

Rezultatele Proiectului Nucleu
Dezvoltarea de sisteme particulare bazate pe proteine recombinante de interes
vaccinal pentru infecțiile respiratorii virale
Cod PN 22 44 01 01

Obținerea de antigene proteice purificate și analiza fizică și funcțională a acestora

Descriere activitate și rezultate Faza 2/2024

Pentru evaluarea sistemelor de expresie disponibile s-a avut în vedere folosirea celulelor bacteriene (*E.coli*), celulelor de insecte (*Sf9*) și celule mamaliene (HEK293T). Pentru celulele *Sf9* s-a reușit realizarea unui construct bacmid cu EGFP. Acesta a fost transfectat în celule *Sf9* cultivate în mediu Grace's. Baculovirusul a fost multiplicat prin pasaje repetate, suspensia virală a fost titrată și conservată la -80°C. Ulterior suspensia virală a fost folosită pentru infecția de *Sf9* aderente. S-a reușit acomodarea celulelor la cultură în suspensie și scalarea la 300mL, cultură care a fost infectată cu baculovirus. După recoltare, s-a reușit izolarea proteinei din celule și s-a încercat purificarea prin cromatografie de schimb ionic.

S-au derulat activități de evaluare condiții cultură pentru sistemele de expresie alese. Pentru evaluarea numărului relativ de bacterii și copii de plasmid s-a folosit detecția prin qPCR folosind sistemul SYBR Green. Primerii folosiți amplifică o regiune din gena care conferă rezistență la kanamicină (km), care se află situată pe plasmid și o genă de pe cromozomul bacterian, care se regăsește într-o singură copie și se află la distanță de originea replicării.

În scopul expresiei de proteine de interes în condiții optimizate, a metodelor de procesare ale proteinelor exprimate în scopul purificării și refoldării, al identificării unor caracteristici fizico-chimice ale proteinelor obținute și al evaluării unor parametri de activitate biologică a proteinelor obținute s-a avut în vedere realizarea de proteine de fuziune cu două variante de ELP, anume V96 și S48I48. S-au realizat culturi bacteriene în volum de 100mL. După incubarea de 3 ore cu IPTG masa bacteriană a fost separată prin centrifugare. Izolarea proteinelor de interes s-a realizat prin colectarea componentelor din periplasm prin șoc osmotic la rece. Frația periplasmică a fost supusă la două runde de inducere a tranziției către faza solidă a proteinelor de interes prin aducerea soluției la 3M NaCl și incubarea timp de 10 minute la 50°C. Comportamentul celor două proteine purificate la încălzire a fost studiat prin observarea dimensiunii particulelor în soluție. S-au folosit metode calorimetrice bazate pe DLS și DSF.

Descriere activitate și rezultate Faza 2b

S-a încercat expresia recombinantă în sistem bacterian de proteină VP1 și VP3, proteine de capsidă a virusului HBoV1. S-a observat expresia doar în cazul VP3 și s-a realizat design experimental pentru inserarea unei regiuni DogTag în regiunea VRIII a VP3 pentru a imobiliza proteine fuzionate cu DogCatcher.

Stadiul de atingere a obiectivelor

Obiectivele fazelor au fost îndeplinite în totalitate. S-au evaluat diferite sisteme de expresie procariotă și eucariotă pentru proteine recombinante de exprimat, s-au evaluat condiții de cultură pentru sistemele de expresie alese, s-au exprimat proteine de interes în condiții optimizate, s-au dezvoltat metode de procesare ale proteinelor exprimate în scopul purificării și refoldării, s-au identificat unele caracteristici fizico-chimice ale proteinelor obținute și s-au evaluat unii parametri de activitate biologică a proteinelor obținute.

De asemenea, s-a reușit sinteza de VP3 a virusului HboV1.

Rezultate publicate/diseminate

Faza 2a:

- 1 articol științific publicat (3 articole științifice în pregătire vor fi trimise către publicare);
- 4 prezentări la conferințe științifice.

Faza 2b:

- 1 prezentare la conferință științifică.

Responsabil Proiect
CSIII Vlad TOFAN