

сти коров при разном уровне минеральных элементов в их рационах /В.Е. Улитко, С.В. Дежаткина, В.В. Ахметова, Н.А. Любин, Л.А. Пыхтина, В.В. Козлов. 4 Международная научная конференция «Миграция тяжёлых металлов и радионуклеидов в звене «почва - растения - животные - продукты животноводства - человек». - Великий Новгород. – 2003. – С. 125-128.

8. Приложение к Федеральному закону “Технический регламент на молоко и молочную продукцию” Допустимые уровни содержания потенциально опасных веществ в сыром молоке, сыром обезжиренном молоке и сырых сливках (информация об изменениях) с изменениями и дополнениями от 22 июля 2010 г.

УДК: 619:615.317:616.98:578

КЛОНИРОВАНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ КОПИЙ КДНК ГЕНОВ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ

Иматдинов Ильназ Рамисович, аспирант, ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН¹, тел.: 8-920-925-5043, e-mail: ilnazlcf@ya.ru;

Прилипов Алексей Геннадьевич, кандидат биологических наук, «А фермент»², тел.: 8-499-391-0157;

Капустина Ольга Владимировна, кандидат ветеринарных наук, ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН¹, тел.: 8-492-437-2535, e-mail: OlgaKapustina2010@yandex.ru;

Власова Наталья Никифоровна, доктор биологических наук, ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН¹, тел.: 8-909-167-9874, e-mail: vlanany@yandex.ru;

Балышева Вера Ивановна, доктор биологических наук, ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН¹, тел.: 8-960-733-1323, e-mail: balyvi@rambler.ru;

Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН¹
601120, г. Покров Петушинского района Владимирской области
«А Фермент»²
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16.

Ключевые слова: лихорадка долины Рифт, клонирование генов, плазмиды, микрокапсулирование, ДНК-вакцины, вирусная РНК, ПЦР.

Изложены результаты клонирования генов вируса лихорадки долины Рифт, кодирующие нуклеопротеин N и гликопротеины Gn/Gc, в плазмидные векторы pTZ57R/T and pET32b(+). Оценен выход ПЦР продуктов в зависимости от метода выделения вирусной РНК, вирусосодержащего материала и варианта олигонуклеотидных праймеров.

Работа выполняется при поддержке гранта РФФИ проект №: 11-08-01245 а

Лихорадка долины Рифт (Лихорадка Рифт-Валли (ЛДР), Rift Valley fever) — это трансмиссивная зооантропонозная вирусная инфекция, которая характеризуется лихорадкой, геморрагическим синдромом, абортами, ретинитом и энцефалитом.

Вирус ЛДР представлен единственным серотипом и относится к роду *Phlebovirus* семейства *Bunyaviridae*. Он обладает выраженной патогенностью для человека и многих видов диких и домашних копытных животных. В эндемичных регионах заболе-

ваемость ЛДР регистрируется в виде спорадических случаев, эпидемических вспышек крупных эпизоотий и эпидемий.

Вирус ЛДР способен инфицировать многие виды животных, включая крупный рогатый скот, овец, верблюдов и коз.

Подавляющее большинство случаев инфицирования людей происходит в результате прямых или косвенных контактов с кровью или органами инфицированных животных. Вирус может передаваться человеку при манипуляциях с тканями животных во время их забоя или разделки, оказании помощи животным при родах, проведении ветеринарных процедур.

В большинстве случаев инфекция протекает с лихорадкой и миалгией. Изредка развивается геморрагическая лихорадка с тяжелыми поражениями печени. Около 10% случаев протекают в легкой форме, но приводят к хориоидиту. При офтальмоскопии обнаруживают отек, кровоизлияния и инфаркты сетчатки. В отдельных случаях у переболевших животных и людей развивается слепота. Значительно реже (меньше чем в 1 случае из 200) развивается вирус индуцированный энцефалит [3].

Инфицирование происходит в результате укусов инфицированных комаров, чаще всего комаров вида *Aedes*. Самка комара способна также передавать вирус непосредственно своему потомству через откладываемые яйца, из которых появляются новые поколения инфицированных комаров. Этим объясняется непрерывное присутствие вируса ЛДР в энзоотических очагах и устойчивый механизм существования вируса, так как яйца комаров могут сохранять свою жизнеспособность в сухих условиях в течение нескольких лет. Период выпадения обильных осадков приводит к быстрому росту их численности, а это, в свою очередь, приводит к распространению вируса среди животных, кровью которых они питаются. Возможна также передача вируса ЛДР гематофагами (питающимися кровью мухами) [7].

Заболевание распространено во мно-

гих странах Африки и Ближнего Востока. В 1997-1998 годах крупная вспышка болезни произошла в Кении, Сомали и Танзании, а в сентябре 2000 года случаи заболевания ЛДР были подтверждены в Саудовской Аравии и Йемене [7]. Участились сообщения о единичных случаях ЛДР вне субтропических африканских стран, ее возможное появление и распространение в северных странах, включая страны Средиземноморского бассейна, стали серьезной причиной для беспокойства [8]. Также имеются данные о появлении комаров-переносчиков во многих европейских странах, связано это, вероятно, с изменениями климатических условий [1, 2].

Импорт копытных животных, а также поездки людей на африканский континент могут стать причиной интродукции вируса ЛДР на эндемичные территории. Следует всегда помнить, что вирус ЛДР рассматривается (наряду с вирусами других геморрагических лихорадок) в качестве агента высшей категории «А» из-за опасности применения в биотеррористических целях [4].

Таким образом, из-за высокой опасности возникновения эпидемий и эпизоотий возникает необходимость создания эффективных защитных препаратов для сельскохозяйственных животных и человека. Одним из наиболее перспективных направлений разработки средств специфической профилактики ЛДР является создание генно-инженерных и ДНК-вакцин. Поскольку эффективность вакцинации плазмидами подтверждена многими исследованиями, представленная работа является продолжением данных исследований в области разработки ДНК-вакцин.

Белок N вируса лихорадки долины Рифт является носителем группспецифических свойств и выявляется в РСК. Гликопротеины (Gn и Gc) - антигены, выявляемые в РН и РТГА. Это протективные антигены, обладающие гемагглютинирующими свойствами, которые у буньявирусов выражены в меньшей степени, по сравнению с ортомиксо- и парамиксовирусами. Они индуцируют образование вируснейтрализующих антител.

Целью представляемой работы является конструирование рекомбинантных плазмид, несущие полноразмерные копии генов, кодирующих протективные белки: нуклеопротеин N и гликопротеины Gc и Gn вируса лихорадки долины Рифт.

Материалы и методы

В работе использован штамм вируса ЛДР «1974-ВНИИВВиМ» для интрацеребрального заражения новорожденных мышат-сосунов, доза заражения $6,0 \text{ МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Подбор праймеров, фланкирующих указанные гены, осуществляли с использованием программ BioEdit 6.0 и Oligo 6.2 на основе анализа депонированных в GenBank первичных последовательностей геномов изолятов возбудителя ЛДР (RVF 35/74: segment M (JF784387.1), segment S (JF784388.1)).

Выделение РНК ЛДР проводили с использованием набора для выделения РНК («Omni», Россия) и методом фенольной экстракции с применением 4М ГТЦ.

Для постановки обратной транскрипции использовали AMV-ревертазу («Promega», США) и генно-инженерную M-MLV-ревертазу Reverse Transkriptase («α фермент», Россия), гексамерные рандом-праймеры («Fermentas», Литва).

Для постановки ПЦР Pfu-полимеразу («Fermentas», Литва) и Taq-полимеразу («α фермент», Россия), буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5мМ MgCl_2 , смесь трифосфатов 0,5мМ.

Реакции проводили в амплификаторе «Терцик» (Россия).

Фракционирование и визуализацию ПЦР ампликонов проводили методом электрофореза в 1,0 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия (1:1000, $\text{C}_{\text{EtBr}}=10$ мкг/мл) [6].

В работе использовались молекулярно-биологические методы (рестрикция, лигирование, ОТ-ПЦР) [6].

Оптимизация условий получения полноразмерных копий генов

Для накопления вирусосодержащего материала проводили интерцеребральное заражение новорожденных однодневных

мышат вирусом ЛДР, штамм «1974-ВНИИВ-ВиМ» в дозе $6,0 \text{ МЛД}_{50}$.

Поскольку для штамма характерно максимальное накопление вируса в головном мозге, пробы отбирали через 72-96 часов у особей с явными клиническими признаками: плавательные движения, паралич задних конечностей, цианозные слизистые, слепота, либо боязнь яркого света.

В ходе работы сравнивали количественный и качественный выход РНК ЛДР из мозгового и культурального вирусосодержащих материалов. По результатам исследований наибольший выход вирусной РНК из культурального материала наблюдали при использовании метода фенольной экстракции с применением 4М ГТЦ, в то время как из головного мозга мышей максимального выхода достигали при выделении набором для экстракции РНК «Omni»: 1,7-1,9 мкг с 1500 мкл 10% суспензии мозга.

Синтез кДНК проводили на свежеполученной матрице РНК вируса ЛДР (24-48ч.), выделенный из головного мозга мышей, либо из вирусосодержащего культурального (CV-1) материала, с титром не менее $8,5-8,9 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$ и $7,0-7,5 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно.

При постановке ПЦР с использованием праймеров, опубликованных Lagerdvist с соавторами (2009г), количество синтезированного продукта не превышало 10 нг.

Столь низкий выход ПЦР продуктов при использовании праймеров (Lagerdvist) объясняется тем, что праймеры были рассчитаны для аттенуированного штамма ЛДР «MP-12», который, вероятно, имеет значительные отличия в последовательности генома от таковой штамма «1974-ВНИИВ-ВиМ».

В связи с этим проводили подбор праймеров для амплификации полноразмерных копий генов Gn и Gc с помощью программ BioEdit 6.0 и Oligo 6.2. При выборе праймеров учитывали минимальное содержание самокомплементарных регионов в последовательности праймера, которые могут приводить к образованию шпилек и димерных

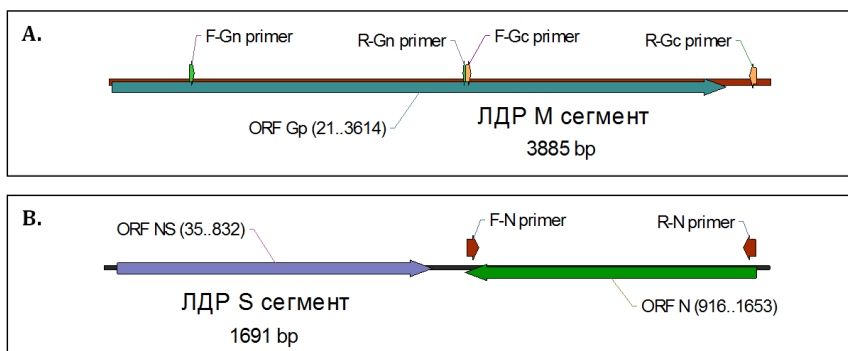


Рис. 1 – Схемы расположения праймеров

А. F-Gn, R-Gn, F-Gc и R-Gc на M сегменте

ORF Gp – открытая рамка считывания гликопротеина Gp; малыми стрелками указаны направления и места посадки праймеров: **F-Gn и R-Gn** – прямой и обратный праймеры, фланкирующие участок, кодирующий гликопротеин Gn; **F-Gc и R-Gc** – прямой и обратный праймеры, фланкирующие участки, кодирующий гликопротеина Gc

В. F-N, R-N на S сегменте

ORF NS – открытая рамка считывания неструктурного белка NSs, **ORF N** – открытая рамка считывания нуклеопротеина N; малыми стрелками указаны направления и места посадки праймеров

структур, также в структуру включены сайты рестрикции F-Gn Sall, R-Gn XbaI, F-Gc PstI, R-Gc SphI, F-N и R-N NotI для последующей встройки в плазмидный вектор.

Рассчитанный размер ПЦР-продукта, содержащего полноразмерный ген гликопротеина Gc, составлял 1521 п.о., гликопротеина Gn – 1583 п.о. и нуклеопротеина N – 737 п.о.

Синтез полноразмерных копий кДНК нуклеопротеина N

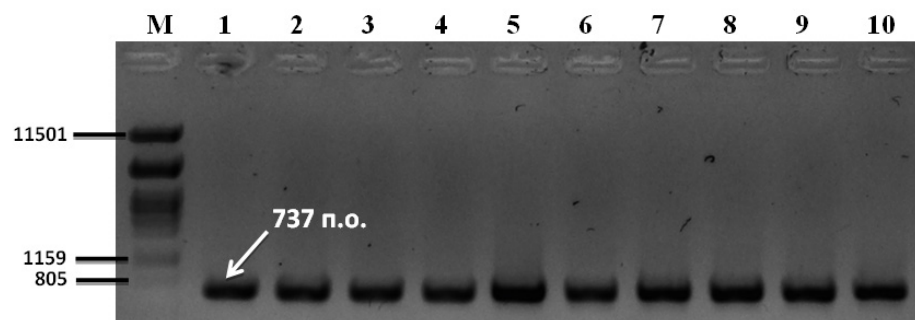


Рис. 2 – Электрофореграмма разделения продуктов амплификации гена, кодирующего нуклеопротеин N

M – маркер молекулярной массы DNA λ /PstI

1-10 - синтезированные ПЦР продукты, равные по массе теоретически рассчитанным ампликонам нуклеопротеина N

Для синтеза кДНК применяли M-MLV-ревертазу (200 е.а. на 20 мкл реакционной смеси), рандом-праймеры (1,0 мкг) и исходную матрицу (3,0мкл; C=1,6 мкг/мкл).

В ходе исследований оптимизированы условия обратной транскрипции РНК вируса ЛДР (полного генома и отдельных сегментов) и оценена эффективность использования ревертаз AMV (Promega) и M-MLV (α фермент). В процессе оптимизации условий было определено оптимальное значение количества вносимой РНК-матрицы: порядка 0,6-3,0мкг/мкл, с оптимумом в 1,6 мкг/мкл. Установлено, что при синтезе кДНК критичным является временной

интервал постановки синтеза после выделения РНК вируса, который не должен превышать 72 часа после выделения.

Для получения полноразмерных копий кДНК гена, кодирующего нуклеопротеин N, применяли Taq-полимеразу (5 е.а. на 25 мкл реакционной смеси), праймеры (F-N и R-N по 1,0 мкл; C=10рМ/мкл), в качестве матрицы использовали синтезированную кДНК (1,6мкл). Для ПЦР подобран следующий режим: 35 циклов с денатурацией при 95°C-30 с, отжигом праймеров при 50°C-30 с и элонгацией при 72°C-120 с, и заключительный единственный этап достройки 72°C-300 с.

Синтез полноразмерных копий гликопротеинов Gc и Gn

Реверсию проводили с использованием

М-MLV-ревертазы (200 е.а.), с праймерами F-Gc и F-Gn на матрице РНК М сегмента генома вируса ЛДР (5мкл; С=0,9мкг/мкл), полученный элюцией из агарозного геля.

Для синтеза копий генов, кодирующих Gc и Gn, проводили оптимизацию ПЦР по анализу количественного соотношения компонентов реакционных смесей и параметрам цикла ПЦР.

После оптимизации ПЦР системы по количественному соотношению компонентов реакционной смеси и параметрам цикла, были подобраны следующие условия: для постановки ПЦР применяли Taq-полимеразу (5 е.а.), праймеры F-,R-Gc и F-,R-Gn (по 10пМ), MgCl₂ (4мМ). Синтез кДНК (2 мкг) проводили при следующем режиме: 35 циклов с денатурацией при 95°C - 30 с, отжигом праймеров при 47°C - 30 с и элонгацией при 72°C - 120 с, и этап достройки 72°C - 600 с.

Эффективность синтеза и количественный выход ПЦР продукта в разработанной ПЦР системе составлял 200-250 нг на пробу.

Из рисунка 3 и 4 следует, что рассчитанные нами праймеры и подобранные условия постановки ОТ-ПЦР позволяют эффективно амплифицировать полноразмерные копии генов, кодирующих нуклеопротеин N и гликопротеины Gc и Gn.

Клонирование полноразмерных генов

После получения препаративных количеств ПЦР-продуктов проведено клонирование амплификатов указанных генов.

Первоначальное клонирование амплификатов Gc и Gn проводили в плазмидном векторе рTZ57R (Fermentas). В результате получено 58 клонов Gc и 68 клонов Gn, из которых методом рестрикционного анализа отобраны клоны, содержащие встройки Gc - рTZ57R/G1/4 и Gn рTZ57R/G2/1 для дальнейшего анализа.

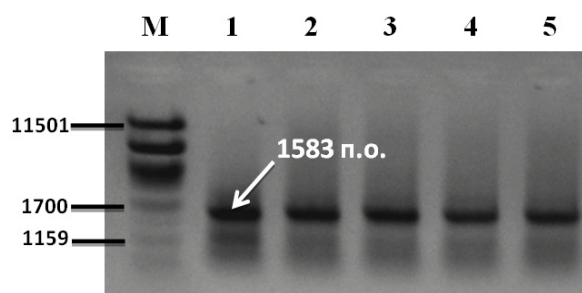


Рис. 3 – Электрофореграмма разделения ПЦР продуктов Gn

1-5 - амплификаты Gn

М - маркер мол.массы DNA фага λ/PstI

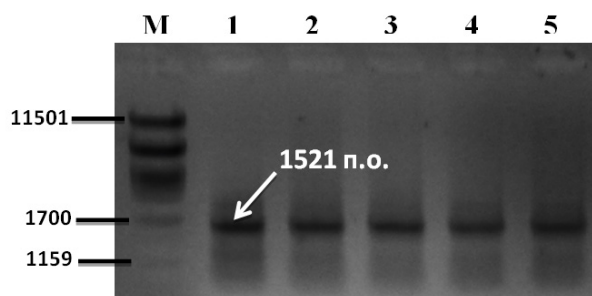


Рис. 4 – Электрофореграмма разделения ПЦР продуктов Gc

1-5 - амплификаты Gc

М - маркер мол.массы DNA фага λ/PstI

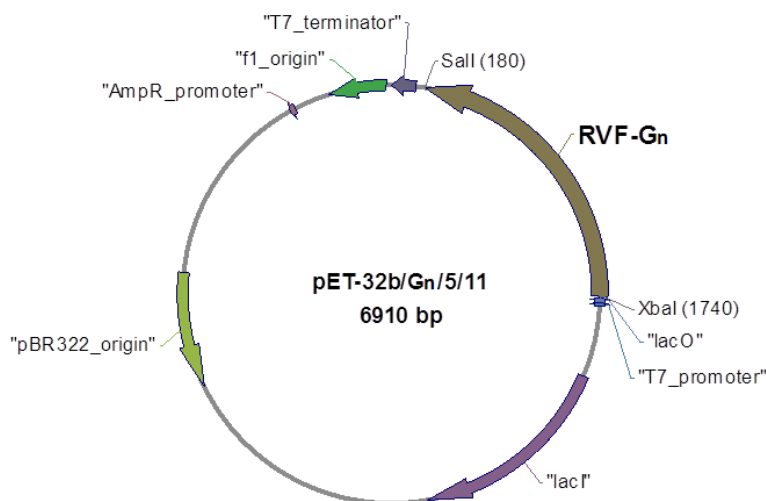


Рис. 5 – Схема рекомбинантной плазмиды рЕТ-32b/G2/5/11

Примечания :

RVF-Gn – встройка гена, кодирующего гликопротеин Gn, стрелкой указывается направление транскрипции

T7_Promoter, T7_terminator - T7 промотор и T7 терминатор, начало и конец транскрипции встройки гена

Данные плазмиды использовались так же, как матрицы для ПЦР с праймерами M13/pUC (Fermentas). Так, полученные ПЦР продукты на электрофореze в 1%-ном агарозном геле шли на уровне ~1500 п.о., что подтверждает наличие встройки, равной по молекулярной массе теоретически рассчитанной.

Для получения экспрессирующего вектора проведено направленное клонирование амплификатов Gn по сайтам рестрикции Sall и XbaI в плазмиду pE-T32b(+) (Novagen). По результатам рестрикционного и ПЦР анализа отобран клон pET-32b/Gn/5/11с рекомбинантной плазмидой, по молекулярной массе равной теоретически рассчитанной.

Заключение

В результате проведенных исследований получены полноразмерные копии генов, кодирующие нуклеопротеин N и гликопротеины Gc и Gn. Проведена оптимизация условий ПЦР для наработки полноразмерных копий генов Gn и Gc. Полученные кДНК использованы для конструирования рекомбинантных плазмид. В дальнейшем будет проведен сравнительный анализ иммуногенности препаратов при различных способах введения плазмид в организм животного (микрокапсулы, нативная, с адъювантом) и изучение индукции синтеза вирусоспецифических антител.

Библиографический список

1. Gerdes, G.H. Rift Valley fever / Rev Sci Tech. – 2004.-Vol. 23.-P.613-23.
2. Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region / S. Moutailler, G. Krida, F. Schaffner, M. Vazeille, A.B. Failloux // Vector Borne Zoonotic Dis.-2008.-Vol. 8.-P.749-53.
3. Peters, C.J. Pathogenesis of Rift Valley fever / C.J. Peters, G.W. Anderson // Contributions to Epidemiology and Biostatistics.- 1981.-N.3.-P.21-41.
4. Белов, А.В. Молекулярно-биологическая и вирусологическая характеристика вируса лихорадки долины рифт и создание тест-систем для диагностики этой инфекции: Автореф.дис... канд.биол.наук.-М.,2007. 3-4с.
5. Tetsuro Ikegami and Shinji Makino. Rift Valley fever vaccines // Vaccine.- 2009.- Vol.11. - P. 69–72.
6. Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual./ T. Maniatis, E.F. Fritsch, and S. Sambrooks // N.Y.: Cold Spring Harbor.- 2006.- 800 p.
7. Лихорадка Рифт-Валли. Информационный бюллетень №207 // Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/ru/
8. Chevalier V, Pépin M, Plée L, Lancelot R. Rift Valley fever - a threat for Europe. // Euro Surveill. 2010. №15(10) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19506