

УДК 578.56

СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА В СИСТЕМЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

**Сазонова Ю.В., студентка 5 курса факультета ветеринарной
медицины и биотехнологий**

**Научный руководитель – Ляшенко Е.А., кандидат биологических
наук, доцент
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

***Ключевые слова:** вирус, рекомбинационная кассета, трансфекция, клонирование, лигирование, ПЦР, секвенирование.*

Данная работа посвящена построению общей схемы создания рекомбинантного вируса в системе эукариотических клеток с использованием методов молекулярного клонирования. Таким образом, данный вектор может быть использован для создания маркированных вакцин.

Общая стратегия создания рекомбинантного вируса включает построение рекомбинационной кассеты содержащей часть генома используемого вируса. Эта кассета трансфицируется в чувствительные клетки вместе с нативным вирусом, а затем клетки проверяются на наличие рекомбинанта. в дополнение к части генома, вектор переноса также содержит промотор, чужеродные гены, представляющие интерес, и репортерный ген. Последовательности генома должны располагаться в начале и конце кассеты, чтобы обеспечить гомологичную рекомбинацию между плечами вектора и геномом вируса. При этом вакцинированные или инфицированные животные могут быть дифференцированы серологическим анализом, который обнаруживает антитела против удаленного гена. Таким образом, данный вектор может быть использован для создания маркированных вакцин. Борьба с болезнью осуществляется путем вакцинации аттенуированным вирусом с deletированными генами совместно с серологической дифференциацией вакцинированных и инфицированных животных [1-3].

В рамках молекулярно-генетических методов исследования проводят выделение ДНК с использованием коммерческих наборов, согласно инструкции производителя. в качестве клинического материала используют образец вируса, применяемый в дальнейшем. Выделение ДНК производится для дальнейшего использования в виду биоинформатического анализа, амплификации целевых генов и молекулярного клонирования.

Для идентификации генома вируса болезни проводят ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентного зонда и праймеров, комплементарных нуклеотидной последовательности фрагмента генома вируса. Полимеразную цепную реакцию для наработки ампликонов проводят на амплификаторе, используя реакционную смесь [4].

ПЦР с электрофоретической детекцией проводят с целью накопления ампликонов для молекулярного клонирования фрагментов генома используемого вируса. Результаты электрофореза учитывают на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Амплифицированные фрагменты ДНК появляются в виде светящихся оранжевых полос в треках с исследуемыми образцами относительно маркера. с помощью маркера молекулярной массы определяют размеры исследуемых фрагментов ДНК. Для сохранения результатов реакции используют геледокументирующую систему [5].

Очистка вырезанных из геля ПЦР-продуктов проходит с помощью коммерческого набора, согласно инструкции производителя. Оценку очищенных образцов проводили спектроскопией. Полученные препараты используют для дальнейших серологических и генетических исследований. в дальнейшем секвенируют последовательности генома вируса, с последующей сборкой.

Для исследования функций целевого белка, необходимо получить генетические конструкции, содержащие последовательность целевого гена и маркерный белок. в качестве вектора используют плазмиду, конструкция позволяет отследить локализацию целевого белка в экспериментах на клеточных культурах и функциональные изменения в экспериментах *in vitro*, *in vivo* [4].

С целью получения векторной системы для экспрессии белков на основе вируса (аттенуированного), разрабатывается схема клонирования, которая показывает, что рекомбинационная кассета представляет собой генетическую конструкцию на основе плазмидного вектора и содержит фрагменты генома вируса («плечи» рекомбинации), полноразмерный целевой ген и маркерный репортерный ген (флуоресцирующий). Плечи рекомбинации представляют собой фрагменты генома аттенуированного штамма вируса длиной от 500 п.о., расположенные слева и справа от локуса целевого гена под контролем маркерного репортерного гена. Ген, кодирующий маркерный флуоресцентный белок, под контролем эукариотического промотора был использован в качестве репортерного гена для дальнейшего скрининга рекомбинантных клонов. с целью детекции экспрессии целевого белка к последовательности гена добавляют метку (последовательность HA-tag).

В ходе работ по молекулярному клонированию амплифицируют нужные гены. Далее проводят реакцию гидролиза целевых фрагментов с соответствующими ферментами рестрикции для каждого амплифицированного фрагмента, затем следует реакция лигирования [1].

В результате амплифицированные фрагменты будут клонированы в плазмиду и получается генетическая конструкция, содержащая фрагменты генома вируса «плечи рекомбинации», репортерный ген и целевой ген слитый с меткой (HA-tag). Для проверки полученных конструкций проводят трансформацию химически компетентных клеток плазмидными ДНК. Для каждой конструкции проводят отбор положительных клонов.

Далее нарабатываются препараты плазмидной ДНК. Затем перевиваемую клеточную культуру трансфицируют рекомбинационной кассетой и инфицируют родительским вирусом различной множественности (m.o.i). Рекомбинантные клоны отбирают по репортерной флуоресценции.

Библиографический список:

1. Лопатина, А.Б. Химическое обеспечение механизмов репарации ДНК микробиологических систем // А.Б. Лопатина/ Успехи современного естествознания.- 2015. - №12. - С. 37 – 41.

2. Бактериофаги зооантропонозных и фитопатогенных бактерий / Д.А. Васильев и др. // Ульяновск, 2017. – 176 с.

3. Выделение, диагностика и идентификация бактерий рода *Klebsiella* / Е.А. Бульканова // в сборнике: Региональные проблемы народного хозяйства. Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых. – Ульяновск. - 2004. - С. 257-262.

4. Ефрейторова Е.О. Методы индикации и идентификации бактерий вида *Serratia marcescens* в песке детских площадок/ Е.О. Ефрейторова, Л.П.Пульчеровская, Д.А.Васильев, С.Н. Золотухин, Н.И. Молофеева// Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы VI Международной научно-практической конференции. -Ульяновск.- 2015.- С. 114-117.

5. Ефрейторова Е.О. Распространенность бактерий вида *S. marcescens* в объектах окружающей среды и пищевых продуктах/ Е.О. Ефрейторова, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин /Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы VII Международной научно-практической конференции.-Ульяновск.- 2016.- С. 204-211.

**STRATEGY FOR CREATING A RECOMBINANT VIRUS IN THE
SYSTEM OF EUKARYOTIC CELLS**

Sazonova. Y. V.

Keywords: *virus, recombination cassette, transfection, cloning, ligation, PCR, sequencing.*

This work is devoted to the construction of a general scheme for creating a recombinant virus in a system of eukaryotic cells using molecular cloning methods. Thus, this vector can be used to create labeled vaccines.