

УДК: 619:578.828.61:577.2

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ ПОЛНОРАЗМЕРНУЮ КОПИЮ VIF-ГЕНА ВИРУСА ВИСНА-МАЕДИ

Лапшенкова А.А. *, студентка 4 курса ветеринарного факультета
Научный руководитель – Барышникова Е.И. **, кандидат биологических наук

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

**ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Ключевые слова: *vif-ген, вирус висна-маеди, клонирование*

Аннотация. Работа посвящена получению рекомбинантной конструкции, кодирующую полную копию *vif*-гена вируса висна-маеди. Результаты клонирования подтверждены молекулярно-биологическими методами (нуклеотидным секвенированием и ПЦР с праймерами, фланрирующие полную копию *vif*-гена).

Введение. Возбудитель висна-маеди (ВМ) относится к семейству *Retroviridae*, роду *Lentivirus*. Генетический материал представлен двумя молекулами одноцепочечной РНК. Помимо основных генов (*gag*, *env* и *pol*) имеются дополнительные гены, такие как *vif*-, *rev*- и *tat*-.

Vif-ген (*virioninfectivityfactor*) кодирует белок (фактор инфекционности вируса), который необходим для некоторых стадий морфогенеза, связанных с инфекционностью. Он расположен между *pol*- и *env*-генами.

Для изучения 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 и ее модификации, клонирование, нуклеотидное секвенирование.

Целью данной работы являлось получение рекомбинантной конструкции, кодирующей полную копию *vif*-гена вируса ВМ.

Материалы и методы. В работе использовали общепринятые молекулярно-биологические методы: (ПЦР, рестрикция, лигирование, трансформация, выделение плазмидной ДНК, нуклеотидное секвенирование). Кроме того, в работе была использована плазмидарEGFP, в которую был переклонирован полноразмерный *vif*-ген.

Результаты. В ходе работы использовались праймеры, фланкирующие полную копию *vif*-гена вируса ВМ.

Проводили рестрикцию по рестриктазам: Sall и XhoI. Сайты рестрикции содержатся в праймерах и в мультиклонировочном сайте плазмиды. После этого проводили электрофорез в 1,5% агарозном геле. Полная копия гена была вырезана по обеим рестриктазам, что соответствует 702 п.о. для vif-гена (рис. 1).

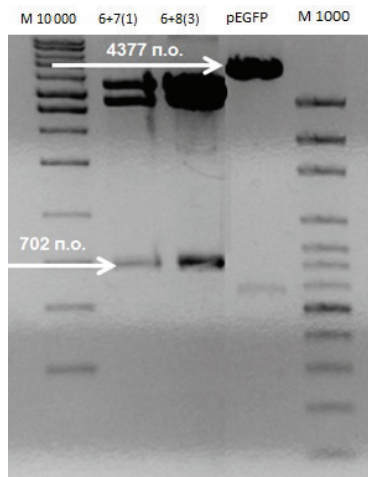


Рисунок 1 - Результаты рестрикции по рестриктазам Sall и XhoI

Примечание: М-маркер молекулярной массой 100 п.о.; pEGFP – плазмидный вектор; 6+7(1), 6+8(3) – клоны рекомбинантной конструкции, кодирующей полноразмерную копию vif-гена вируса ВМ

После проведения электрофореза ПЦР-продукт очищали от агарозного геля с помощью набора QiAquickGelExtraction согласно инструкции производителя. Реакцию лигирования проводили с помощью T4 DNALigasa. Расчет осуществляли по формуле в соотношении 1:3 при 22°C 1ч.

Трансфекцию осуществляли в клетки E.Coli штамма XLI методом теплового шока. В результате нами были получены клоны рекомбинантных плазмид. Для подтверждения наличия встроенного vif-гена ночную культуру, очищали с помощью набора PureLinkPlasmidMiniprepKit (Invitrogen, США). Выделенную плазмиду использовали в качестве матрицы для постановки ПЦР. В результате проведения ПЦР с электрофоретической детекцией нами выявлены специфические ПЦР продукты размером 702 п.о., фланкирующий полную копию vif-гена, при использовании праймеров.

При последующем анализе конструкции на наличие вставки использовали метод нуклеотидного секвенирования на приборе Applied Biosystem Genetic

Analyser 3130 XL (США). При сравнении полученных последовательностей с опубликованными последовательностями *vif*-гена вируса ВМ, представленными в базе данных GenBank, уровень гомологии составил 99 % с *vif*-геном.

Выводы. В результате проведенной работы получена рекомбинантная конструкция, кодирующая полноразмерную копию *vif*-гена вируса ВМ. Наличие полученной конструкции подтверждено нуклеотидным секвенированием ПЦР с электрофоретической детекцией.

«Работа проведена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-31862 мол_а «Функциональные особенности основных детерминант лентивирусов животных» (2014 – 2015 гг).

Библиографический список:

1. Барышникова Е.И. Дифференциация возбудителей висна-маеди и артрита-энцефалита коз на основе анализа генома: дис. канд. биолог. наук 03.02.02 / Барышникова Елена Ивановна. – Покров, 2011. – 122с.
2. Барышникова Е.И. Конструирование рекомбинантной плазмиды, кодирующей полноразмерную копию *gag*-гена вируса висна-маеди / Е.И. Барышникова, О.Л. Колбасова, А.С. Малоголовкин // Сборник IVМеждународная научно-практическая конференция Молодежь и наука XXI века: в 2-х т. – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. - Т 2. - С. 24-27.
3. Инфекционная патология животных: в 2-х т. / под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 190 с.
4. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – С. 97-120.

**DEVELOPMENT RECOMBINANT CONSTRUCTS
ENCODING THE FULL-SIZE COPY OF THE VIF-GENE
OF VISNA-MAEDIVIRUS**

Lapshenkova A.A., Baryshnikova E.I

Keywords: *vif-gene, visnamaedi virus, gene cloning*

Summary. *This article presents the development recombinant construction encoding the full-size copy of the vif-gene of visna-maedi virus. There sultsofthiscloningareconfirmusing molecular biological methods (sequencing and polymerase cain reaction).*