



ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА p30 НА РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ *IN VITRO*

Али Мазлум¹, И. Ю. Жуков², А. С. Першин³, А. С. Иголкин⁴, Н. Н. Власова⁵

¹ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: ali.mazloum6@gmail.com

² Ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: Zhukov@arriah.ru

³ Научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pershin_as@arriah.ru

⁴ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

⁵ Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Средства специфической профилактики при африканской чуме свиней пока не разработаны. Для определения составных компонентов, которые могут быть использованы при создании надежной защиты от АЧС, необходимо изучить функцию определенного белка вируса, его роль в морфогенезе и индукции иммунного ответа. Установлено, что белки p54 и p30 участвуют в вирусном проникновении и интернализации и способны индуцировать образование протективных антител у иммунизированных свиней. Введение этих белков в инфицированную вирусом АЧС культуру клеток в разной степени воздействует на репродукцию вируса. Представлены результаты изучения влияния очищенного рекомбинантного белка p30, полученного из клона *E. coli* с плазмидой pET32b(+)/p30, на репродукцию вируса африканской чумы свиней *in vitro*. Наибольшее снижение, вплоть до полной ингибиции, репродукции вируса наблюдали при внесении 300 нг p30 в первичные культуры клеток селезенки свиньи и костного мозга свиньи, инфицированные изолятом Krasnodar 07/17 вируса африканской чумы свиней в дозе 100 ГАД_Е на матрас (~ 0,01 ГАД_Е на клетку). Отмечено, что при внесении в образец смеси p30 и p54 снижение репродукции было существеннее, чем с использованием только p30.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней, клонирование, рекомбинантный белок p30, репродукция вируса *in vitro*.

EFFECT OF p30 RECOMBINANT PROTEIN ON AFRICAN SWINE FEVER VIRUS *IN VITRO* REPRODUCTION

Ali Mazloum¹, I. Yu. Zhukov², A. S. Pershin³, A. S. Igolkin⁴, N. N. Vlasova⁵

¹ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: ali.mazloum6@gmail.com

² Leading Biologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: Zhukov@arriah.ru

³ Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: pershin_as@arriah.ru

⁴ Head of the Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

⁵ Chief Researcher, Doctor of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

SUMMARY

African swine fever specific prevention means have not been developed yet. However, it is necessary to study the function of definite viral proteins, their role in immune response morphogenesis and induction to determine the components to be included into ASF protection drugs. It was established that p54 and p30 proteins participate in virus penetration and internalization and are able to induce protective antibodies in immunized pigs. The inoculation of these proteins into ASFV-infected cell culture has an impact on virus reproduction to different extents. The results of the study of purified recombinant protein p30 effect, derived from *E. coli* clone, containing pET32b(+)/p30 plasmid, on ASFV *in vitro* reproduction are presented. The greatest decrease, including complete inhibition of virus reproduction, was observed when 300 ng of p30 were inoculated into porcine spleen and marrow primary cell cultures, infected with the ASFV Krasnodar 07/17 isolate at the dose of 100 HAU per plate (~ 0.01 HAU per cell). It was noted that if the mixture of p30 and p54 was inoculated into a sample, the virus reproduction was greater compared to the use of only p30.

Key words: African swine fever, cloning, p30 recombinant protein, *in vitro* virus reproduction.

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних лет большое количество исследовательских групп усиленно работают над созданием средств специфической профилактики африканской чумы свиней (АЧС) как на основе живого аттенуированного или инактивированного вируса, так и по получению рекомбинантной, субъединичной или ДНК-вакцины. С учетом результатов изучения защитных свойств разработанных экспериментальных вакцин ни один из препаратов для коммерческого производства не получил положительной оценки своего потенциала.

Несмотря на это, разработка субъединичной вакцины с использованием рекомбинантных белков и ДНК-вакцин остается одними из самых актуальных подходов при создании экологически безопасных средств специфической профилактики при АЧС. В результате экспериментов показано, что для определения составных компонентов, которые могут быть использованы при создании надежной защиты от АЧС, необходимо изучить функцию определенного белка вируса, его роль в морфогенезе и индукции иммунного ответа.

В 1998 г. Р. Gómez-Puertas и соавт. установили, что белки р54 и р30 вируса АЧС способны индуцировать образование протективных антител у иммунизированных свиней. В ходе исследований определили, что р54 отвечает за специфическое связывание вирусных частиц с макрофагом и проникновение их в клетку, а белок р30 играет ведущую роль в интернализации вируса. Введение этих белков в инфицированную вирусом АЧС культуру клеток в разной степени воздействует на репродукцию вируса *in vitro* [10].

Е. R. Tulman и соавт. (2009) показали возможность ингибции размножения вируса АЧС и задержки гем-адсорбции при использовании сывороток к рекомбинантным белкам р54 и р30 [6].

Другой группой исследователей было продемонстрировано, что введение ДНК-вакцины, созданной на основе плазмидной ДНК рСМV-PQ, несущей гены р54 и р30, индуцирует выработку антител у мышей [8].

Как отмечалось ранее, использование белков р54 и р30 в рассмотренных экспериментах не случайно, так как они являются структурными протеинами, участвующими в вирусном проникновении и интернализации, хотя их роль существенно различается.

р30 – один из ранних вирусных белков, который кодируется геном CP204L, имеет молекулярную массу 30 кДа и является одним из наиболее иммуногенных структурных белков, ответственных за интернализацию вируса АЧС [4]. Экспрессия этого белка, как правило, начинается через 2–4 ч после заражения и продолжается в течение всего цикла репродукции. Таким образом, наличие синтеза р30 указывает на то, что вирус проник в клетку, утратил свою оболочку и началась экспрессия раннего гена CP204L [7].

р54 – белок, кодируемый геном E183L, является антигенно вариабельным структурным белком, отвечающим за прикрепление и проникновение вируса АЧС, и имеет молекулярную массу от 25 до 28 кДа [5].

Следует отметить, что вакцины на основе рекомбинантных белков, модифицированных вирусов и ДНК индуцируют клеточный и гуморальный иммунный ответ к вирусу АЧС, однако на сегодняшний день их применение не дает 100% защиты от заражения. Очевидно, необходимы дальнейшие исследования для определения протективных белков, которые могут быть включены в субъединичную или рекомбинантную вакцину, а также для установления оптимальных иммунных механизмов, которые необходимо активировать для обеспечения надежной защиты от АЧС.

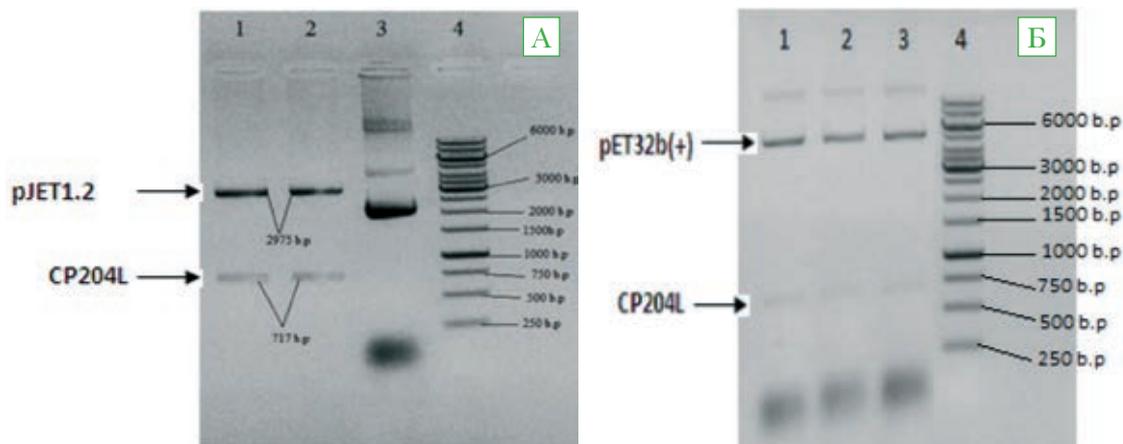
Целью данной работы был сравнительный анализ влияния интродукции рекомбинантного белка р30 и антител к белку р30 на репродукцию вируса АЧС *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника геномной ДНК использовали изолят Krasnodar 07/17 вируса АЧС, выделенный в июле 2017 г. из пробы селезенки от пашей на территории Краснодарского края домашней свиньи.

Рис. 1. Рестрикционный анализ плазмид для определения ориентации и размера встройки

А (для плазмиды рJET1.2-р30): треки 1 и 2 – электрофорез рJET1.2-р30 после рестрикции; трек 3 – рекомбинантная рJET1.2/р30; трек 4 – маркер 1к (Thermo Fisher) с линейкой фрагментов от 10 000 до 250 п. о.;
Б (для плазмиды рET32b(+)/р30): треки 1, 2 и 3 – рET32b(+)-р30 после рестрикции; трек 4 – маркер 1к (Thermo Fisher).



Накопление вируса осуществляли путем пассирования в первичной культуре клеток селезенки свиньи (СС) или костного мозга свиньи (КМС) в течение 2–3 пассажей.

Из вирусосодержащей суспензии, полученной после 2-го или 3-го пассажа, проводили выделение вирусной ДНК с помощью набора «ДНК-сорб-Б» (ООО «НекстБио», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Дизайн праймеров осуществляли с помощью следующих web-ресурсов: для анализа нуклеотидных последовательностей генома штаммов и изолятов вируса АЧС использовали международные базы данных NCBI и EMBL; сравнительный анализ гомологии нуклеотидных последовательностей генов проводили с помощью программ BioEdit, версия 7.2.5, и Benchling.

Аmplификацию гена CP204L вируса АЧС проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией.

Учет результатов реакции проводили методом электрофоретического разделения в 1,0%-м агарозном геле с детектированием в УФ-свете после окраски бромистым этидием.

Клонирование ПЦР-продукта проводили в неэкспрессирующем векторе рJET1.2/blunt с использованием клеток *E. coli* штамма JM-109, согласно руководству CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher, США).

ПЦР-продукт или фрагмент рестрикции ДНК выделяли из агарозного геля с помощью набора реагентов для элюции ДНК из агарозных гелей (Qiagen, Германия), согласно инструкции производителя.

Реклонирование гена CP204L проводили в экспрессирующий вектор рЕТ32b(+) с использованием клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS (Promega, США).

Получение рекомбинантного белка р54, а также клонирование ПЦР-продукта проводили в неэкспрессирующем и экспрессирующем векторах с использованием клеток *E. coli*.

Для быстрой оценки экспрессии рекомбинантного белка использован анализ суммарного клеточного белка с помощью SDS-PAGE-электрофореза в 10% ПААГ по U. K. Laemmli (1970) [9].

Очистку рекомбинантного белка осуществляли с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-сефарозном сорбенте (Sigma, США).

Определение концентрации общего белка проводили по методу Бредфорда и с использованием графика на основе определения коэффициента поглощения.

Для изучения влияния белка р30 на репродукцию вируса АЧС *in vitro* использовали первичную культуру клеток КМС и культуру клеток СС.

Уровень репродукции вируса АЧС в культуре клеток оценивали в реакции гемадсорбции и с помощью тест-системы «АЧС» для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции

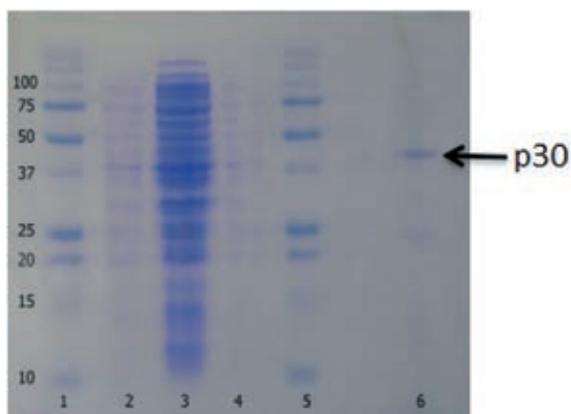


Рис. 2. Электрофореграмма в 10%-й ПААГ, отражающая эффективность очистки белка р30 на Ni-сефарозном сорбенте 1 и 5 – маркеры; 2 и 4 – пустые карманы; 3 – лизат клеток с р30; 6 – очищенный р30.

(ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований амплифицирован ПЦР-продукт, включающий в себя последовательность полноразмерного гена CP204L. По результатам секвенирования, проведенного Н. Г. Зиняковым (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), нуклеотидный состав полученного гена имел 100%-ю гомологию с аналогичной последовательностью референтного штамма Georgia 2007/01 вируса АЧС [3].

После проведения клонирования гена CP204L в рJET1.2/blunt определили его ориентацию методом рестрикционного анализа с использованием эндонуклеаз XhoI и NcoI. Методом электрофоретического разделения в 1%-м агарозном геле установили размер гена и получили продукт для последующего реклонирования в экспрессирующий вектор рЕТ32b(+) (рис. 1).

Эффективность очистки белка р30 на Ni-сефарозном сорбенте определяли с помощью SDS-PAGE-электрофореза в 10%-м ПААГ, сравнивая с исходным клеточным лизатом (рис. 2).

Концентрацию очищенного белка определяли с помощью спектрофотометра, используя градиент разведенный альбумина в физиологическом растворе (табл. 1, график 1).

Таким образом, в результате очистки белка получено 3,2 мл р30 с концентрацией 765 нг/мкл.

Затем определяли характер влияния р30 на репродукцию вируса АЧС *in vitro*. Для этого из матрасов

Таблица 1
Показатели оптической плотности для разных концентраций альбумина

Концентрация альбумина, нг/мкл	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Количество физраствора, мкл	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0
Показатель А280	0	0,069	0,109	0,183	0,244	0,274	0,371	0,418	0,491	0,543	0,617

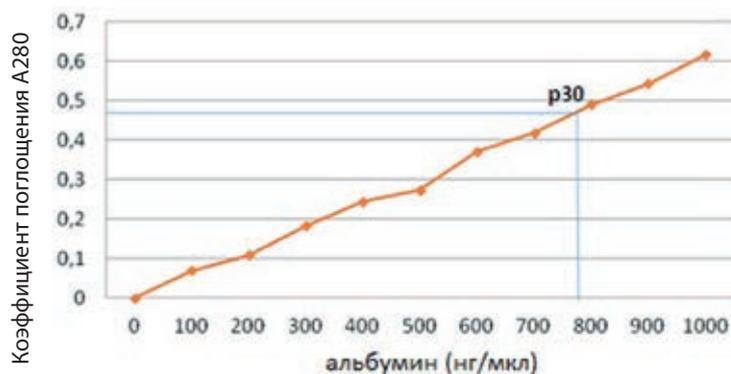


Рис. 3. Определение коэффициента поглощения проб бычьего сывороточного альбумина

с выросшим монослоем клеток удаляли ростовую питательную среду, вносили белок в дозах 100, 200 и 300 нг на матрас объемом 25 см³ и инкубировали на шейкере при 37 °С в течение 1 ч. Далее добавляли питательную среду по 10 мл в каждый матрас и инфицировали культуру клеток изолятом Krasnodar 07/17 вируса АЧС в дозе 100 ГАдЕ на матрас (~ 0,01 ГАдЕ на клетку). В качестве контроля воздействия на репродукцию вируса АЧС использовали полудан в дозе 100 нг на матрас [1], а в качестве отрицательного контроля добавляли 100 нг бычьего сывороточного альбумина. Каждый опыт проводили в четырех параллелях: два матраса с культурой клеток СС и два – с КМС.

Все пробы инкубировали в течение 7 сут при 37 °С и регистрировали появление гемадсорбции с помощью светового микроскопа. На 3, 5 и 7-е сут из каждого матраса отбирали по 200 мкл культуральной жидкости для исследования в реакции гемадсорбции и методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Результаты исследований представлены в таблице 2.

В таблице приведены усредненные значения по 4 пробам.

Все результаты рассчитывали по формуле средне-квадратического отклонения:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_1 - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Таблица 2

Оценка влияния концентрации вносимого белка на уровень репродукции вируса АЧС по значению порогового цикла (Ct) n = 4

Белок/концентрация	ПЦР-РВ (Ct)		
	3-е сут	5-е сут	7-е сут
p30/100 нг	22,2 ± 1,1	16,02 ± 0,31	13,36 ± 0,27
p30/200 нг	19,3 ± 0,5	16,13 ± 0,41	13,5 ± 0,15
p30/200 нг + p54/200 нг	27,8 ± 0,67	24,13 ± 0,59	19,8 ± 0,51
p30/300 нг	22,5 ± 0,31	22,38 ± 0,29	25,22 ± 0,57
полудан/100 нг	21,9 ± 0,61	15,9 ± 0,44	13,14 ± 0,26
альбумин/100 нг	18,4 ± 0,42	12,05 ± 0,6	10,03 ± 0,33
Контроль культуры клеток	–	–	–

Результаты эксперимента по изучению влияния разных количеств белка р30 на уровень репродукции вируса *in vitro* представлены на графике, построенном по данным определения титра вируса в реакции гемадсорбции и ПЦР-РВ (рис. 4).

Как видно из результатов экспериментов (рис. 4), внесение 100 нг р30 и 100 нг полудана приводит к равнозначному эффекту в изменении уровня репродукции вируса АЧС, т. е. значительно снижает его титр в пробе. Интродукция 200 нг р30 приводила к аналогичному результату к 7-м сут после инфицирования. Однако при внесении в образец смеси 200 нг р30 и 200 нг р54 снижение репродукции вируса было существеннее, чем с использованием только 200 нг р30. Самое значительное воздействие на репродукцию вируса наблюдали при добавлении 300 нг р30, причем полную ингибицию репродукции вируса регистрировали на протяжении всего эксперимента (7 сут).

В работе А. С. Казаковой (2012) для изучения репродукции вируса АЧС *in vitro* в аналогичных экспериментах использовалась моноспецифическая сыворотка, полученная путем иммунизации кроликов рекомбинантным белком р30. Автором установлено, что антитела моноспецифической сыворотки крови кролика к Res р30е штамма NVL-1 вируса АЧС в разведении 1:8 задерживали появление гемадсорбции до 5 сут [2].

В результате проведенных исследований установлено, что введение р30 оказало большее влияние на репродукцию вируса АЧС, вплоть до полной ингибиции, чем внесение моноспецифической сыворотки к белку р30. Данные различия объясняются прямым блокированием белком р30 стадии интернализации вируса, а следовательно, и его репродукции. В процессе введения белка р30 в культуру инфицированных клеток вирус АЧС и белок р30 конкурируют за клеточные рецепторы, отвечающие за интернализацию вируса. Поскольку белок р30 блокирует клеточные рецепторы, нарушается стадия проникновения вируса, результатом чего является снижение или полная ингибиция репродукции вируса.

В свою очередь, введение антител к р30 лишь частично блокирует эту стадию репродукции вируса путем связывания вирионного и синтезированного вновь на ранней стадии белка. Вследствие такого вероятного

взаимодействия с белком р30 антитела к нему оказывают менее значительное влияние на репродукцию вируса и приводят лишь к задержке появления гемадсорбции.

Таким образом, анализ двух различных подходов к изучению репродукции вируса АЧС *in vitro* подтвердил целесообразность, приоритетность и необходимость их использования для изучения особенностей репродукции вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку белок р30 играет важную роль в прикреплении и проникновении вируса АЧС в клетки, введенный в культуру клеток, он конкурирует с вирусными белками за рецепторы, ответственные за проникновение и внутриклеточный транспорт вируса. Следовательно, он блокирует стадию интернализации вируса в клетке.

Этот феномен проявляется *in vitro* при добавлении рекомбинантного белка р30 в культуры клеток селезенки свиньи и костного мозга свиньи, в то время как при добавлении альбумина в качестве контроля изменения уровня его репликации не наблюдается.

Таким образом, было достоверно установлено снижение репликации вируса АЧС при интродукции рекомбинантного белка р30 в культуры клеток. Следует отметить наличие дозозависимого эффекта, поскольку внесение 100 или 200 нг р30 приводило к значительному снижению уровня накопления вируса в пробе, а при добавлении 300 нг р30 наблюдалась полная ингибция репродукции вируса в течение всего срока наблюдения (7 сут). Примечательно, что при внесении в образец смеси р30 и р54 снижение репродукции было существеннее, чем с использованием только р30.

Очевидно, что данный способ позволит выявить влияние на репликацию и других белков вируса АЧС с неизвестной функцией, что необходимо для определения основных протективных белков, а также для установления оптимальных иммунных механизмов, обуславливающих надежную защиту от АЧС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние полудана на репродукцию вирусов репродуктивно-респираторного синдрома, трансмиссивного гастроэнтерита и африканской чумы свиней в первичных и перевиваемых культурах клеток / Д. В. Шарыпова, И. Ю. Жуков, Али Мазлум [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 1 (24). – С. 37–41.
2. Казакова А. С. Конструирование продуцентов рекомбинантных белков р72, р30 и р54 вируса африканской чумы свиней: дис. ... канд. биол. наук. – Покров, 2013. – 125 с.
3. Клонирование генов, кодирующих трансмембранные белки и белки, ответственные за вирулентность вируса африканской чумы свиней / Али Мазлум, Н. Г. Зиняков, А. С. Иголкин, Н. Н. Власова // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 2 (25). – С. 3–7; doi: 10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7.
4. African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis / E. G. Sánchez, A. Quintas, M. Nogal [et al.] // Virus Res. – 2013. – Vol. 173, No. 1. – P. 58–75; doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.025.
5. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites / J. M. Rodríguez, R. García-Escudero, M. L. Salas, G. Andrés // J. Virol. – 2004. – Vol. 78, No. 8. – P. 4299–4313; doi: 10.1128/JVI.78.8.4299–4313.2004.
6. African swine fever virus / E. R. Tulman, G. A. Delhon, B. K. Ku, D. L. Rock // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2009. – Vol. 328. – P. 43–87; doi: 10.1007/978-3-540-68618-7-2.
7. Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection / P. Lithgow, H. Takamatsu, D. Werling [et al.] // Vet. Microbiol. – 2014. – Vol. 168, No. 2–4. – P. 413–419; doi: 10.1016/j.vetmic.2013.12.001.
8. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells / J. M. Argilagué, E. Pérez-Martín, C. Gallardo [et al.] // Vaccine. – 2011. – Vol. 29, No. 33. – P. 5379–5385; doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.084.

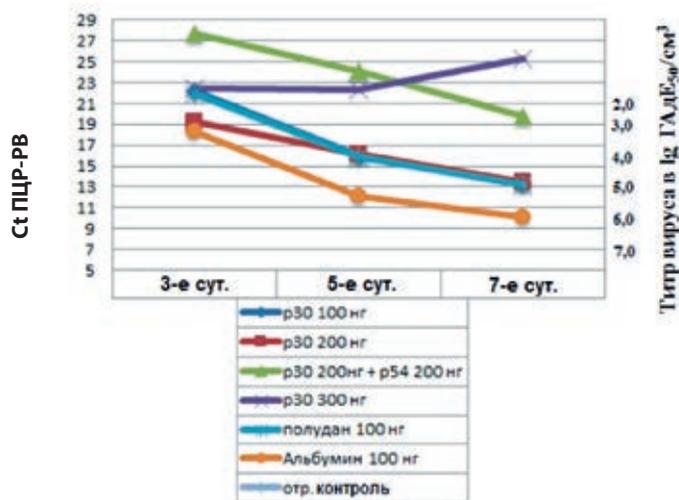


Рис. 4. Влияние р30 вируса АЧС на репродукцию вируса *in vitro*

9. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227, No. 5259. – P. 680–685.
10. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response / P. Gómez-Puertas, F. Rodríguez, J. M. Oviedo [et al.] // Virology. – 1998. – Vol. 243, No. 2. – P. 461–471; doi.org/10.1006/viro.1998.9068.

REFERENCES

1. Poludanum's influence on reproductive and respiratory syndrome, transmissible gastroenteritis and African swine fever viruses in primary and continuous cell cultures. D. V. Sharypova, I. Yu. Zhukov, Ali Mazloum [et al.]. *Veterinary Science Today*. 2018; 1 (24): 37–41.
2. Kazakova A. S. Construction of African swine fever virus recombinant proteins p72, p30 and p54: Candidate Thesis (Biology). Pskov; 2013 (in Russian).
3. Cloning of genes, coding for transmembrane proteins and proteins, responsible for African swine fever virus virulence. Ali Mazloum, N. G. Zinyakov, A. S. Igolkin, N. N. Vlasova. *Veterinary Science Today*. 2018; 2 (25): 3–7; doi: 10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7.
4. African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis. E. G. Sánchez, A. Quintas, M. Nogal. HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nogal%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23154157" Nogal [et al.]. *Virus Res*. 2013; 173 (1): 58–75; doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.025.
5. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites / J. M. Rodríguez, R. García-Escudero, M. L. Salas, G. Andrés. *J. Virol*. 2004; 78 (8): 4299–4313; doi: 10.1128/JVI.78.8.4299–4313.2004.
6. African swine fever virus. E. R. Tulman, G. A. Delhon, B. K. Ku, D. L. Rock. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2009; 328: 43–87; doi: 10.1007/978-3-540-68618-7-2.
7. Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection. P. Lithgow, H. Takamatsu, D. Werling [et al.]. *Vet. Microbiol*. 2014; 168 (2–4): 413–419; doi: 10.1016/j.vetmic.2013.12.001.
8. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. J. M. Argilagué, E. Pérez-Martín, C. Gallardo [et al.]. HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=P%C3%A9rez-Mart%C3%ADn%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21679736" Pérez-Martín, C. HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gallardo%20C%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21679736" Gallardo [et al.]. *Vaccine*. 2011; 29 (33): 5379–5385; doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.084.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (5259): 680–685.
10. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. P. Gómez-Puertas, F. Rodríguez, J. M. Oviedo [et al.]. *Virology*. 1998; 243 (2): 461–471; HYPERLINK "https://doi.org/10.1006/viro.1998.9068" "Persistent link using digital object identifier" doi.org/10.1006/viro.1998.9068.

Поступила 05.06.18

Принята в печать 01.08.18