

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК E. COLI С ФРАГМЕНТАМИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ БЕЛКИ ВИРУСА АЧС

Бадамшин А.Д.¹ – аспирант, **Закирова Е.Ю.**^{1,2} – к.б.н., ст. н.с.,
Галеева А.Г.^{2,3} – к.вет.н., ст. н.с., **Ефимова М.А.**^{1,3,4} – д.б.н., преподаватель кафедры эпизоотологии и паразитологии, **Мингалеев Д.Н.**¹ – проректор по учебной и воспитательной работе, зав. кафедрой эпизоотологии и паразитологии, **Ризванов А.А.**^{1,2} – д.б.н., профессор, директор научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины, **Равилов Р.Х.**¹ – д.вет.н., профессор, ректор

¹ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

²ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»

³ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

⁴ЦНИЛ КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней, протективные антигены, клонирование генов

Keywords: African swine fever virus, protective antigens, gene cloning

Во всем мире, в том числе и в Республике Татарстан, свиноводство является стратегически значимой отраслью обеспечения глобальной продовольственной безопасности. Тем не менее, эта отрасль экономики особенно уязвима из-за трансграничных инфекционных заболеваний, среди которых в настоящее время наиболее серьезную угрозу представляет африканская чума свиней (АЧС) – летальное геморрагическое заболевание домашних свиней и кабанов, вызываемое сложным оболочечным дезоксивирусом семейства *Asfarviridae* [2, 8, 10]. Профилактика и борьба с АЧС осложнены отсутствием доступных вакцин и эффективных терапевтических мер: вирус АЧС способен вмешиваться в различные клеточные сигнальные пути, приводя к иммуномодуляции, что делает разработку эффективной вакцины крайне сложной задачей [8, 13]. Предлагаемые ранее инактивированные вакцины не обеспечивали формирования протективного иммунитета, и роль антител в защите от летального заражения остается неясной. Использование живых

аттенуированных вакцин, хотя и обеспечивает приемлемые уровни защиты, представляет трудности из-за наличия побочных эффектов у вакцинированных животных. Сообщалось, что некоторые белки вируса африканской чумы свиней индуцируют нейтрализующие антитела у иммунизированных свиней, а стратегии вакцинации основаны на ДНК-вакцинах и рекомбинантных белках, однако этот подход ограничен выбором систем доставки и подбором антигенов [4].

В связи с этим значительный интерес представляет разработка кандидатных вакцин на основе вирусных векторов. Такие вакцины, основанные на доставке одного или нескольких антигенов, закодированных в контексте неродственного модифицированного вируса, представляют собой широкоприменимую платформу, обладающую множеством преимуществ по сравнению с традиционными технологиями создания вакцин [15]. Основные преимущества вирусных векторов заключаются в высокой эффективности генной трансдукции, высокоспецифичной доставке генов к клеткам-мишеням,

индукции устойчивых иммунных ответов и повышении клеточного иммунитета.

Сборка вирусных векторов является сложным многокомпонентным процессом, требующим сочетания традиционных подходов и новых технологий, необходимых для разработки надежных и масштабируемых производственных процессов. При создании генетических конструкций одной из первых осуществляемых процедур является наработка фрагментов целевой ДНК или готовых плазмид в препаративных количествах. На количество копий плазмиды влияют репликативные особенности клетки-хозяина, а также условия культивирования, в частности, скорость роста, состав питательных сред и температурные режимы [1, 7].

Основные методы получения плазмидной ДНК включают этапы культивирования бактерий, их сбора и лизиса, выделения и идентификации плазмидной ДНК [5]. От степени очистки ДНК зависят эффективность её рестрикции, качество процедур секвенирования и подготовки фрагментов для проведения последующих этапов клонирования и трансфекции соматических клеток [1].

Целью данного исследования явилась оптимизация условий получения плазмидной ДНК *E. coli* с фрагментами генов, кодирующих иммунодоминантные белки вируса АЧС.

Материал и методы исследований. 1. Клонирование генов. Аминокислотные последовательности белков р30, р54, рр60 (рр62) и р72 вируса АЧС на основе эпидемиологически значимого изолята Georgia 2007/1 использовали для конструирования синтетических генов, кодон которых оптимизирован для экспрессии белка в организме хозяина. Оптимизация кодонов, синтез гена, клонирование в рAAV-MCS – плазмиду, содержащую трансген и его регуляторные элементы, фланкированные ITR, а также проверка последовательностей генов были переданы на аутсорсинг (ЗАО «Евроген», Россия). Созданные конструкции были подтверждены секвенированием ДНК.

2. Трансформация компетентных клеток. Компетентные клетки *E. coli* (штамм DH5 α) трансформировали методом теплового шока в присутствии ионов Ca²⁺ [12]. К 100 мкл стока компетентных клеток с концентрацией не менее 1 \times 10⁶ КОЕ/мл добавляли 50 нг соответствующей плазмиды, инкубировали во льду в течение 20-30 мин, после чего подвергали тепловому шоку при 42 $^{\circ}$ C в течение 2 мин. После повторной инкубации во льду в течение 2 мин к клеткам добавляли 1 мл лизогенной среды (LB) и инкубировали в течение 1 ч при 37 $^{\circ}$ C. Суспензию трансформированных клеток высевали по 100 мкл на L-агар, содержащий ампициллин в концентрации 200 мкг/мл. Выросшие клоны культивировали на аналогичной LB-Am⁺ среде.

4. Выделение плазмидной ДНК проводили при помощи набора «Plasmid MidiPrep 2.0» (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию выделенной ДНК определяли с использованием спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) при OD₂₆₀. Чистоту выделенного препарата оценивали по соотношению показателей OD₂₆₀ и OD₂₈₀; оптимальное соотношение, близкое к значению 1,8, указывало на отсутствие посторонних примесей в препарате.

5. Постановка ПЦР. Поиск нуклеотидных последовательностей для разработки специфичных праймеров, фланкирующих гены CP204L, E183L, CP530R, B646L штамма Georgia 2007/1 вируса АЧС осуществлялся по базам Национального Центра Биоинформатики (NCBI). В качестве положительного контрольного образца (ПКО) использовали рекомбинантные плазмиды на основе векторной плазмиды рAAV-MCS (ЗАО «Евроген», Россия) со встроенной целевой нуклеотидной последовательностью. Состав реакционной смеси для ПЦР-амплификации был следующим (из расчета на одну пробу): 100 пМ растворы прямых и обратных праймеров – по 0,5 мкл; реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR Green I (ЗАО «Евроген», Россия) – 5 мкл;

деионизированная вода – 14 мкл; раствор выделенной ДНК (матрица) – 5 мкл. Общий объём реакционной смеси составлял 25 мкл. Постановку ПЦР осуществляли на амплификаторе С1000 с оптическим блоком CFX96 (Bio-Rad, США) согласно следующей программе амплификации: (I) денатурация ДНК при 95 °С в течение 3 минут; (II) 40 циклов, состоящих из: 15 секунд при 95 °С, 30 секунд при 57 °С, с детекцией флуоресценции по каналу FAM на каждом из циклов при 57 °С.

Учёт результатов ПЦР проводили методом электрофоретического разделения в 1 % агарозном геле в буфере TBE при напряжении 0,6 В/см² в течение 30 минут с последующим детектированием в УФ-свете после окраски бромистым этидием. В качестве стандарта при определении длин, полученных ампликонов использовали маркер GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США) с линейкой фрагментов от 250 до 10000 п.о.

Результат исследований. Скрининг был направлен на выявление генов вируса АЧС, ответственных за индукцию специфического гуморального и клеточного иммунитета и осуществлялся с использованием биоинформатических серверов. В качестве основных

иммуномодулирующих белков были выбраны р72 (ген В646L) – высококонсервативный мажорный антиген; полипротеин рр62 (ген СР530R), являющийся предшественником полноценных р35 и р15, определяющих процесс сборки вирусного капсида; р54 (ген Е183L) – трансмембранный гликопротеин, участвующий в сборке прекурсоров вирусного капсида и обеспечивающий адсорбцию вируса к клеточной мембране; р30 (ген СР204L) – фосфопротеин, синтезирующийся на ранних стадиях инфекционного цикла и ответственный за интернализацию вируса в клетку [3, 6, 9]. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вышеуказанных генов различных штаммов и изолятов вируса АЧС из Африки, Европы, Латинской Америки и Российской Федерации продемонстрировал полное соответствие генетических маркеров на основе выбранных локусов. Также были выявлены наиболее перспективные для разработки кандидатной вакцины участки аминокислотных последовательностей белков, вызывающих иммунную реакцию с наибольшей частотой и, вероятно, являющихся наиболее иммуногенными фрагментами (Таблица 1).

Таблица 1 – Наиболее иммуногенные фрагменты иммунодоминантных белков вируса АЧС

Белок (ген)	Мол. масса, кДа [11, 14]	Участки аминокислотных последовательностей, а.о.
р72 (<i>B646L</i>)	73,2-74	≈241-300
рр62 (<i>CP530R</i>)	60,5	≈15-175
р54 (<i>E183L</i>)	19,9 (24-28)	≈113-130; ≈54-133
р30 (<i>CP204L</i>)	23,6 (30-32)	≈10-30; ≈60-160

Учитывая высокую гомологичность аминокислотных последовательностей рассматриваемых белков, можно предположить, что вакцина, разработанная на основании комплекса антигенов р72, рр60, р54 и р30, может быть применима не только на территории Российской Федерации, но и на территориях стран Восточной Европы.

1. Дизайн праймеров. На основании анализа данных литературы и проведённого анализа расположения генов

СР204L, Е183L, СР530R, В646L на карте генома изолята Georgia 2007/1 вируса АЧС определили оптимальные участки для дизайна праймеров. С помощью программного обеспечения Vector NTI 9.0 (Thermo Fisher Scientific, США) выполнили дизайн 4 пар праймеров, фланкирующих фрагменты перечисленных генов, после чего была проведена оптимизация условий постановки ПЦР. В результате экспериментов нами были определены оптимальные режимы амплификации и

концентрации реакционных смесей. Подобранные пары праймеров были проверены на специфичность обнаружения плазмидной ДНК и показали строгую специфичность к выявляемым локусам ввиду отсутствия перекрёстных реакций с отрицательными и гетерологичными контрольными образцами.

2. Нарботка плазмидных ДНК в препаративных количествах. В ходе проведённых экспериментов нами были определены оптимальные условия трансформации компетентных клеток *E. coli* и масштабного культивирования трансформантов с целью выделения плазмидных ДНК в препаративных количествах. Было установлено, что перечисленная последовательность действий позволяет получить очищенный препарат плазмидной ДНК с фрагментами генов, кодирующих иммунодоминантные белки вируса АЧС, с концентрацией не менее 300 мкг/мл.

Заключение. Осуществлено клонирование генов CP204L, E183L, CP530R, B646L штамма Georgia 2007/1 вируса АЧС и получены клоны *E. Coli* для наработки плазмид с соответствующими вставками в препаративных количествах. Определены условия культивирования и выделения, обеспечивающие достаточный выход очищенных препаратов плазмидных ДНК. Описанные подходы в дальнейшем будут использованы для сборки векторов на основе аденоассоциированного вируса (ААВ), способных обеспечить высокую эффективность трансдукции эукариотических клеток, и, следовательно, для формирования безопасной и эффективной стратегии создания кандидатной вакцины против АЧС.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Великов, В. А. Молекулярная биология: практическое руководство / В. А. Великов. – Саратов, 2013. – 84 с.

2. Иматдинов, А. Р. Экспрессия рекомбинантных генов, кодирующих фрагменты протективно значимых белков вируса африканской чумы свиней, в эукариотических клетках / А. Р. Иматдинов, А. Д. Серета, И. Р. Иматдинов и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2016. –

Т. 51, № 6. – С. 837-844. – <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.6.837rus>.

3. Казакова, А. С. Конструирование продуцентов рекомбинантных белков Р72, Р30 и Р54 вируса африканской чумы свиней [Текст]: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.02.02) / Казакова Анна Сергеевна // ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. – Покров, 2013. – 24 с.

4. Колбасов, Д. В. Африканская чума свиней: создание вакцины актуально / Д. В. Колбасов // Животноводство России. – 2020. – № 7. – С. 29-33. – <https://doi.org/10.25701/ZZR.2020.48.46.008>.

5. Колоскова, Е. М. Выделение и очистка плазмидной ДНК из трансформированных штаммов *E. Coli* DH5A и TG1 / Е. М. Колоскова, В. А. Езерский // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2019. – № 4. – С. 105-112. – <https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2019.4.105-112>.

6. Мазлум, А. Клонирование генов, кодирующих трансмембранные белки и белки, ответственные за вирулентность вируса африканской чумы свиней / А. Мазлум, Н. Г. Зиняков, А. С. Иголкин, Н. Н. Власова // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 2 (25). – С. 3-7. – <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7>.

7. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук // Молекулярное клонирование. – Москва: Мир, 1984. – 479 с.

8. Нефедьева, М. В. Анализ иммуномодулирующих белков вируса африканской чумы свиней / М. В. Нефедьева, И. А. Титов, К. А. Мима, А. С. Малоголовкин // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2019. – № 1. – С. 42-48. – <https://doi.org/10.17116/molgen20193701142>.

9. Шарыпова, Д. В. Усовершенствование методов получения антигена вируса африканской чумы свиней для серологических исследований: дисс. ... канд. вет. наук: 06.02.02. / Д. В. Шарыпова // ФГБУ «Федеральный центр охраны

здоровья животных», Владимир, 2019. – 123 с.

10. Щербаков, А. В. Клонирование и экспрессия в *E. Coli* генов K205R и B602L вируса африканской чумы свиней / А. В. Щербаков, А. С. Яковлева, А. М. Тимина, М. Р. Якупов // Ветеринария сегодня. – 2015. – № 2. – С. 27-31.

11. Andres, G. African Swine Fever Virus Protease, a New Viral Member of the SUMO-1-specific Protease Family / G. Andres, A. Alejo, C. Simon-Mateo, M. L. Salas // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – № 276 (1). – P. 780-787. – <https://doi.org/10.1074/jbc.M006844200>.

12. Cohen, S. N. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia Coli* by R-Factor DNA / S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, L. Hsu // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1972.

– № 69 (8). – P. 2110-2114. – <https://doi.org/10.1073/pnas.69.8.2110>.

13. Chen, W. A. Seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs / W. Chen, D. Zhao, X. He [et al.] // Sci China Life Sci. – 2020. – № 63(5). – P. 623-634. – <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1657-9>.

14. Jia, N. Roles of African Swine Fever Virus Structural Proteins in Viral Infection / N. Jia, Yu. Ou, Z. Pejsak [et al.] // J. Vet. Res. – 2017. – № 61(2). – P. 135–143. – <https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0017>

15. Lokhandwala, S. Adenovirus-vectored African swine fever virus antigen cocktails are immunogenic but not protective against intranasal challenge with Georgia 2007/1 isolate / S. Lokhandwala, V. Petrovan, L. Popescu [et al.] // Vet Microbiol. – 2019. – V. 235. – P. 10-20. – <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.06.006>

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК E. COLI С ФРАГМЕНТАМИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ БЕЛКИ ВИРУСА АЧС

Бадамшин А.Д., Закирова Е.Ю., Галеева А.Г., Ефимова М.А., Мингалеев Д.Н., Ризванов А.А., Равилов Р.Х.

Резюме

Африканская чума свиней (АЧС) ввиду своей контагиозности и летальности вызывает серьёзные опасения в отношении благополучия мировой свиноводческой отрасли. Успешному предотвращению и ликвидации АЧС препятствует множество факторов, включая глобализированный характер животноводства и отсутствие средств специфической профилактики. Разработка эффективных мер противодействия АЧС имеет важное значение в борьбе с нынешними эпидемиями и связанными с ними торговыми ограничениями. Особый интерес представляет поиск антигенов вируса АЧС, способных обеспечить формирование протективного иммунитета. В настоящем исследовании проведён скрининг и отбор генов, кодирующих высококонсервативные иммунодоминантные белки вируса АЧС, проведён их филогенетический анализ, оптимизированы условия клонирования генов и культивирования трансформированных E. Coli с целью наработки плазмидных ДНК в препаративных количествах. Предлагаемые нами подходы позволяют получить очищенные препараты плазмидных ДНК в достаточных количествах для дальнейшей сборки векторов на основе аденоассоциированного вируса (ААВ), что, в свою очередь, ляжет в основу эффективной и безопасной стратегии создания кандидатной вакцины против АЧС. Учитывая свойства рассматриваемых белков, можно предположить, что вакцина, впоследствии разработанная на основе комплекса антигенов р72, рр60, р54, р30, может быть применима не только на территории Российской Федерации, но и на территориях соседних стран Восточной Европы.

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR OBTAINING PLASMID DNA OF E. COLI WITH FRAGMENTS OF GENES ENCODING IMMUNODOMINANT PROTEINS OF THE ASF VIRUS

Badamshin A.D., Zakirova E.Yu., Galeeva A.G., Efimova M.A., Mingaleev D.N., Rizvanov A.A., Ravilov R.Kh.

Summary

African swine fever (ASF), due to its contagiousness and mortality, raises serious concerns about the well-being of the global pig industry. Successful prevention and eradication of ASF is hampered by many factors, including the globalized nature of livestock production and the lack of specific prophylaxis. Development of effective responses to ASF is essential in combating current epidemics and associated trade restrictions. Particular scientific interest is presented by the search for immunodominant antigens of the ASF virus capable of ensuring the formation of protective immunity. In this study, the screening and selection of genes encoding highly conserved immunodominant proteins of the ASF virus was carried out, their phylogenetic analysis was carried out, the conditions for cloning genes and cultivation of transformed E. Coli were optimized in order to produce plasmid DNA in preparative quantities. The approaches we propose make it possible to obtain purified plasmid DNA preparations in sufficient quantities for further assembly of vectors based on adeno-associated virus (AAV), which, in turn, will form the basis of an effective and safe strategy for creating a candidate vaccine against ASF. Taking into account the properties of the proteins under consideration, it can be assumed that a future vaccine developed on the basis of the p72, pp60, p54, p30 antigen complex may be applicable not only in Russian Federation, but also in the territories of neighboring countries of Eastern Europe.