macrophage.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 86-89.

УДК 577.112:578.833.29

Н.Х. Мухаметханов¹, А.Х. Баймиев²

¹ Филиал НПО «Микроген» МЗ РФ «Иммунопрепарат», ² Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА G2 ХАНТАВИРУСА СЕРОТИПА PUUMALA

Ключевые слова: вирус *Puumala*, гликопротеин G2, рекомбинантный белок.

От инфицированных мышевидных грызунов выделены и амплифицированы фрагменты М-сегмента, кодирующие оболочечный гликопротеин G2 хантавируса *Puumala*. Точные нуклеотидные последовательности гена определены и клонированы в экспрессирующий вектор Pin-Point. Некоторые антигенные характеристики рекомбинантного белка были установлены в ELISA.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — довольно распространенное заболевание на территории России. Различают два очага инфекции: на Дальнем Востоке и на территории Европейской части страны. Заболеваемость на территории Европейской части России в Республике Башкортостан занимает первое место, превышая показатели по стране в 8–15 раз, и составляет 40–60%. Этот очаг является одним из самых крупных и активных не только в России, но и в бывшем СССР [3]. Актуальность проблемы обусловлена отсутствием тенденции к снижению заболеваемости, тяжестью инфекционного процесса и количеством осложнений, что представляет большую опасность для трудоспособного населения. Кроме того, серьезную озабоченность вызывает то, что патологический процесс протекает в виде стертых, атипичных форм [5, 7]. Таким образом, в республике сложилась крайне напряженная эпидемиологическая ситуация, а следовательно, проблема разработки лечебных и профилактических средств является весьма актуальной [4].

В настоящее время проводятся исследования по созданию генно-инженерных конструкций, кодирующих поверхностные гликопротеины G1 и G2 вируса, относящегося к роду хантавирусов семейства буньявирусов [8, 10], которые в дальнейшем могут быть использованы как для получения тест-систем, так и ДНК-вакцины и вакцины на основе очищенных белков вируса [1, 6]. Геном отрицательной полярности включает три сегмента: большой (L), средний

(M) и малый (S). L-сегмент кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу с молекулярной массой 250 кДа, которая обладает также эндонуклеазной функцией и, возможно, рядом других [11]. М-сегмент кодирует два поверхностных гликопротеина G1 и G2 в виде одного предшественника с молекулярной массой 113–120 кДа, который посттрансляционно расщепляется и гликолизуется в эндоплазматическую сеть. Предполагается, что гликопротеины ответственны за присоединение и слияние с клеткой, а также за образование вируснейтрализующих антител [9, 12]. S-сегмент кодирует нуклеокапсидный белок с молекулярной массой 54 кДа. Данный белок выполняет как структурную функцию — связывается с РНК и гликопротеином G1, так и регуляторную — переключает трансляцию хантавируса на репликацию и наоборот [13].

От рыжих полевых, отловленных на территории Уфимского, Иглинского, Благовещенского и Туймазинского районов Республики Башкортостан, были отобраны образцы, которые в иммуноферментном анализе давали положительную реакцию на антигены хантавируса. Тотальная клеточная РНК была выделена из ткани легких зараженных грызунов массой 0,5 г с помощью гуанидинтиоцианатного метода. Ткань растирали тefлоновым пестиком в пробирке типа Эппендорф в буфере следующего состава: 4 М гуанидинтиоцианат, 2% саркозил. 50 мМ трис-НС1 (рН 8,0), 10 мМ ЭДТА, 1% (3-меркаптоэтанол. Далее добавляли 0,2 объема 10% додецилсульфата натрия, 0,1 объема 2М ацетата натрия (рН 4,0), 0,2 объема хлороформа и 1 объем фенола. Экстракцию проводили на шейкере в течение 1 часа. После депротеинизации вирионов смесью фенола (рН 5,0) и хлороформа РНК осаждали изопропанолом. Осадок РНК после двукратной промывки 70% этанолом растворяли в воде, обработанной диэтилпиокарбонатом. Синтез

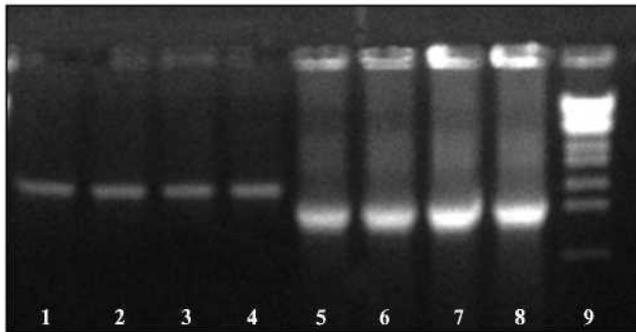


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов РНК хантавируса.

1—4 — продукты полимеразной цепной реакции при использовании внешних праймеров (1876 н.п.); 5—8 — продукты гнездовой полимеразной цепной реакции с использованием внешних и внутренних пар праймеров (1543 н.п.); 9 — маркер весов (ДНК фага λ , разрезанная рестриктазой *BssT I*).

кДНК из выделенной РНК проводили с использованием коммерческого набора «Реверта» фирмы «Амп-лисенс» согласно прилагаемой инструкции.

При синтезе кДНК был использован праймер с последовательностью — 5'-actccgcaagaagaagcaaac-3'.

Аmplификацию гена выполняли методом гнездовой полимеразной цепной реакции на амплификаторе МС2 «Терцик» компании «ДНК-технология» (Россия) с использованием внешней и внутренней пары праймеров в два раунда в реакционной смеси объемом 30 мкл следующего состава: 60 мМ трис-НС1 (рН 9,0), 25 мМ КС1, 2 мМ MgCl₂, 0,1% Тритон X-100, по 35 пкМ каждого праймера, 2 мМ dNTP, Taq полимеразы 1 ед., 7 мкг кДНК.

Первый раунд проводили при режиме амплификации: 94°C — 2 мин, далее 35 циклов 94°C — 40 с, 55,4°C — 1 мин, 72°C — 1 мин 50 с и 72°C — 2 мин. Для второго раунда был выбран режим: 94°C — 2 мин, 35 циклов 94°C — 40 с, 57°C — 1 мин, 72°C — 1 мин 30 с и 72°C — 2 мин.

Внешняя пара праймеров —

F1 5'-gtgatgctagctctggtgcgtgtatttggtt-3'

и R1 5'-agtagactccgcaagaacaag-3',

внутренняя пара —

F2 5'-aaaatttaaatgcaggtggacag-3'

и R2 5'-ttaggcttatgttcttctctgtaactaggtct-3'.

Продукты амплификации анализировали в 1% агарозе с бромистым этидием. ПЦР продукт клонировали в специально приготовленный линейризованный вектор pBluescript II KS (–) с выступающими dT-концами.

При анализе рекомбинантных клонов для определения размера вставки использовали метод плазмидного профиля с быстрым щелочным лизисом бактериальных колоний *Escherichia coli*. Все вышеописанные процедуры, а также лигирование ДНК, приготовление компетентных клеток *E. coli* и трансформацию рекомбинантной ДНК проводили по стандартным процедурам, изложенным в лабораторном руководстве [2].

Определение нуклеотидных последовательностей выполняли на автоматическом секвенаторе ABI

PRISM 310 фирмы Applied Biosystems, Inc. (США) с помощью наборов Big Dye Terminator v. 3.1. Для сравнительного выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали пакет компьютерных программ Lasergene (США)

ПААГ-ДСН-электрофорез белка выполняли на приборе Protean II xi Cell (Bio-Rad, США) согласно прилагаемой методике с некоторыми изменениями. Концентрирующий гель использовали в концентрации 7%, а разделительный — 12,5%. Электрофорез длился 3–3,5 часа при постоянной силе тока 10 мА для концентрирующего геля и 20 мА для разделительного геля. Окрашивание проводили с использованием красителя «кумасси синий» 0,1% в 10% уксусной кислоте — 30 мин и отмывали в 5% уксусной кислоте в течение ночи.

Диализ осуществляли при 4°C в диализных мешочках против физиологического раствора в течение 10 часов. Осадок концентрировали и растворяли в буфере, содержащем 20 мМ фосфатный буфер рН 7,6, 2% тритон X-100 и 10% глицерин.

Из легких мышевидных грызунов была выделена полноразмерная РНК хантавируса и амплифицирован участок М-сегмента, соответствующий поверхностному гликопротеину G2. При амплификации гена применяли как ПЦР с одной парой праймеров, так и метод гнездовой ПЦР с двумя парами. Наилучший результат показал метод гнездовой ПЦР (рис. 1).

Очищенная амплифицированная ДНК была клонирована в плазмидный вектор pBluescript II KS (–) по EcoRV сайту. Для трансформации использовали штамм JM 109 *E. coli*. Скрининг рекомбинантных клонов проводили с помощью плазмидного профиля и полимеразной цепной реакции.

Колонии *E. coli*, содержащие плазмиды со вставками, были отобраны для проверки последовательностей клонированного ПЦР-продукта. Определение нуклеотидной последовательности синтезированного продукта показало, что в нескольких пробах имеются вставки с полноразмерным геном G2.

При сравнении секвенированного нами гена гликопротеина G2 (EU069361) длиной 1543 нуклеотидных пар с аналогичным геном ранее выделенного на территории РБ штамма CG 1820 хантавируса серотипа PUU были выявлены следующие отличия: в положении 1990 была обнаружена замена С G, в положении 1997 - G A, 2063 - A G, 2109 - A C, 2143 - A G, 2215 - G A, 2443 - A G, 2602 - C T, 2724 - C G, 2763 - C T, 2781 - A T, 2829 - A G, 2837 - T C, 2863 - C T, 2866 - T C, 2893 - T C, 2896 - A G, 3269-3270- C C G G. Большинство нуклеотидных замен попадали на вырожденные нуклеотиды кодонов и не приводили к замене аминокислот за некоторым исключением. Замена в положении 2063 приводит к замене R G, в положении 2109 — к Q P, 2724 - к P R, 2763 - к A V, 2781 - к Q L, 2829 - к K R, 2837 - к F L, 3269 - к P G.

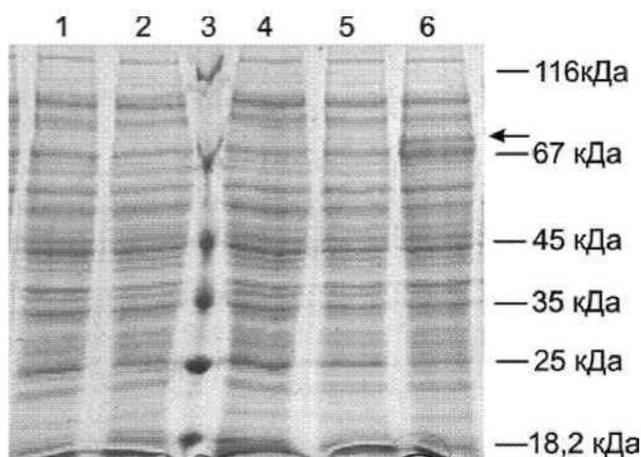


Рис. 2. ПААГ-ДСН-гель-электрофорез белков.

1,2 — образцы до индукции; 3 — маркеры весов белка: 116, 66,2, 45, 35, 25 и 18,2 кДа соответственно; 4–6 — клоны после индукции (стрелкой отмечена полоса, соответствующая белку G2).

Для наработки целевого белка ген G2 из вектора pBluescript II KS (–) был переклонирован в специализированный для этих целей вектор PinPoint (Promega). Полученная конструкция была трансформирована в клетки *E. coli* (штамм JM 109). Культивирование клеток для наработки целевого белка проводили в условиях индукции на среде LB объемом 500 мл в течение 4,5 часа. Клетки, охлажденные до 4°C, осаждали, ресуспензировали в фосфатном буфере (рН 8,0) с 8М мочевиной. Для защиты белка от разрушения использовали ингибитор протеаз (фенилметилсульфанилфторид). Клетки лизировали ультразвуковым дезинтегратором при частоте 20 кГц. Воздействие ультразвуком проводили в ледяной бане по 15 секунд с 30-секундными интервалами, чтобы избежать локального перегрева образца. Нарботку целевого белка анализировали с помощью ПААГ-ДСН-гель-электрофореза. Таким образом были определены и отобраны для дальнейшего исследования клоны, нарабатывающие целевой белок. Необходимо отметить, что он, по неизвестным для нас причинам, нарабатывался не во всех клонках, если даже плаزمид *E. coli* содержала необходимую вставку в рамке считывания в нужной ориентации (рис. 2).

Для определения наличия антигенных детерминант рекомбинантного белка G2 был проведен иммуноферментный анализ для выявления антигенов хантавирусов с использованием тест-системы «Хантагност», разработанной ГУП по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН (г. Москва), согласно рекомендациям производителя.

Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометрическом оборудовании «Унискан» при длине волны 492 нм. Для данной тест-системы положительными считаются пробы, оптическая плотность которых в лунках с антихантавирусным IgG превосходит оптическую плотность лунок с нормальным IgG в 2,1 и более раз. По результатам изме-

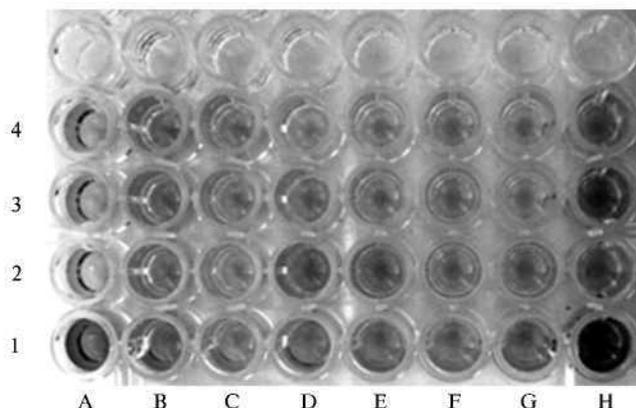


Рис. 3. Иммуноферментный анализ рекомбинантного белка G2 вируса Пуумала.

Нечетные ряды — антихантавирусный иммуноглобулин G, четные — нормальный иммуноглобулин G человека, лунка H3 — контроль с вирусным антигеном.

Таблица

Иммуноферментный анализ рекомбинантного белка G2 вируса *Puumala*

	1	2	3	4
A	1,923	0,308	0,273	0,277
B	0,445	0,422	0,362	0,370
C	0,300	0,291	0,289	0,294
D	0,587	0,643	0,416	0,310
E	0,523	0,608	0,347	0,326
F	0,374	0,368	0,355	0,313
G	0,402	0,382	0,212	0,267
H	2,303	0,498	1,316	0,511

Примечание: ряды 1,3 — антихантавирусный иммуноглобулин G, ряды 2,4 — нормальный иммуноглобулин G человека, H3 — контроль антигена хантавируса.

рения оптической плотности положительными являются образцы, соответствующие лункам A1 и H1, разница оптической плотности в которых соответственно равна 6,24 и 4,62. Остальные образцы показали отрицательный результат (рис. 3, табл.).

Таким образом, был получен штамм *E. coli*, продуцирующий белок G2 вируса *Puumala*, и выявлено наличие определенных антигенных детерминантов у данного рекомбинантного белка, экспрессирующегося в прокариотической системе.

Литература

1. Дебабов В.Г. // Молекулярная биология. — 1997. — Т. 31. — С. 209-215.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.
3. Магазов Р.Ш., Кулагин В.Ф., Хайбуллина С.Ф. // Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом — пути решения проблемы. — Уфа, 1995. — С. 5–9.
4. Никоноров Ю. М., Хасанова С.С., Филатова О.В. и др. // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. — 2001. — № 1. — С. 35-39.

5. Нургалева Р.Г., Ткаченко Е.А., Степаненко А.Г. и др. // Журн. микробиол. - 1999. - №6. - С. 45-49.
6. Спасокукоцкий А. // Аптека. — 2000. — № 229. — С. 1.
7. Фазлыева Р.М., Хунафина Д.Х., Камилов Ф.Х. // Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в республике Башкортостан. — Уфа, 1995.
8. Филдс Б.Н., Найн Д.М., Мэрфи Ф.А. и др. Вирология. — М.: Мир, 1989.
9. Alexeyev O., Elgh F., Zhestkov A. et al. // Lancet. — 1996. - Vol. 347. - P. 1483.
10. Antic D., Lim B. U., Rang C Y. // Virus Res. - 1991. - Vol. 19. - P. 47-58.
11. Antic D., Lim B.U., Kang C.Y. // Virus Res. - 1991. - Vol. 19. - P. 59-66.
12. Antic D., Wright K.E., Kang C Y. // Virology. - 1992. - Vol. 189. - P. 324-328.
13. Antic D., Yong Kang C., Kristin S. et al. // Virus Res. - 1992. - Vol. 24. - P. 35-46.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

OBTAINING OF RECOMBINANT PROTEIN G2 OF HANTAVIRUS SEROTYPE PUUMALA

N.Kh. Muhametkhanov¹, An.H. Baymiev²

¹Immunopreparat, an Ufa branch of Microgen State Company,

²Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Centre of Russian Academy of Sciences

Summary — From the infected mice the area of M-segment coding superficial glycoprotein G2 of hantavirus serotype Puumala was allocated and amplified. Certain nucleotide sequence of a gene was defined and cloned in the expression vector Pin-Point. ELISA reveals the certain antigenic properties of the recombinant protein.

Keywords: virus Puumala, glycoprotein G2, recombinant protein.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 89-92.

УДК 372.82(510)

Чжан Лили, Ли Ливэй

Харбинский медицинский университет (КНР)

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ В ОБУЧЕНИИ РУССКОМУ ЯЗЫКУ В КИТАЕ

RtiK)4eebie слова: русский язык, китайская аудитория, вопросы преподавания.

Изложен опыт преподавания русского языка китайской аудитории. Подчеркивается важность знания лексико-семантических особенностей изучаемого языка и этапности обучения. На начальном этапе обучения лексико-семантические группы включают стилистически нейтральную и активную лексику. В дальнейшем изучается пассивная лексика, словообразовательные связи, совершенствуются речевые навыки. На всех этапах обучения, независимо от его характера и содержания, необходимо опираться на лексико-семантическую систему русского языка, что позволяет овладеть говорением и слушанием, чтением и письмом.

Лексическая работа подчиняется главной цели — овладению всеми видами речевой деятельности — говорением, слушанием, чтением, письмом. Работа над словом присутствует на всех этапах обучения русскому языку: от момента восприятия новых слов до активного употребления слова в устной и письменной речи. В методике преподавания иностранного языка, в т.ч. русского, большое внимание уделяется приемам работы с лексическим материалом [2, 4].

При изучении иностранных языков полезно установить связь между изучаемым языком и родным. Опыт преподавания русского языка в китайской аудитории показывает, что лексическая система, семантика русского слова представляют для студентов большие трудности. Во-первых, при определении семантики приходится опираться на окружающую действительность, на наше представление о ней. А она в КНР и в России разная. Во-вторых, необходимо учитывать весь спектр лексических значений русского языка, а это тоже нелегко. Приходится констатировать, что лексический уровень русского языка имеет сложную организацию, свои закономерности. Без учета этого

невозможно сформировать у обучаемых правильные лексические и речевые навыки, правильное мировосприятие изучаемого языка и его носителя.

Формирование лингвистических навыков тесно связано с упражнениями, которые должны опираться на лексико-семантические особенности изучаемого языка. Лексика русского языка представляет собой своеобразную систему: слова, выражения с их грамматическими и словообразовательными характеристиками объединяются в этой системе в группы и вступают между собой в определенные смысловые отношения. Это так называемые лексико-семантические группы (ЛСГ). ЛСГ влияют на связь значения слов, на основные правила их сочетания [3].

ЛСГ группы объединяют синонимы, антонимы, многоязычные слова и т.д. Поэтому в практике преподавания русского языка мы опираемся на понятие «учебная ЛСГ». Это группа, состав слов которой определяется потребностями обучения, зависит от этапа обучения и отобранного текстового материала. На начальном этапе обучения в учебную ЛСГ включается только стилистически нейтральная и активная лексика.

На продвинутом этапе обучения в ЛСГ отбирается стилистически и эмоционально-экспрессивно окрашенная лексика. Большинство учебников русского языка для иностранцев основаны именно на таком подходе. Например, имена прилагательные объединяются в группы со значением размера, цвета (маленький, небольшой, крохотный, кумачовый, алый), глаголы — в группы со значением передвижения (идти, тащиться) речемыслительной деятельности (говорить, шептать; думать, размышлять), волеизъявления (хотеть, желать, стремиться) и т.п.