

УДК 619:579

**КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ,
НЕСУЩЕЙ ОБЛАСТЬ ГЕНА P72 ВИРУСА АЧС**

Мима К.А., 5 курс, факультет ветеринарной медицины

Научный руководитель: к.б.н., ст.н.с. Калабеков И.М.

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА».

Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная, как правило, остро протекающая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью [1], вызывается вирусом, который поражает 100 % животных всех пород и возрастов [2].

АЧС относится к группе трансграничных инфекций животных, определенных ФАО как болезни, которые оказывают существенное влияние на экономику, торговлю и продовольственную безопасность значительного количества стран, могут легко распространиться из одной страны в другую и достигать эпидемических масштабов [3].

На сегодняшний день в России создалась напряженная обстановка по африканской чуме среди свиней. На территорию нашей страны АЧС была занесена в ноябре 2007 г., заболевание диагностировали у кабанов в Шатойском районе Республики Чечня. В последующие годы вспышки болезни регистрировали еще в 12 субъектах России: Республиках Северная Осетия-Алания, Кабардино-Балкария, Калмыкия, Дагестан, Ингушетия, Краснодарском и Ставропольском краях, Ростовской, Волгоградской, Астраханской, Ленинградской, Оренбургской областях [2].

Клинические признаки и патологоанатомические изменения при АЧС сходны с таковыми при КЧС [1, 4, 6].

Исходя из выше сказанного, следует заметить, что диагностика АЧС до сих пор остается актуальной проблемой. На данный момент чаще всего используется ПЦР диагностика [5].

Создание рекомбинантной плазмиды, несущей последовательность консервативной области гена p72 позволит исключить работу с непосредственно вирусным агентом и может успешно применяться в качестве положительного контроля.

Конструирование рекомбинантной плазмиды, несущей последовательность консервативной области гена B646L вируса АЧС, было проведено с целью создания положительного контроля (ПК ПЦР) амплификации в ПЦР тест-системе для выявления генома вируса АЧС. Кроме того, использование такой конструкции позволило оценить аналитическую чувствительность тест-системы.

Предварительно был накоплен и впоследствии очищен от агарозного геля ПЦР-продукт участка гена, кодирующего белок Vp72 вируса АЧС, размером 485 п.о. (рис. 1 А, Б). Лигирование проводили по поли-Т-концам в области Multi cloning site (MCS) плазмиды pTZ57R (рис. 1 В). В последующем, лигазной смесью трансформировали компетентные клетки E. coli.

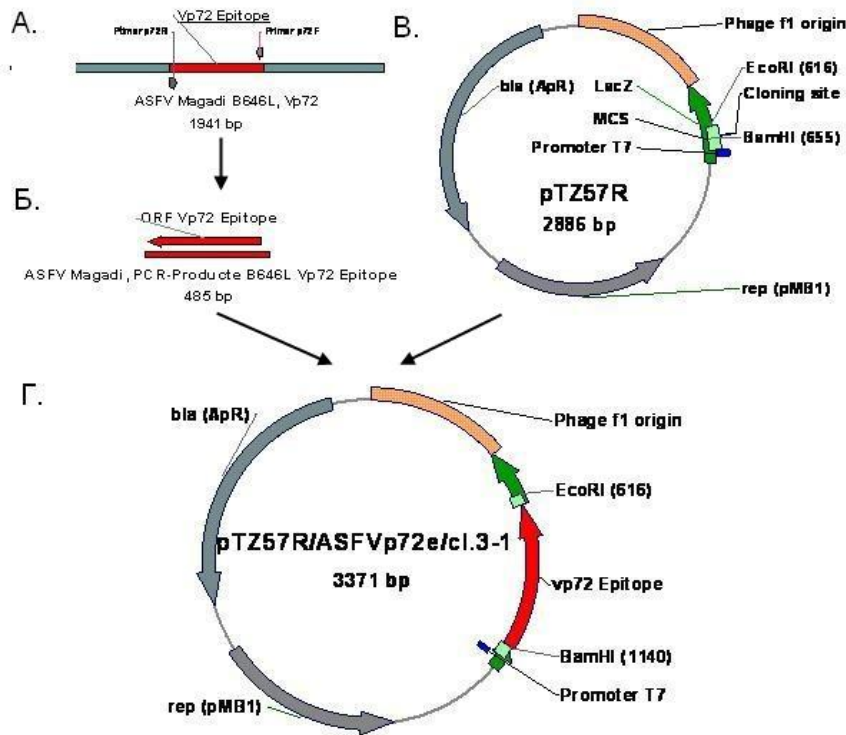


Рис. 1. Схема получения рекомбинантной плазмиды для применения ее в качестве ПК ПЦР АЧС (А. схематичное изображение гена B646L, кодирующего Vp 72 вируса АЧС, с указанием расположения диагностических праймеров; Б. ПЦР-продукт (встройка) для клонирования в прокариотическом векторе; В. Вектор для клонирования ПЦР-продукта – pTZ57R; Г. рекомбинантная плаزمида pTZ57R/ASFVp72e/cl.3-1, полученная в ходе молекулярно-биологических манипуляций).

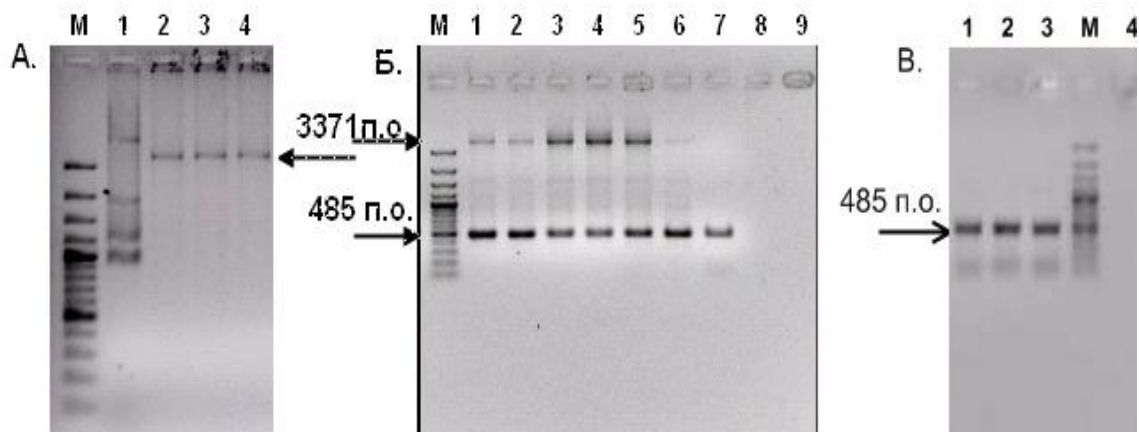


Рис. 2. Электрофореграмма результатов рестрикционного анализа (А) и ПЦР с диагностическими праймерами на ген B646L, кодирующий Vp72 вируса АЧС с использованием в качестве матрицы плазмиды, выделенной из клона pTZ57R/ASFVp72e/cl.3-1, необработанной (Б) и обработанной рестриктазами Eco RI и BamH I (В), и ДНК вируса АЧС.

Треки: (А: 1 – рекомбинантная плазмида pTZ57R/ASFVp72e/cl.3-1 нерестрицированная, 2-4 - плазмида pTZ57R/ASFVp72e/cl.3-1 после рестрикции EcoR I; Б: 1-6 – плазмида pTZ57R/ASFVp72e/cl.3-1 необработанная рестриктазой в качестве матрицы для ПЦР; В: 1,2 – рестрицированная плазмидная ДНК в качестве матрицы; Б7, В3 – ДНК вируса АЧС в качестве матрицы; Б8,9 и В4 – отрицательный контроль реакции; М – маркер молекулярной массы Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas)).

При постановке реакции с применением нерестрицированной плазмидной ДНК и дальнейшем анализе продуктов ПЦР в электрофорезе выявляли дополнительную полосу на уровне 3400 п.о. Рестрицированная и переосажденная этанолом с ацетатом натрия при -70°C плазмида при постановке ПЦР неспецифических фрагментов на уровне 3400 п.о. не давала (Рис.2В). Поэтому, в последующем, в качестве матрицы использовали обработанную рестриктазой рекомбинантную плазмиду. Сконструированная плазмида успешно применяется в качестве положительного контроля ПЦР. В виду своего небольшого размера, она высоко устойчива при хранении и использовании, приготовление ее безопасно.

Библиографический список

1. Вирусные болезни животных/ В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. – М., ВНИТИБП. – 1998. – 928 с.
2. Гересимов, В. Ликвидация Африканской чумы свиней в республике Абхазия / В. Герасимов, С. Кукушкин, А. Мищенко, В.Никифоров // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2009.- 3.-С.11-16.
3. Юбхашини, Э. Африканская чума свиней в республике Маврикий/Э. Юбхашини// Ветеринарный консультант. – 2008. - №22.-С. 10-12.
4. Borca, M.V. African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope/ M.V. Borca, P. Irusta, C. Carrillo, C.L. Afonso, T. Burrage, D.L. Rock // Virology. – 1994. – Vol. 201, № 2. – P. 413-418. - v. 58. - P. 707-727
5. Steiger, Y. Rapid and biologically safe diagnosis of african swine fever virus infection by using polymerase chain reaction/ Y. Steiger, M. Ackermann, C. Mettraux, U. Kihm. // J. Clin. Microbiol. – 1992. - Vol. 30, № 1. – P. 1-8.
6. Zsak, L. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants / L.Zsak, Z.Lu, T. G.Burrage, J. G.Neilan, G. F. Kutish, D. M. Moore, D. L. Rock // J. Virol. – 2001. - Vol.75.- P. 3066-3076.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMIDS THAT CARRYING THE P72 REGION OF THE GENE AFRICAN SWINE FEVER

Mima K.A., Kalabekov I.M.

This paper describes a method for obtaining artificially constructed plasmids carrying a region of P72 gene of the virus an African swine fever. The scheme of obtaining the recombinant plasmid for use it as a PC ASF PCR. rezyltaty are testing recombinant positive control.