

УДК: 619:616.98:578.842.1

**СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ КОНСТРУКЦИЙ
ДЛЯ IN VITRO ЭКСПРЕССИИ УЧАСТКА ГЕНА B646L
ВИРУСА АЧС ПОД КОНТРОЛЕМ ВИРУСНЫХ ПРОМОТОРОВ**

Мима К.А., аспирант;

Бурмакина Г.С., старший научный сотрудник;

Титов И.А., научный сотрудник;

Малоголовкин А.С., заведующий лабораторией

*Лаборатория Молекулярной вирусологии, ГНУ ВНИИВВиМ
Россельхозакадемии, Владимирская область, г. Покров*

Ключевые слова: *Африканская чума свиней, эпитоп, клонирование, клональная библиотека, эукариотическая система экспрессии генов.*

В данной работе представлены результаты молекулярного клонирования эпитопа р72 вируса африканской чумы свиней в экспрессирующие вектора под контролем эукариотических промоторов. Полученные конструкции будут использоваться для экспрессии in vitro рекомбинантных белков в клеточной линии млекопитающих.

Введение. Африканскую чуму свиней (АЧС) можно без сомнения назвать одной из основных угроз и проблем свиноводства по всему миру. АЧС - контагиозная, как правило, остро протекающая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью [1]. Вирус АЧС в 2000 г. был выделен в отдельное семейство *Asfarviridae*, которое состоит из одного рода и одного вида [2]. В инфицированных вирусом клетках обнаружено 106 вирусспецифических белков, из которых 35 синтезируются до начала репликации вирусной ДНК (ранние белки) и 71 после (поздние белки). Основными иммунодоминантными белками являются р30, р54, р72.

Белок р30 - ранний белок, входящий в состав внутренней мембраны вирусной частицы, является ранним фосфопротеином. Белок р54 - поздний трансмембранный белок. Он обеспечивает прикрепление вируса АЧС к клетке хозяина [3,4].

Белок р72 является основным структурным компонентом капсида вириона и мажорным белком вируса АЧС, который продуцируется на

поздних стадиях инфекции. Вогса М. V. идентифицировал два конформационных эпитопа белка р72 с помощью трансляции *in vitro* набора частично перекрывающихся пептидов, представляющих различные регионы р72. Белок р72 является высококонсервативным антигеном среди штаммов вируса АЧС [5,6,7].

Одним из инструментов изучения иммунопатологии при АЧС является применение генно-инженерных технологий для создания аутентичных вирусных компонентов. В рамках данной работы была предпринята попытка синтезировать *in vitro* в эукариотической системе экспрессии эпитоп капсидного белка р72 вируса АЧС.

Ранее сотрудниками нашего института была получена прокариотический вектор несущий участок гена В646L (р72) [8]. Ранее подобная конструкция была получена Freije J.M.P. [9]. Однако прокариотическая система имеет ряд недостатков, а именно, белок зачастую экспрессируется в нерастворимой форме, меньших количествах и проходит альтернативный путь посттрансляционных модификаций, что в конечном итоге меняет его функции.

Целью проекта являлось конструирование рекомбинантной плазмиды экспрессирующей участок гена р72 вируса АЧС в клетках млекопитающих и анализ рекомбинантных молекул.

Материалы и методы. В работе использовали:

- Изолят вируса АЧС (II генотип), выделенный при вспышке болезни от домашней свиньи из ЛПХ Ивановской области;
- Плазмиды: рGEM, рCMV, рZyppy;
- Компетентные клетки E.Coli DH5 α ;
- Ферменты рестрикции (BamHI и HindIII);
- Набор компонентов для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Методы. Последовательность олигонуклеотидов, использованных в работе, для фланкирования эпитопа р72, подобрана Копытовым В.О., 2004.

Аmplификацию проводили на термоциклере «Терцик» в 25 мкл реакционной смеси [8]. Условия реакции были следующими: предварительная денатурация

95°C - 5 мин.

30 циклов

94°C - 30 сек.

55°C - 30 сек.

72°C - 40 сек.

72°C - 5 мин.

Рестриксию, лигирование, выделение плазмидной ДНК из *E.coli* проводили по стандартным методикам с применением наборов и ферментов NEB, QIAGEN Plasmid Mini соответственно. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля осуществляли при помощи QIAquick Gel. Трансформацию *E.coli* плазмидной ДНК проводили по известной методике [10].

Конструирование плазмиды **pGEM_p72ep**

С целью создания клональной библиотеки амплифицированные участки гена B646L вируса АЧС были клонированы в состав PGEM-T-easy вектора (Рис.1). Идентичность вставки подтверждена рестрикционным анализом, ПЦР и нуклеотидным секвенированием.

Все манипуляции с рекомбинантной плазмидной ДНК проводились в *E.coli* DH5 α с использованием стандартных методик [11].

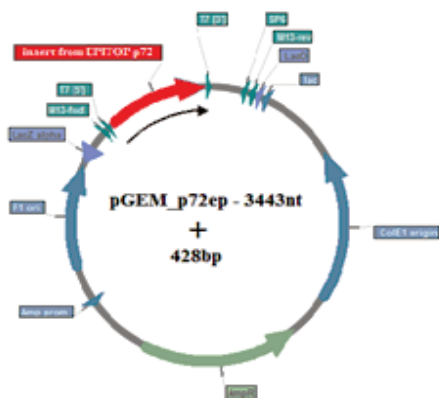


Рисунок 1 - Конструирование плазмиды pGEM_p72ep.

Полученные клоны, кодирующие конформационный эпитоп белка p72 депонированы в состав рабочей коллекции лаборатории Молекулярной вирусологии.

Конструирование плазмиды **pCMV_p72ep**, **pZipru_p72ep**

Для реклонирования в ацепторные вектора pCMV (Рис.2) и pZipru, фрагмента конформационного эпитопа p72 была проведена рестрикция плазмиды pGEM_p72ep по сайтам BamHI и HindIII. Очистку эпитопа p72 проводили с помощью электрофореза в 1% агарозном

геле с последующим выделением фрагментов ожидаемого размера из легкоплавкой агарозы.

Далее проводили лигирование и электропарацию в компетентные клетки *E. Coli* dH5 α . Методом ПЦР проводили скрининг полученных клонов и подтверждали правильность ориентации вставки рестрикционным анализом и секвенированием рекомбинантных плазмид.

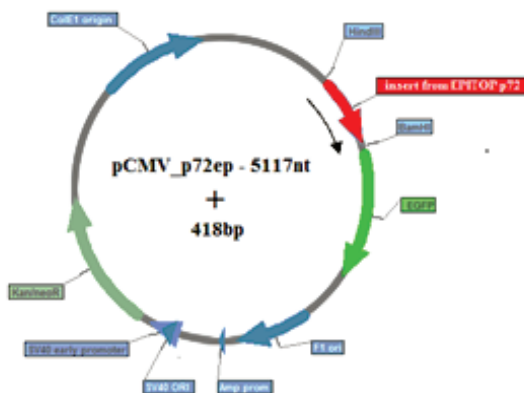


Рисунок 2 - Конструирование плазмиды pCMV_p72ep.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты исследований показали что полученные нами рекомбинантная плаزمида pCMV_p72ep и pZurru_p72, действительно содержат фрагмент конформационного эпитопа P72 вируса африканской чумы свиней, который имеет правильную ориентацию и открытую рамку считывания под контролем CMV (pCMV_p72ep) (рис.2) и основирусного промоторов (pZurru_p72ep).

Следующими этапом исследований будет определение уровня экспрессии участка гена B646L (p72) и сравнительная функциональная характеристика рекомбинантных молекул.

Заклучение. Проведенные молекулярно- генетические исследования позволили нам получить рекомбинантные плазмиды pCMV_p72ep и pZurru_p72,er для дальнейшей оценки уровня экспрессии вирусного антигена.

Библиографический список:

1. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин [и др.]; - М.: ВНИТИБП, 1998. - 928 с.
2. Family Asfarviridae / L.K. Dixon [et al.] // *Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Summers Academic Press, San Diego, 2000. - P. 159-165.
3. Andres, G. Characterization of two african swine fever virus 220-kDa proteins: a precursor of the major structural protein p150 and an oligomer of phosphoprotein p32 / G. Andres, C. Simon-Mateo, E. Vinuela // *Virology*. - 1993. - № 194. - P. 284-293.
4. Camacho, A. 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. Колонцов, А.А. Локализация мажорных полипептидов вируса АЧС и вирусассоциированных ферментов в структуре вирионов / А.А. Колонцов // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. - 1995. - № 3. - С. 34-38.
6. General morphology and capsid fine structure of african swine fever virus particles / J.L. Carrascosa [et al.] // *Virology*. - 1984. - № 132. P. 160-172.
7. African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope / M.V. Borca [et al.] // *Virology*. - 1994. - № 201 (2). - P. 413-418.
8. Копытов, В.О. Клонирование и экспрессия генов структурных белков р30 и р72 вируса африканской чумы свиней: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.06: защищена 23.12.04 / Копытов Валерий Олегович. - Покров, 2004.
9. High-level expression in *Escherichia coli* of the gene coding for the major structural protein (p72) of african swine fever virus / J.M.P. Freije [et al.] // *Gene*. - 1993. - № 123 (2). - P. 259-262.
10. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes / Kalman, S. [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1995. - V. 61. - P. 3063-3068.
11. Sambrook, J. / *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.- 1989.

DEVELOPMENT RECOMBINANT COUSTRUCTS FOR IN VITRO EXPRESSION OF ASF B646L GENE FRAGMENT UNDER CONTROL OF VIRAL PROMOTERS

Mima K.A., Burmakina G.S., Titov I.A., Malogolovkin A.S.

Key words: *African swine fever virus, epitope, cloning, clonal library, eukaryotic gene expression system.*

Here we present the results of molecular cloning of African swine fever virus p72 epitope into several expression vectors under control of eukaryotic promoters. Designed constructs will be used for in vitro expression of recombinant proteins in mammalian cell lines.

УДК 574.3

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА СУБСТРАТА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТВЕРДОФАЗНОЙ БИОКОНВЕРСИИ ОТХОДОВ ЖИВОТНОВОДСТВА

Мухитова М.Э., к.б.н., ассистент факультета ветеринарной медицины

Игнаткин Д.С., к.б.н., ст.преп.,

Баева Т.Г., аспирант

*Научный руководитель: д.б.н., профессор Е.М. Романова
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»*

Ключевые слова: вермиккультура, субстрат, твердофазная биоконверсия отходов животноводства, биогукус.

Работа посвящена оптимизации состава субстратов для получения биогукуса при твердофазной биоконверсии отходов животноводства с использованием вермиккультуры дождевых червей Средневолжского региона. Исследовали прирост биомассы и выживаемость вермиккультуры в разных композициях субстрата.