

УДК 619:578.828.61: 577.2

**КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ
ПЛАЗМИДЫ, КОДИРУЮЩЕЙ ПОЛНОРАЗМЕРНУЮ
КОПИЮ GAG - ГЕНА ВИРУСА ВИСНА-МАЕДИ**

*Барышникова Е.И., Колбасова О.Л., Малоголовкин А.С.
ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров, Россия*

Ключевые слова: *висна-маеди, клонирование генов, ПЦР.*

Краткая аннотация: *В данной статье приведены данные по получению полноразмерной копии GAG-гена вируса висна-маеди в составе плазмидных векторов: pTZ57R и pGEM.*

Введение. Висна-маеди (ВМ) - болезнь, характеризующаяся поражением многих органов, но в первую очередь – легких в виде интерстициальных пневмоний; центральной нервной системы (ЦНС) (медленно прогрессирующий менингит и энцефаломиелит глиального типа); молочных желез (тугое вымя), суставов (артриты и периартриты).

Возбудитель ВМ относится семейству *Retroviridae*, роду *Lentivirus*. Данный вирус имеет средние размеры: диаметр вириона от 70 до 120 нм.

Находящаяся в вирионе и кодируемая вирусным геном РНК-зависимая ДНК-полимераза содержит две субъединицы с молекулярной массой 7×10^4 дальтон.

Гены, кодирующие три группы белков, входящих в состав вириона (негликозированные внутренние белки, гликопротеины оболочки и обратная транскриптаза), так же как и у других ретровирусов обозначены как GAG, env и pol, соответственно. Кроме генов GAG, pol и env, общих для всех ретровирусов, лентивирусы кодируют еще несколько других «дополнительных» генов: tat (transactivator of transcription) ген, rev (regulator of expression of virus proteins) ген, nef (negative regulatory factor) ген, vif (virion infectivity factor) ген [1, 2, 3] (рис 1).

Дивергенция между фрагментами генома составляет от 16 % в GAG-гене и pol-гене, до 22 %- в env-гене и 35 % - в LTR, [3], гомологичность белка интегразы составляет 70 % [2].

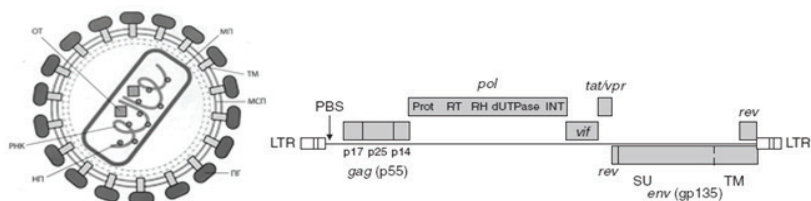


Рисунок 1 - Структура вириона и генома вируса висна-маеди [1, 3]

Примечание: НП–нуклеокапсидный протеин; МСП–мажорный структурный протеин; МП–матриксный протеин; ОТ–обратная транскриптаза; ТМ–трансмембранный гликопротеин; ПГ–поверхностный гликопротеин

Некоторые гены вируса ВМ кодируют структурные белки-предшественники, которые затем разрезаются на меньшие по размеру белки. Так, например, ген GAG у вируса ВМ кодирует первоначально большой белок-предшественник р53. Затем этот белок расщепляется в клетке на три меньших по размерам белка (р14, р17 и р25).

Для изучения таких тонких изменений, происходящих внутри клетки-хозяина, во время сборки вириона, мутаций и других процессов наиболее информативно, быстро и удобно применять молекулярно-биологические методы, такие как ПЦР, клонирование, реакции лигирования и рестрикции, нуклеотидное секвенирование.

Целью данной работы являлось получение рекомбинантных конструкций, кодирующие полноразмерную копию GAG-гена вируса ВМ.

Материалы и методы. Для амплификации GAG-гена в качестве матрицы использовали культуральный материал, содержащий вирус ВМ штамм М-88. Подбор праймеров, фланкирующие данный ген осуществляли с использованием программ BioEdit 6.0 и Oligo 7.0 на основе анализа нуклеотидной последовательности вируса ВМ штамм 1514 (GenBank Acc. № M60610). Для создания графических схем рекомбинантных молекул применяли программу Ugene. Для постановки ПЦР использовали полимеразу One TaqHot Start DNA (NEB, США). В работе использовали общепринятые молекулярно-биологические методы: ПЦР, рестрикция, лигирование, трансформация, выделение плазмидной ДНК, нуклеотидное секвенирование).

Результаты. В ходе работы подобраны праймеры, фланкирующие полноразмерную копию GAG-гена вируса ВМ. В структуру прайме-

ров были включены сайты рестрикции AfeI и KpnI для последующей встройки в экспрессирующий плазмидный вектор.

Специфический ПЦР-продукт размером 1341 п.о. амплифицировали на приборе PalmCycler (Corbett Research, Австралия) со следующим температурным режимом: денатурация 94 °С – 2 мин, 35 циклов: 94 °С – 30 с, 50 °С – 60 с, 68 °С – 2 мин и заключительной элонгацией при 68 °С – 5 мин.

После проведения электрофореза ПЦР-продукт очищали от агарозного геля с помощью Silica spin колонок (Qiagen, Германия). Реакцию лигирования проводили с помощью набора Fermentas в области мультиклонировочного сайта (Cloning Vector) плазмиды pTZ57R и pGEM с использованием 5 ед. акт. T4 ДНК-лигазы при 4-8 °С в течение 12-16 часов. Транфекцию осуществляли в клетки *E.coli* штамма DH5α (Promega, США) методом термошока. В результате скрининга нами были получены рекомбинантные плазмиды со встроенным GAG-геном.

Для подтверждения наличия встроенного GAG-гена ночную культуру, выращенную из полученных клонов, очищали с помощью набора Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, США). Выделенную плазмиду использовали в качестве матрицы для постановки ПЦР с праймерами на GAG-ген и на тело плазмиды. В результате проведения ПЦР с электрофоретической детекцией нами выявлены специфические ПЦР-продукты размером 1341 п.о., фланкирующий участок GAG-гена, и ПЦР-продукты размером 1500 п.о. (при использовании праймеров на тело плазмиды) (M13/PucFw и M13/Puc Rev) (рис. 2).

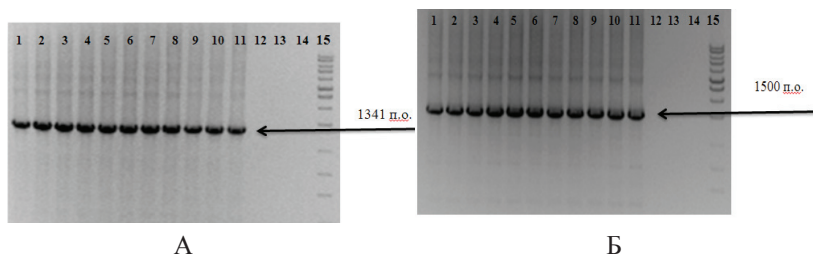


Рисунок 2 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных при амплификации рекомбинантных конструкций с использованием праймеров на А) GAG-ген вируса ВМ, Б) тело плазмиды: 1 – 6 клоны rGEM; 7- 12 -клоны pTZ 57 12-14 – К- ПЦР; 15 – маркер молекулярной массы 1.000 п.о. (1Kb Ladder DNA marker, Axugen, США)

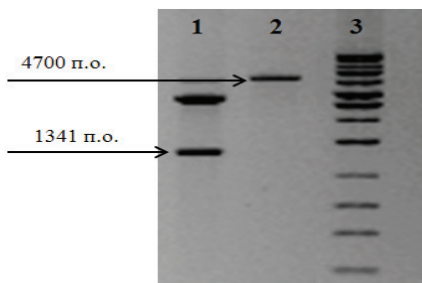


Рисунок 3 - Результаты гель-электрофореза фрагментов ДНК, полученных ее расщеплением рестриктазами AfeI и KpnI: 1 – клон pGEM со встроенным GAG-геном; 2 – плазмидный вектор pCMV; 3 – маркер молекулярной массы 1.000 п.о. (1Kb Ladder DNA marker, Axugen, США)

Для последующего анализа первичной последовательности амплифицируемых ПЦР-продуктов использовали реакцию рестрикции по заданным сайтам и метод нуклеотидного секвенирования. Определение нуклеотидного состава фрагментов проводили на приборе Applied Biosystem Genetic Analyser 3130 XL (США) с набором компонентов BigDye Terminator kit 3.1 (Applied Biosystem, США). При сравнении полученных нуклеотидных последовательностей с опубликованными последовательностями GAG-гена вируса ВМ, представленными в базе данных GenBank, уровень гомологии составил 100% с GAG-геном.

Выводы. В результате проведенной работы получены полноразмерные копии GAG-гена вируса ВМ. Наличие полученных конструкций подтверждено нуклеотидным секвенированием, рестрикционным анализом и ПЦР с геноспецифическими праймерами.

Библиографический список:

1. Шуляк, Б.Ф. Lentивирусы копытных. II. Лабораторные модели / Б.Ф. Шуляк // Российский ветеринарный журнал. - 2006. - № 2. - С.14-17.
2. Clements, J.E. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections / J.E. Clements, M.C. Zink // Clinical microbiology reviews. – 1996. – Vol. 9, N. 1. – P. 100-117.
3. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain / R. Reina, M.I. Mora, I. Glaria, I. Garcia, C. Solano, L. Lujan [et. al.] // Virus Res. – 2006. – Vol. 121, N. 2. – P. 189 – 198.

**CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMIDS
ENCODING A FULL-LENGTH COPY OF THE
GAG - GENE OF VISNA-MAEDI VIRUS**

Baryshnikova E., Kolbasova O., Malogolovkin A.

Keywords: *visna-maedi, gene cloning, PCR.*

Summary: *This article presents the data on obtaining full copies of viral gene GAG-visna-maedi and cloning of the gene in the pTZ57R and pGEM.*

УДК 619:616.98:578.824.11(470.314)

**ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО БЕШЕНСТВУ
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2013 ГОДУ**

*Бельчихина А.В., младший научный сотрудник,
Бардина Н.С., младший научный сотрудник,
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия*

Ключевые слова: *эпизоотическая ситуация, бешенство, Российская Федерация.*

В работе представлен анализ эпизоотической обстановки по бешенству на территории Российской Федерации в 2013 г. Данный анализ в первую очередь целесообразно учитывать ветеринарным службам субъектов Российской Федерации (РФ) при разработке профилактических мероприятий, направленных на снижение риска возникновения заболевания, без излишнего распыления средств и усилий.

Введение. В мире на современном этапе наблюдается рост рабической инфекции, такая же закономерность отмечается и в России. В течение последних двух десятилетий на территории Российской Федерации отмечалось ухудшение эпизоотологической обстановки по бешенству.