

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА E183L (P54) ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Казакова А.С., Власова Н.Н.
Kazakova A.S., Vlasova N.N.

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии
National Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology of Russia*

The article is dedicated to plasmid constructing for the subsequent production of the recombinant protein p54 of African swine fever virus. Specificity of insert of the gene E183L was confirmed in PCR and was sequenced. Recombinant p54 is destined for using in analyses of porcine serums in Western-blotting and for receiving of the rabbit-antisera to recombinant protein p54.

Вирус африканской чумы свиней (вирус АЧС) – высоко контагиозный агент, вызывающий заболевание у свиней, характеризующееся высокой летальностью, сверхострым, подострым, острым и хроническим течением. В 2000г. возбудитель отнесен к семейству *Asfarviridae* [6]. Геном вируса представлен двуспиральной ДНК, размером от 170 до 190г.п.о., имеет до 167 открытых рамок считывания [2]. В 2007 году АЧС зарегистрирована в Грузии, с 2008 года вспышки ее регистрируются на территории Российской Федерации. Актуальной является проблема совершенствования средств и методов диагностики данного вируса. Использование рекомбинантных технологий увеличивает безопасность приготовления препаратов специфических антигенов, а синтезируемые генно-инженерные белки устойчивы при хранении и стандартны в применении.

Анализ литературных данных показал, что основными диагностически значимыми белками вируса АЧС являются р30, р72, р54, р22 и р12.

Белки р12 и р54 являются поздними белками и локализуются в вирусных фабриках [7, 9]. р12 высоко консервативен, формирует димеры с относительной молекулярной массой 17 кДа и является белком прикрепления [3, 5, 13]. р54 отвечает за прикрепление вируса АЧС к клетке хозяина, его размеры варьируют между 24 и 28 кДа у различных вирусных изолятов [8].

р22 выявляется на плазматической мембране инфицированных клеток на раннем этапе инфекции [4].

Белок р72 является высококонсервативным мажорным антигеном [12], который продуцируется на поздних стадиях инфекции и локализуется в промежуточных и внешних слоях внутриклеточных вирусных частиц [1, 7].

р30 – фосфопротеин, для него характерна олигомеризация. Функция р30 в репликативном цикле вируса АЧС неизвестна. Возможно, что р30 выполняет регуляторную роль [11].

Alcaraz С.І. в 1995г. показал возможность использования рекомбинантного белка р54 для диагностики АЧС методом Вестерн-блоттинга [8].

Целью нашего исследования было клонирование полноразмерного гена E183L вируса АЧС в прокариотическом векторе для последующего конструирования рекомбинантного продуцента гликопротеина р54.

Материалы и методы

В качестве вектора для клонирования нами была выбрана многокопийная плазмида pTZ57R, а носителя конструкции – компетентные клетки *E.coli* штамма XL-1 (Promega).

Подбор праймеров, фланкирующих ген E183L (p54), осуществляли с использованием программ BioEdit 6.0 и Oligo 6 на основе анализа опубликованных в GenBank первичных последовательностей геномов изолятов возбудителя АЧС, проверив их в программе BLASTn на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

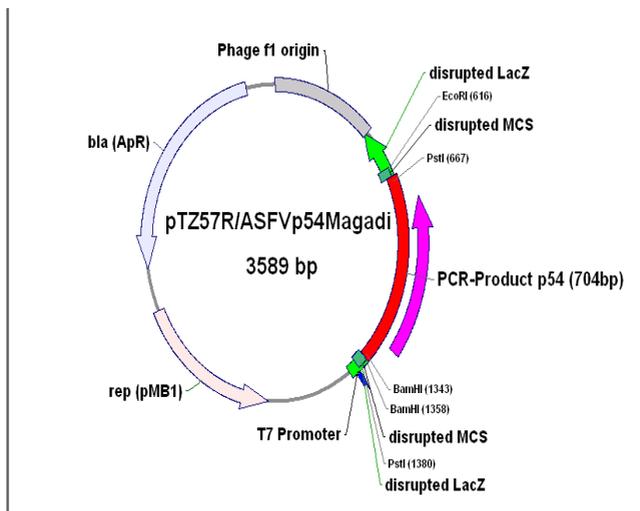


Рис. 1.-Схема рекомбинантной плазмиды pTZ57R/ASFVp54.

Для постановки ПЦР использовали: Taq- и Pfu- ДНК-полимеразы, буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5мМ MgCl_2 , смесь трифосфатов 0,5мМ, (Fermentas), праймеры, фланкирующие ген E183L (по 10пМ каждого). В качестве матрицы для получения и накопления ПЦР-продукта использовали ДНК вируса АЧС штамма *Magadi* (100 мкг/мл).

Температуру отжига праймеров подбирали постановкой реакции с градиентом температур от 42 до 62°C на приборе PalmCycler (Corbett Research, Австралия). Размер амплифицированного фрагмента – 704 п.о. Режим ПЦР: предварительная денатурация при 95°C-5мин × 1цикл; денатурация - 95°C-30с, отжиг - 57°C-30с, элонгация - 72°C-40с × 30циклов; заключительная элонгация при 72°C-5мин × 1цикл. Учет результатов проводили методом электрофоретического детектирования в 1,5%-ном агарозном геле с бромистым этидием.

Для очистки ПЦР-продукта от агарозного геля использовали Набор реагентов для извлечения ДНК из агарозных гелей (Fermentas).

Лигирование проводили с использованием 5 е.а. T4 ДНК-лигазы (Fermentas) при 6°C в течение 16 часов.

В работе использовали ряд молекулярно-биологических методов (ПЦР,

клонирование в прокариотическом векторе)[10].

Результаты и обсуждение

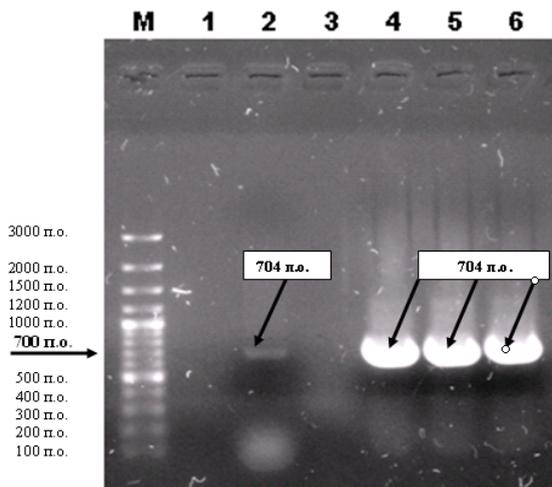


Рис.2.-Электрофореграмма разделения продуктов амплификации гена E183L (р54) на различных матрицах ДНК вируса АЧС (1,3 – общий пул ДНК интактной культуры клеток CV-1 и плазмиды рTZ57R соответственно; 2 - ДНК вируса АЧС штамма Magadi; 4,5,6 – рестрицированная плазмиды рTZ57R/ASFVp54 в качестве матрицы; М – маркер молекулярной массы Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas)).

Для клонирования был накоплен и в последствие очищен от агарозного геля ПЦР-продукт полноразмерного гена E183L (704 п.о.), кодирующего белок p54 вируса АЧС штамма *Magadi*. После проведения лигирования смесью трансфицировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL-1. Получили 5 клонов, из которых отобрали один. Проверили его однородность, сделав посев штрихом на 1,8% SOB-агаре с ампициллином (100 мкг/мл) в присутствии IPTG и X-Gal.

Далее рекомбинантный клон выращивали в жидкой питательной среде SOB с ампициллином, затем из бактериальной культуры выделяли плазмидную ДНК [10] и определяли ориентацию встройки в плазмиде. Рестрикцию проводили по сайту PstI. Данный сайт находится в последовательности полилинкера плазмиды рTZ57R и в последовательности обратного праймера. В электрофореграмме рестрицированной плазмиды клона выявлялось 2 фрагмента: один – 713 п.о., второй – 2876 п.о., что соответствует встройке и телу плазмиды рTZ57R соответственно. Структура рекомбинантной плазмиды представлена на *Рисунке 1*.

Специфичность встройки клона *pTZ57R/ASFVp54* определяли методом ПЦР. В качестве матрицы использовали обработанную рестриктазой EcoRI плазмиду (Рисунок 2). Определение нуклеотидной последовательности встройки проводили секвенированием. Аналогов сиквенс р54 штамма *Magadi* в GenBank не найдено. Максимальная степень гомологии 97% и 95% установлена с последовательностями штамма *Kenya 1950* и *Uganda 64*, соответственно (Таблица №1).

Таблица 1. Оценка степени гомологии полноразмерного гена E183L, кодирующего р54 вируса АЧС штамма Magadi

Шифр штамма в GeneBank	Название штамма вируса АЧС в GeneBank	Идентичность, в %
AY261360.1	АЧС штамм Kenya 1950 р54 (E183L) ген	97%
FJ174430.1	АЧС штамм Uganda64 структурный белок р54 (E183L) ген	95%

Заключение

В результате проведенных исследований получена рекомбинантная плазида, несущая последовательность гена E183L, кодирующего р54 штамма *Magadi*, пригодная для последующего конструирования рекомбинантного продуцента гликопротеина р54. Сиквенс ДНК гена E183L штамма *Magadi* проведен впервые. Клонированная последовательность соответствует таковой гена E183Lвируса АЧС и максимальная степень гомологии (97%) наблюдается с аналогичным геном штамма *Kenya 1950*.

Литература:

1. African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope/ M.V. Borca, P. Iruata, C. Carrillo et al.// *Virology*. – 1994. - № 201 (2). – P. 413-418.
2. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus/ R.J. Yanez, J.M. Rodriguez, M.L. Nogal, L. Yuste, C. Enriquez, J.F. Rodriguez, E. Vinuela// *Virology*. – 1995. – Vol. 208. – P. 249-278.
3. Amino acid sequence and structural properties of protein p12, an african swine fever virus attachment protein/ A. Alcamí, A. Angulo, G. Lopez-Otin et al.// *J. Virol.* – 1992. - № 66. – P. 3860 - 3868.
4. Camacho, A., Vinuela, E. Protein p22 of african swine fever virus: an early structural protein that is incorporated into the membrane of infected cells/ A. Camacho, E. Vinuela// *Virology*. – 1991. - № 181. – P. 251-257.
5. Comparison of the sequence of the gene encoding African swine fever virus attachment protein p12 from field virus isolates and viruses passaged in cell culture/ A. Angulo, E. Vinuela, A. Alcamí// *J. Virol.* – 1992. - № 66. – P. 3869-3872.
6. Family Asfarviridae. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of*

Viruses/ L.K. Dixon, J.V. Costa, J.M. Escribano, D.L. Rock, E. Vinuela, P.J. Wilkinson, edited by M.H.V Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L Bishop, E.B. Carestens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B.F.A. Wickner, C.M. Murphy, D.H.L. Fauquet, S.A. Bishop, A.W. Ghabrial, G.P. Jarvis, M.D. Martelli [et al.]// Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – Academic Press. – San Diego, 2000. – P. 159-165.

7. General morphology and capsid fine structure of african swine fever virus particles/ J.L. Carrascosa, J.M. Carazo, A.L. Carrascosa et al.// Virology. – 1984. - № 132. – P. 160-172.

8. Highly specific confirmatory western blot test of african swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54/ C.I. Alcaraz, F. Rodriguez, J.M. Oviedo et al. // J. Virol. Methods. – 1995. - № 52. - P. 111-119.

9. Localization of the african swine fever virus attachment protein p12 in the virus particle by immunoelectron microscopy/ A.L. Carrascosa, I. Sastre, P. Gonzalez et al.// Virology. – 1993. - № 193. – P. 460-465.

10. Molecular Cloning. A laboratory Manual/ T. Maniatis, E.F. Fritsch, S. Sambrooks// Cold Spring Harbor Laboratory. – Cold Spring Harbor, New York, 2006.

11. Sequence and characterization of the major early phosphoprotein p32 of african swine fever virus/ F.J. Prados, E. Vinuela, A. Alcami// J. Virol. – 1993. - № 67. – P. 2475-2485.

12. Strong sequence conservation of african swine fever virus p72 protein provides the molecular basis for its antigenic stability/ M. Yu, C.J. Morrissy, H.A. Westbury// Arch. Virol. – 1996. - № 141. – P. 1795-1802.

УДК 619: 616 – 07

ПРИМЕНЕНИЕ ЦЕОЛИТОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ РАССТРОЙСТВ
У НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ
APPLICATION OF ZEOLITES FOR PREVENTIVE MAINTENANCE
OF GASTROENTERIC FRUSTRATION AT NEWBORN CALFS

Казимир А.Н. Хайруллин И.Н., Мухитов А.З.
Kazimir A.N., Hairullin I.N., Muhitov A.Z.
Ульяновская ГСХА
The Ulyanovsk state agricultural academy

In article the data of researches on studying of efficiency of application of zeolites for preventive maintenance of gastroenteric frustration at newborn calfs is presented. It is established that natural zeolites render beneficial effect on a current of an albuminous exchange, raises protective functions of an organism and improves function of a liver of calfs. Thanks to unique properties natural zeolites