

ДИЗАЙН РЕКОМБИНАНТНЫХ МОЛЕКУЛ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Щербина А.А., 5 курс факультета ветеринарной медицины.

Научные руководители: к.б.н., с.н.с. Малоголовкин А.С.

к.б.н., доцент Ковалева Е.Н.

ГНУ ВНИИИВВиМ Россельхозакадемии

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

Ключевые слова: АЧС, рекомбинантные молекулы, молекулярная биология, трансфекция, лигирование, плазмиды.

Работа посвящена созданию работоспособных рекомбинантных молекул вируса АЧС для их дальнейшего использования при создании вакцин и тест систем. При использовании методов молекулярной биологии была создана рекомбинантная молекула белка р 60 вируса АЧС.

Особенностью биотехнологии, является то, что в ее основе лежит большое количество новых современных дисциплин, таких как: биология, молекулярная биология, биохимия, генетика, клеточная инженерия, генетическая инженерия и многие другие [1]. Длительное время конструирование вакцин диагностикумов шло по пути получения хроматографически чистых протеактивных антигенов [2].

Значительный прогресс, достигнут в биотехнологии за счет внедрения достижений генетической инженерии, с помощью которой удалось добиться ранее невозможного, а именно: заставить биообъекты синтезировать новые, ранее не присущие им биологически активные вещества, в том числе и рекомбинантные молекулы[3,4,5].

Рекомбинантные технологии ДНК позволяют получать белки дикого типа и модифицированные белки человека и млекопитающих в больших количествах [6]. Такие белки, полученные с помощью генной инженерии, так же называемой сплайсингом генов или методом рекомбинантных ДНК. Вирус Африканской чумы свиней (АЧС) является - бичом настоящего времени. Суммарно в России было зафиксировано более 500 вспышек заболевания экономические потери превысили 30 млрд рублей, уничтожено порядка миллиона животных[3]. Создание дизайна рекомбинантных генов для экспрессии генов вируса АЧС является перспективным направлением, потому что средства специфической профилактики при АЧС до сих пор не разработаны. Во многом это объясняется биологическими свойствами вируса.

Целью данной работы является создание генно-инженерной конструкции в бактериальном векторе и оценка функциональности данной конструкции в эукариотических клетках.

В соответствии с поставленной целью необходимо решить следующие задачи:

1. Осуществить полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для получения ПЦР-продуктов, содержащих нуклеотидные последовательности генов p72, p17 и p60 вируса АЧС;
2. Создать генно-инженерные конструкции, экспрессирующие белки p72, p17 и p60;
3. Оптимизировать условия наращивания, выделения и очистки рекомбинантных плазмид p17, p60 и p72;
4. Оценить пригодность рекомбинантных конструкций в условиях селекции, используя трансфекцию в эукариотических клетках.

Пользуясь таким методом молекулярной биологии, как ПЦР нужно было добиться значительного увеличения малых концентраций нуклеотидных последовательностей генов вируса АЧС в биологическом материале. Увеличение концентрации нуклеотидных последовательностей наращивали процессом амплификации. Для этого процесса следует подобрать оптимальную программу на амплификаторе. В исследовании была использована готовая смесь, так называемая Mix смесь. После брали из холодильника праймеры *Forward u Reverse*, в котором они хранятся при -20. Перемешивали и осаждали на Vortex, а затем раскапывали по 1,5 µl. В самом конце раскапывали по 2 µl исходной ДНК.

Провели ПЦР для белков p17, p60 и p72 вируса АЧС. По окончании амплификации ставили электрофорез в 1,5% агарозном геле для определения размеров продуктов реакции. На основании размеров и расстоянии пробегов маркерных ДНК (рестрицированная *HindIII* и *EcoRI* ДНК фага лямбда) вычисляли размеры исследуемых фрагментов ДНК.

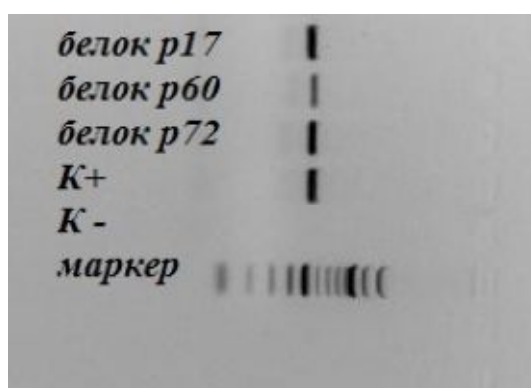


Рис. 1. Электрофорез в 1,5% агарозном геле после ПЦР

Следующим этапом предстояло провести лигирование. В молекулярной биологии, лигирование относится к соединению двух фрагментов ДНК путем образования фосфодиэфирной связи. Ферменты, известные как лигазы катализируют реакцию лигирования. (Таб. 1) Для этого смешали все компоненты реакции и поставили на ночь на +4 °C.

Таблица 1 – Компоненты реакционной смеси лигирования

<p>p 72: буфер = 1 μl; вставка=2,54 μl; вектор= 1 μl; лигаза= 1 μl; H₂O= 4,46 μl;</p>	<p>p 60: буфер= 1 μl; вставка=1,67 μl; вектор= 1,48 μl; лигаза= 1 μl; H₂O= 4,85 μl;</p>	<p>p 17: буфер= 1 μl; вставка=1,68 μl; вектор= 0,8 μl; лигаза= 1 μl; H₂O= 5,52 μl;</p>
---	---	--

Затем требовалось чтобы комплекс вектор+ вставка вошел в бактериальную клетку *E. coli*. Под действием электрического тока, поры в клетках открываются, что позволяет войти комплексу, данная процедура называется электропорацией. После электропорации клетки посеяли шпателем на агар с Канамицином. После суток инкубирования выросшие колонии пересадили в жидкую среду SOC. В пробирках (это пробы под номерами: 1 p17, 2 p17, 3 p17, 4 p17, 1 p60, 2 p60, 3 p60, 4 p60, 2 p72), в которых среда через сутки помутнела, провели выделение плазмид коммерческим набором The Pure Link (USA), согласно инструкции.

После для плазмид поставили электрофорез в 1,5% геле для определения размеров продуктов реакции и обнаружению комплекса в реакции.



Рис. 2. Электрофорез плазмид в 1,5% геле

Проведенный электрофорез в агарозном геле выявил, что лишь в одной пробе- 3 p60 находится комплекс вектор + вставка. С этой пробой проводили дальнейшие исследования.

Последним этапом нужно было провести трансфекцию — процесс введения нуклеиновой кислоты в клетки человека и животных невирусным методом и подтвердить наше исследованием, тем, что эукариотическая клетка способна синтезировать созданную искусственно генно-инженерную конструкцию белка p60 вируса АЧС. Трансфекцию проводили при помощи реагента Липофектамин-плюс (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Клетки НЕК-293 культивировали в 6-луночной планшете, в среде DMEM с 10 % FBS. Для трансфекции использовали 2,5 мкг плазмидной ДНК, содержащей полноразмерную копию гена p60, и 4 μ l Липофектамина. Трансфекцию проводили в среде OptiMem в течении 12 часов. Клетки

культивировали со средой DMEM с 10 % FBS 24 часа в CO₂ инкубаторе (SANYO CO₂ Incubator). Так как наша вставка имела последовательность гена, кодирующего зеленый флюорисцентный белок GFP, то после трансфекции под микроскопом мы наблюдали зеленые клетки. Это говорит о том, что трансфекция в эукариотических клетках прошла успешно и клетки теперь экспрессируют белок.

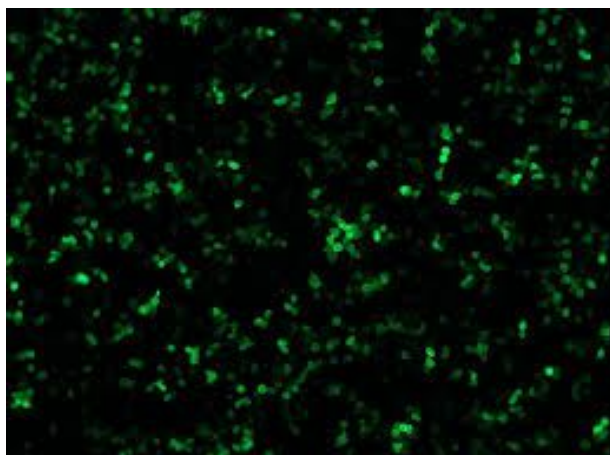


Рис. 3. Эукариотические клетки с комплексом вставка + вектор под флюорисцентным белком GFP.

В ходе данного исследования была создана успешно функционирующая генно-инженерная конструкция, которая подтверди свою работоспособность на примере трансфекции. Данная конструкция может быть использована в дальнейшем при создании тест- систем, вакцин. Использование рекомбинантных молекул является перспективным направлением, огромным преимуществом которого является экологическая и биологическая безопасность, быстрота проводимых исследований и приближается к 100% точности анализа.

Библиографический список

1. Барышников, А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин. – М.: Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.
2. Копытов, В.О. Клонирование и экспрессия генов структурных белков р30 и р72 вируса африканской чумы свиней: дис. ... к.б.н. / Копытов Валерий Олегович. – Покров, 2004. – 127 с.
3. 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.
4. Балышев, В.М. География АЧС и типовая гетерогенность возбудителя болезни / В.М. Балышев, В. А. Книзе, С.Ж. Цыбанов [и др.]. – М.: МВА им. К.И. Скрябина, 1999. – С. 92-94.
5. Гловер, Д. Клонирование ДНК. Методы / Д. Гловер. – М.: Мир, 1988. – 538 с.
6. Afonso, C.L. Characterization of р30, a highly antigenic membrane and secreted protein of african swine fever virus / C.L. Afonso, C. Alcaraz, A. Brun. – Virology. –1992. – № 189 (1). – P. 368-373.

DESIGN THE RECOMBINANT MOLECULES OF

AFRICAN SWINE FEVER VIRUS

Shcherbina A.A., Malogolovkin A.S., Kovaleva E.N.

Keywords: ASF, recombinant molecules, molecular biology, transfection, ligation, plasmid.

Work is devoted to the creation of workable ASFV recombinant molecules for their further use in the development of vaccines and test systems. When using the techniques of molecular biology in this research was created recombinant protein molecule p 60 of ASF virus.