



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-1-57-63>
УДК 619:616.98.578:636.4:575.113:616-085.37



Конструирование прокариотической системы экспрессии фрагмента гена *ORF-2* цирковируса свиней 2-го типа

А. Г. Галеева¹, А. Р. Ахунова¹, К. В. Усольцев¹, Н. И. Хаммадов¹, М. А. Ефимова^{1,2}

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), Научный городок-2, г. Казань, 420075, Республика Татарстан, Россия

² ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана», ул. Сибирский тракт, 35, г. Казань, 420029, Республика Татарстан, Россия

РЕЗЮМЕ

Цирковиральные болезни свиней на сегодняшний день являются одной из наиболее значимых проблем свиноводства в развитых странах. Цирковир свиней 2-го типа (ЦВС-2) считается основным этиологическим агентом синдрома мультисистемного послеотъемного истощения поросят. Случаи массовой заболеваемости свиней цирковиральными болезнями зарегистрированы в большинстве регионов мира, что влечет за собой серьезные экономические последствия. Известно, что оптимальный профилактический эффект в отношении данных инфекций достигается за счет проведения комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий в сочетании с вакцинацией. Учитывая высокую эволюционную изменчивость вируса, способствующую появлению новых генотипов и штаммов, вопрос разработки новых кандидатных рекомбинантных вакцин против цирковиральной инфекции, вызванной ЦВС-2, остается открытым. Целями настоящего исследования явились конструирование прокариотической системы экспрессии фрагмента гена *ORF-2* ЦВС-2 и оценка ее функциональности. Генетическая вставка, сконструированная из наиболее иммуногенных типоспецифических эпитопов ЦВС-2 на основании консенсусной последовательности штаммов и изолятов генотипов 2a, 2b, 2d, клонирована в экспрессионный вектор pET-22b(+), который был реципирирован в штамм *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3). Отбор трансформантов осуществляли на селективной среде по маркерному гену устойчивости к ампициллину. Индукцию экспрессии целевого гена проводили внесением различных концентраций изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидов. В результате исследований был сконструирован штамм *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3)/pET-22b-ORF-2 – продуцент фрагмента капсидного белка (92–233 а. о.). Установлено, что в присутствии 1 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидов уровень экспрессии растворимого укороченного гСар достигает 35–40 мг/л через 6 ч постиндукции. Специфичность продукта экспрессии оценивали в непрямом иммуноферментном анализе с сывороткой крови свиньи, гипериммунизированной цельновиральным ЦВС-2. Было показано, что коэффициент позитивности лизатов клеток штамма-продуцента составлял в среднем 4,34 ($p < 0,005$). Рекомбинантный белок гСар пригоден для целей серологической диагностики, а также представляет интерес в качестве компонента вакцины, что является целью наших дальнейших исследований.

Ключевые слова: цирковир свиней 2-го типа, синдром мультисистемного послеотъемного истощения, *ORF-2*, прокариотическая система экспрессии

Благодарности: Авторы благодарят старшего научного сотрудника НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» канд. биол. наук Р. Ф. Хайруллина за предоставление экспрессирующего штамма *Escherichia coli*, а также сотрудников ФКП «Щелковский биокомбинат»: д-ра биол. наук, проф. И. Н. Матвееву и канд. биол. наук Н. В. Хаустову – за предоставление гипериммунной сыворотки к цирковирусу свиней 2-го типа и плодотворную дискуссию.

Для цитирования: Галеева А. Г., Ахунова А. Р., Усольцев К. В., Хаммадов Н. И., Ефимова М. А. Конструирование прокариотической системы экспрессии фрагмента гена *ORF-2* цирковируса свиней 2-го типа. *Ветеринария сегодня*. 2024; 13 (1): 57–63. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-1-57-63>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Галеева Антонина Глебовна, канд. вет. наук, заведующий лабораторией вирусных антропозоонозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Научный городок-2, г. Казань, 420075, Республика Татарстан, Россия, e-mail: antonina-95@yandex.ru

Construction of prokaryotic system for expression of porcine circovirus type 2 *ORF-2* gene fragment

Antonina G. Galeeva¹, Alsu R. Akhunova¹, Konstantin V. Usoltsev¹, Nail I. Khammadox¹, Marina A. Efimova^{1,2}

¹ Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Nauchnyi gorodok-2, Kazan 420075, Republic of Tatarstan, Russia

² Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman, 35 Sibirskiy tract str., Kazan 420029, Republic of Tatarstan, Russia

ABSTRACT

Porcine circovirus-associated diseases (PCVDs) are among the most significant challenges for pig farming in developed countries. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) is considered the main etiological agent of postweaning multisystemic wasting syndrome in piglets. Mass PCVD occurrence has been

© Галеева А. Г., Ахунова А. Р., Усольцев К. В., Хаммадов Н. И., Ефимова М. А., 2024

© ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2024

reported in most regions of the world, that results in serious economic consequences. Optimal PCVD prevention is known to be achieved through a set of veterinary and sanitary measures in combination with vaccination. High evolutionary virus variability facilitating new genotype and strain emergence requires development of new candidate recombinant vaccines against PCV-2 infection. The study was aimed at construction of prokaryotic system for PCV-2 ORF-2 gene fragment expression and its functionality assessment. A genetic insert constructed from the most immunogenic type-specific PCV-2 epitopes based on genotype 2a, 2b, 2d strain and isolate consensus sequence was cloned into the expression vector pET-22b(+) that was incorporated into the *Escherichia coli* strain Rosetta 2(DE3). The transformants were selected based on the marker gene of ampicillin resistance on a selective medium. Target gene expression was induced by adding of isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside at different concentrations. As a result, *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3)/pET-22b-ORF-2 strain, a producer of capsid protein fragment (92–233 amino acid residues), was constructed. It was found that in the presence of 1 mM isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside, the expression level of soluble truncated rCap was 35–40 mg/L 6 hours after induction. The expression product was tested for its specificity with indirect ELISA using whole-virion PCV-2-hyperimmunized porcine serum. It was shown that the positivity coefficient of producer strain cell lysates averaged to 4.34 ($p < 0.005$). The recombinant rCap protein is suitable for serological diagnosis and is also of interest as a vaccine component, which is the goal of our further studies.

Keywords: porcine circovirus type 2, postweaning multisystemic wasting syndrome, ORF-2, prokaryotic expression system

Acknowledgements: The authors thank senior researcher of the Laboratory "OpenLab Gene and cell technologies", Kazan (Volga Region) Federal University, Cand. Sci. (Biology) R. F. Khairullin for providing of *Escherichia coli* expressing strain, as well as employees of the Shchelkovo Biocombinat, Dr. Sci. (Biology), Professor I. N. Matveeva and Cand. Sci. (Biology) N. V. Khaustova for providing PCV-2 hyperimmune serum and fruitful discussion.

For citation: Galeeva A. G., Akhunova A. R., Usoltsev K. V., Khammadow N. I., Efimova M. A. Construction of prokaryotic system for expression of porcine circovirus type 2 ORF-2 gene fragment. *Veterinary Science Today*. 2024; 13 (1): 57–63. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-1-57-63>

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

For correspondence: Antonina G. Galeeva, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Laboratory of Viral Anthroozoonoses, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Nauchnyi gorodok-2, Kazan 420075, Republic of Tatarstan, Russia, e-mail: antonina-95@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Цирковирусные болезни свиней на сегодняшний день являются одной из наиболее значимых проблем свиноводства в экономически развитых странах. Цирковирус свиней 2-го типа (ЦВС-2) считается основным этиологическим агентом синдрома мультисистемного послеотъемного истощения (СМПИ, PMWS – postweaning multisystemic wasting syndrome) поросят, а также встречается при синдроме дерматита и нефропатии свиней, респираторном симптомокомплексе и инфекционном врожденном треморе поросят [1]. Цирковирусные болезни у свиней могут проявляться в виде субклинической и клинической инфекций, при этом субинфекция является наиболее распространенной формой инфекционного процесса, вызываемого ЦВС-2, и выражается в потере среднесуточного прироста массы тела без специфических клинических признаков [2]. Системное заболевание поражает поросят преимущественно в возрасте 6–15 недель и характеризуется анорексией, диспептическими явлениями и лимфаденопатией [3]. Случаи массовой заболеваемости свиней цирковирусными инфекциями зарегистрированы в большинстве регионов мира, что влечет за собой серьезные экономические последствия для свиноводческой отрасли [4, 5, 6, 7].

Цирковирус свиней 2-го типа, относящийся к роду *Circovirus* семейства *Circoviridae*, представляет собой мелкий икосаэдрический безоболочечный ДНК-содержащий вирус с кольцевым геномом длиной 1766–1768 п. н. [8]. Известно о существовании 4 типов ЦВС, обладающих высокой нуклеотидной идентичностью (68–76%) и схожей геномной организацией [9, 10]. Геномная ДНК ЦВС-2 состоит из нескольких открытых рамок считывания, кодирующих основные вирусные

протеины – ORF-1 (репликативный протеин), ORF-2 (капсидный протеин), ORF-3 (апоптотический протеин), ORF-4 (ингибитор апоптоза) [11]. Наибольший интерес с точки зрения разработки средств специфической профилактики и диагностики заболеваний, вызванных ЦВС-2, представляет ORF-2, кодирующий капсидный протеин молекулярной массой ≈ 30 кДа [12]. На сегодняшний день идентифицировано 5 основных генотипов ЦВС-2: 2a, 2b, 2c, 2d, 2e; в течение последних 20 лет доминирующими в разных регионах мира являлись генотипы 2a, 2b и 2d [13].

Известно, что оптимальный профилактический эффект в отношении цирковирусных болезней свиней достигается за счет проведения комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий в сочетании с вакцинацией. В настоящее время российский рынок вакцин против цирковирусной инфекции, обусловленной ЦВС-2, представлен цельновирионной инактивированной вакциной «Циркостоп» (ФКП «Щелковский биокомбинат») и рекомбинантной вакциной на основе белка ORF-2, полученного в бакуловирусной системе экспрессии, «ВЕРРЕС-ЦИРКО» (ООО «Ветбиохим») [14]. Однако, учитывая высокую эволюционную изменчивость ЦВС-2, способствующую потенциальному появлению различных генотипов и штаммов [15], можно утверждать, что вопрос разработки новых кандидатных рекомбинантных вакцин, обеспечивающих перекрестную защиту от штаммов разных генотипов, остается дискуссионным. Анализ существующих в мире коммерческих вакцин показал, что успешно применяются преимущественно препараты на основе рекомбинантного белка Cap, полученного в бакуловирусной системе экспрессии. Однако применение данной эукариотической системы зачастую является трудоемким и дорогостоящим [16],

в связи с чем весьма актуальным является получение вакцинного белка при помощи других инструментов экспрессии.

Целями настоящего исследования явились конструирование прокариотической системы экспрессии фрагмента гена *ORF-2* ЦBC-2 и оценка ее функциональности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и плазмиды. Для формирования консенсусной последовательности фрагмента гена *ORF-2* использовали нуклеотидные последовательности геномов эпизоотически значимых штаммов и изолятов ЦBC-2 генотипов 2a, 2b и 2d, депонированные в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI), а именно:

– генотип 2a: IAF2897 (ID AF408635.1), ID AY094619.1, DE99/2014 (ID MW262923.1), AUT-1 (ID AY424401.1), SPA1 (ID AF201308.1), 212 (ID AY256455.1);

– генотип 2b: QZ0401 (ID AY691169.1), NL_Control_1 (ID AY484407.1), 24657 NL (ID AF201897.1), n10eu (ID DQ629116.1), ADDLPP 10069 (ID EU594437.1), DE1054/2014 (ID MW262924.1), AUT5 (ID AY424405.1);

– генотип 2d: 28031_Mantova_32_13/12/2013 (ID KP231140.1), Uy99 (ID KP867050.1), BDH (ID HM038017.1), DE222-13 (ID KP698398.1).

Для клонирования целевого гена использовали экспрессионный вектор pET-22b(+) (Novagen, Германия), для экспрессии – штамм *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3): F-ompT hsd SB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR) (Novagen, Германия), любезно предоставленный канд. биол. наук Р. Ф. Хайруллин.

Дизайн антигенной конструкции. Анализ аминокислотных последовательностей ЦBC-2 осуществляли при помощи ресурсов The Immune Epitope Database (IEDB, США), при этом основным критерием выбора фрагмента для экспрессии служила плотность расположения B-клеточных эпитопов. Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей эпизоотически значимых штаммов и изолятов ЦBC-2 осуществляли при помощи BLAST-анализа. Прогнозирование основных физико-химических свойств укороченного гена *ORF-2* проводили с использованием ресурса Peptide Property Calculator (Innovagen AB, Швеция), гомологическое моделирование трехмерной белковой структуры – веб-сервера SWISS-MODEL (SIB, Швейцария). Укороченная последовательность гена *ORF-2* (276–699 п. н.) была оптимизирована по кодонной для экспрессии в *E. coli* без изменения аминокислотного состава и синтезирована на аутсорсе (ЗАО «Евроген», Россия), после чего клонирована в вектор pET-22b по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI. Наличие целевого гена в векторе было подтверждено секвенированием. Трансформацию клеток штамма-реципиента осуществляли методом теплового шока с дальнейшей селекцией на агаризованной среде с добавлением антибиотиков (200 мкг/мл ампициллина, 34 мкг/мл хлорамфеникола).

Экспрессия rORF-2. Для индукции экспрессии целевого гена клетки штамма *E. coli* Rosetta 2(DE3)/pET-22b/ORF-2 культивировали в питательной среде Лурия – Бертини, содержащей ампициллин и хлорамфеникол, на термошейкере ES-20 (Biosan, Латвия) при температуре +37 °C и 180 rpm до достижения оптической плотности (ОП) 0,7 единиц. Экспрессию гена индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тио-

галактопиранозид – ИПТГ (Promega, США) в концентрации 1 mM, после чего культивировали клетки в течение 5–6 ч. Клеточные лизаты получали путем механической дезинтеграции биомассы в L-буфере (50 mM трис-HCl, pH 8,0; 0,3% KCl; 2 mM PMSF); первичную очистку целевого продукта осуществляли при помощи набора для экстракции бактериального белка «НЭББ-10» (ООО «Диаэм», Россия). Концентрацию белка определяли методом М. Bradford [17]. Наличие зрелого рекомбинантного белка rCap устанавливали в аналитическом disc-электрофорезе клеточных лизатов в 15%-м полиакриламидном геле с окраской Кумасси G250.

Непрямой иммуоферментный анализ. Серологическую активность rCap оценивали в непрямом иммуоферментном анализе (НИФА). Для этого из сыворотки крови, полученной путем гипериммунизации свиней ЦBC-2 (ФКП «Щелковский биокомбинат», Россия), методом одноступенчатой ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [18] выделяли иммуноглобулины класса G, которыми сенсибилизировали поверхность полистироловых иммунологических планшетов средней сорбции (Corning, США) в концентрации 50 нг на лунку и инкубировали в течение 16 ч при температуре +4 °C. После трехкратной отмывки фосфатно-буферным раствором с твином (ФБР-Т) в лунку вносили клеточные лизаты в разведении 1:10 на ФБР и инкубировали в течение 1 ч при температуре +37 °C. В качестве отрицательного контроля использовали лизат клеток, трансформированных плазмидой pET-22b без вставки, гетерологичного контроля – рекомбинантный антиген E2 вируса классической чумы свиней, полученный в аналогичной системе экспрессии. После отмывки вносили специфический пероксидазный конъюгат, полученный по модифицированной методике Р. К. Nakane and A. Kawaoi [19], в концентрации 20 нг на лунку и инкубировали аналогично предыдущему шагу. После пятикратной отмывки вносили субстрат – тетраметилбензидин (ТМБ) и инкубировали планшет в темноте при комнатной температуре в течение 15–20 мин. Учет результатов проводили после внесения стоп-раствора (0,2 M раствора серной кислоты) на планшетном ридере Model 680 (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. Значения ОП интерпретировали полуколичественно с указанием коэффициента позитивности (отношения ОП опытного образца к пороговому значению), вычисленного по минимальному оптическому сигналу образцов, отобранных на стадии пост-индукции. Анализ данных проводили при помощи пакета программ Statistica 7.0 (StatSoft, США) по критерию Манна – Уитни с поправкой на множественное сравнение. За пороговое значение статистически значимых отличий принимали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате биоинформатического анализа было выявлено, что наибольший интерес для дизайна антигенной композиции в структуре белка Cap представляет фрагмент с 92 по 233 а. о., так как он характеризуется наиболее высокой плотностью расположения типоспецифических эпитопов. Более того, иммуногенный потенциал разных доменов данного фрагмента был ранее подтвержден рядом исследователей (табл.).

Таким образом, модифицированный фрагмент укороченной аминокислотной последовательности Cap содержит основные значимые эпитопы, являющиеся

Таблица

Основные эпитопы белка Cap, вошедшие в структуру антигенной композиции

Table

The main epitopes of Cap protein included in the antigenic composition

Эпитоп (последовательность, название)	Позиция в протеоме, а. о.	Характеристики
RPWLVHPRHRY (внешний коровой эпитоп)	26–36	Конформационный эпитоп реагировал с ЦВС-позитивными сыворотками крови свиней; по нейтрализующему эффекту в отношении ЦВС-2 считается одним из преобладающих доменов [20]
TRLSRTFGYTVK (P100)	47–58	Пептиды демонстрировали высокие коэффициенты связывания с сыворотками крови иммунных к ЦВС-2 свиней. Сообщается о возможности их использования для дифференциации вакцинированных и переболевших животных [21]
PFEEYRIRKVKVEFWP (P102)	92–107	
CSPITQGDRGVGSSAVILDDNFVT KATALTY (C2)	108–137	
VTMYVQFREFNLKDPPLKP (P106)	215–233	Идентифицирован как типоспецифический нейтрализующий эпитоп. Показана возможность использования для дифференциации патогенного ЦВС-2 от непатогенного ЦВС-1 [22]
KALTAL (EF-регион)	134–139	
YHSRYFT	156–162	
VLDSTIDYFQPNNKR	166–180	Эпитоп в составе кандидатной вакцины на основе инфекционного клона ЦВС-2b предотвращал репликацию вируса при экспериментальном заражении свиней [24]
VDHVLGTAFENSIY	193–203	Потенциально является одним из сайтов связывания гепарансульфата, ответственных за прикрепление ЦВС-2 к клеткам-мишеням [25]

мишенями для серологической диагностики. По результатам прогнозирования физико-химических свойств данного мультиэпитопного полипептида было установлено, что он обладает молекулярной массой 17,8 кДа, хорошей растворимостью и оптимальным периодом полураспада (более 20 ч) *in vivo* для *E. coli*.

На следующем этапе исследований сконструировали экспрессионный вектор pET-22b/ORF-2, которым были трансформированы клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3), после чего отработали условия культивирования штамма-продуцента. Так, был испытан диапазон значений ОП культуры до индукции (от 0,5 до 1,0 OE), концентрации вносимого ИПТГ (от 0,2 до 2,0 mM), времени (от 2 до 6 ч) и температуры (от +25 до +37 °C) культивирования индуцированных клеток. В результате исследования полипептидных профилей клеточных лизатов, соответствующих каждому режиму культивирования, было установлено, что оптимальными параметрами являются: ОП культуры до индукции – 0,6 OE, концентрация ИПТГ – 1 mM, условия культивирования пост-индукции – 6–7 ч при температуре +37 °C. Данный режим культивирования позволяет достичь выхода рекомбинантного продукта на уровне 35–40 мг/л, что составляет 1,75–2% от общего объема биомассы продуцента.

Серологическая активность и специфичность rCap была подтверждена в ИФА. Так, ОП суммарного белкового препарата составила $(1,065 \pm 0,144)$ OE, коэффициент позитивности – 4,34 ($p < 0,005$). Основные характеристики прокариотической системы экспрессии rCap представлены на рисунке.

Представленные данные подтверждают функциональность разработанной системы экспрессии, что открывает перспективу для использования полученного rCap как в диагностических, так и профилактических целях.

Возможность успешного применения коли-экспрессии для получения компонентов вакцин против цирковирусной инфекции, вызванной ЦВС-2, задокументирована некоторыми исследователями. К примеру, X. Xi et al. сообщают, что полноразмерный растворимый Cap при экспрессии в *E. coli* при нейтральном pH самоорганизуется в гомогенную вирусоподобную частицу (VLP), по размерам соответствующую интактному ЦВС-2 и демонстрирующую протективный эффект *in vivo*, сопоставимый с таковым коммерческих вакцин [26]. Особый интерес представляет экспрессия Cap, слитого с различными модифицированными белками. В частности, имеются сведения о том, что рекомбинантный Cap, слитый с флагеллином, обеспечивал на мышинной модели достижение более высоких уровней вируснейтрализующих антител, стимулируя гуморальное и клеточное звенья иммунитета [27]. Однако сообщается и об ограничениях прокариотических систем экспрессии. Известно, что экспрессия полноразмерного Cap возможна только в тех штаммах *E. coli*, которые содержат плазмиды, несущие гены tRNA редких для *E. coli* кодонов (pRARE). Более того, зачастую продукт экспрессии не поддается очистке в нативных и денатурирующих условиях, что требует дополнительной оптимизации вставки [28].

Несмотря на то что в представленном исследовании удалось достичь приемлемых уровней синтеза укороченного rCap и подтвердить специфичность продукта, ключевую роль в масштабировании производства вакцинного белка будет играть разработка экономичного и эффективного способа его очистки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе представленной работы была сконструирована прокариотическая система экспрессии фрагмента гена ORF-2 ЦВС-2, содержащего наиболее зна-

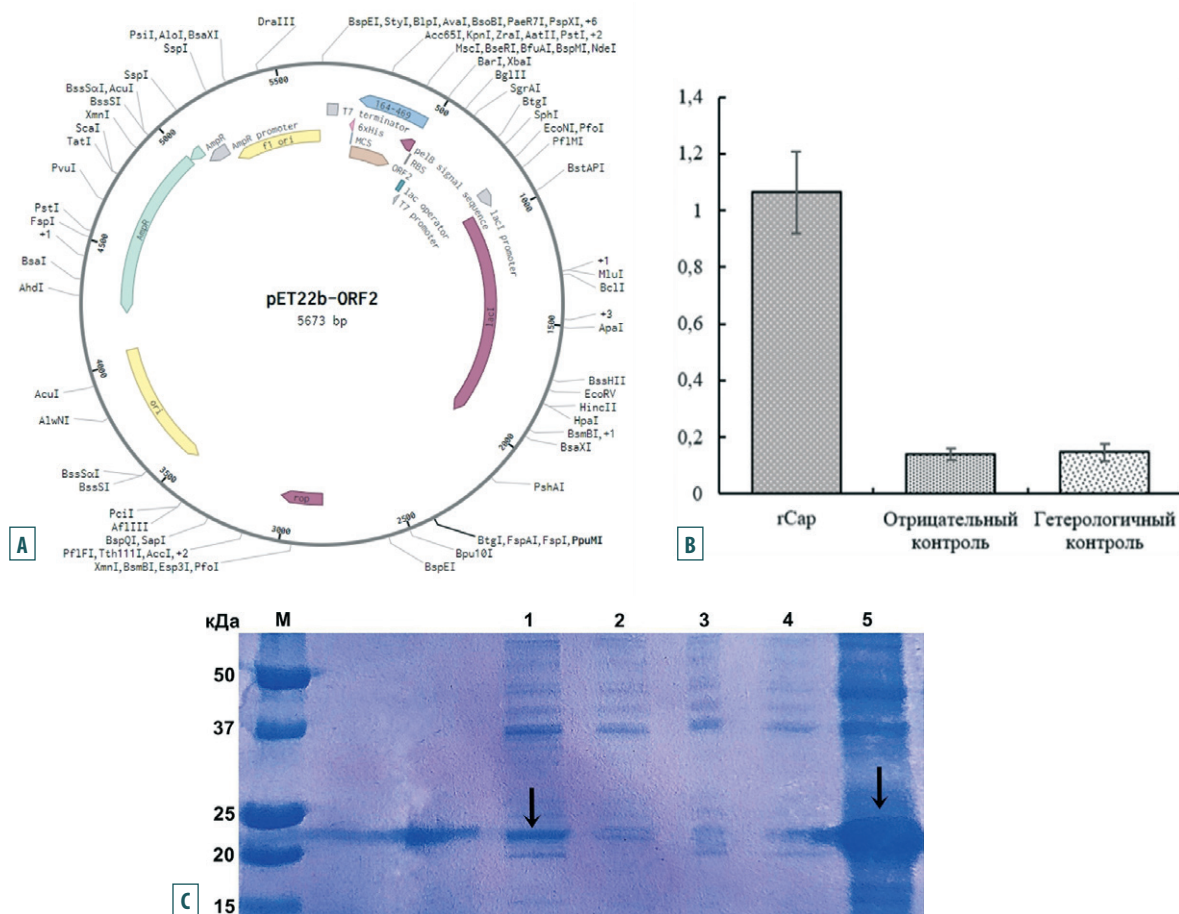


Рис. Характеристики прокариотической системы экспрессии rCap ЦВС-2:

A – схема экспрессионного вектора pET-22b/ORF-2;

B – оптическая плотность rCap в НИФА с гипериммунной свиной сывороткой, где отрицательный контроль – лизат клеток, трансформированных плазмидой pET-22b без вставки, гетерологичный контроль – рекомбинантный белок E2 вируса классической чумы свиней, полученный в аналогичной системе экспрессии;

C – электрофореграмма продуктов экспрессии, где M – маркер молекулярных масс Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (Bio-Rad, США); треки: 1 – препарат целевого белка после первичной очистки; 2 – отрицательный контроль (лизат клеток, трансформированных плазмидой pET-22b без вставки); 3, 4 – лизаты клеток, трансформированных плазмидой pET-22b/ORF-2, до индукции; 5 – лизат клеток штамма-продуцента через 6 ч после индукции.

Стрелками обозначена целевая белковая фракция

Fig. Characteristics of the prokaryotic PCV-2 rCap expression system: A – scheme of the pET-22b/ORF-2 expression vector; B – optical density of rCap tested with indirect ELISA using hyperimmune porcine serum, where negative control is lysate of cells transformed with pET-22b plasmid without insertion, and heterologous control is a recombinant E2 protein of classical swine fever virus, produced in the same expression system; C – electrophoregram of expression products, where M band is the molecular weight marker Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (Bio-Rad, USA), bands: 1 – target protein after primary purification; 2 – negative control (lysate of cells transformed with the pET-22b plasmid without insertion); 3, 4 – lysates of cells transformed with the pET-22b/ORF-2 plasmid before induction; 5 – producer strain cell lysate 6 hours after induction. The target protein fraction is indicated by arrows

чимые иммуногенные эпитопы капсидного протеина. Функциональность системы экспрессии подтверждена наличием зрелого мультиэпитопного полипептида в клеточных лизатах продуцента, а также его серологической активностью в НИФА с гипериммунными к ЦВС-2 сыворотками крови свиней. На основании этих данных можно утверждать, что экспрессируемый полипептид пригоден к использованию в целях серодиагностики, а также представляет интерес в качестве основы для рекомбинантной вакцины, что является целью наших дальнейших изысканий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baekbo P., Kristensen C. S., Larsen L. E. Porcine circovirus diseases: a review of PMWS. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2012; 59 (Suppl. 1): 60–67. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01288.x>
2. Tassis P. D., Tsakmakidis I., Papatsiros V. G., Koulialis D., Nell T., Brel-lou G., Tzika E. D. A randomized controlled study on the efficacy of a novel combination vaccine against enzootic pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*) and porcine Circovirus type 2 (PCV2) in the presence of strong maternally derived PCV2 immunity in pigs. *BMC Veterinary Research*. 2017; 13 (1):91. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1014-7>
3. Young M. G., Cunningham G. L., Sanford S. E. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *Journal of Swine Health and Production*. 2011; 19 (3): 175–180. <https://www.aasv.org/shap/issues/v19n3/v19n3p175.pdf>

4. Булгаков А. Д., Гребенникова Т. В., Южаков А. Г., Алипер Т. И., Непоклонов Е. А. Молекулярно-генетический анализ геномов вирусов респираторно-репродуктивного синдрома свиней и цирковируса второго типа, циркулирующих на территории Российской Федерации. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014; (4): 29–33. EDN: TE0VVZ
5. Литенкова И. Ю., Богомолова О. А., Матвеева И. Н., Чумакова М. С. Эффективность вакцинации поросят инактивированной цельновирионной вакциной против цирковируса свиней второго типа. *Эффективное животноводство*. 2022; (2): 64–65. EDN: NEMMUB
6. Раев С. А., Южаков А. Г., Алексеев К. П., Аноятбеков М., Верховский О. А., Алипер Т. И. Мониторинг цирковиральных болезней свиней в условиях промышленных свиноподкомплексов. *Аграрная наука*. 2019; 11–12: 30–32. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-333-10-30-32>
7. Карпова О. О., Матвеева И. Н. Культивирование клеток: сравнительный анализ традиционных и инновационных технологий. *Ветеринарный врач*. 2022; (5): 14–18. EDN: RRYWMM
8. Lv Q.-Z., Guo K.-K., Zhang Y.-M. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes*. 2014; 49 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1099-z>
9. Zhou J., Wang Y., Zhou L., Qiu Y., Zhao J., Dai B., et al. Interaction network of porcine circovirus type 3 and 4 capsids with host proteins. *Viruses*. 2022; 14 (5):939. <https://doi.org/10.3390/v14050939>
10. Parthiban S., Ramesh A., Karuppannan A. K., Dhinakar Raj G., Hemalatha S., Kirubakaran J. J., et al. Molecular prevalence of porcine circovirus 2 infection: foremost report in southern states of India. *Exploratory Animal and Medical Research*. 2022; 12 (1): 99–108. <https://doi.org/10.52635/eamr/12.1.99-108>
11. He J., Cao J., Zhou N., Jin Y., Wu J., Zhou J. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Journal of Virology*. 2013; 87 (3): 1420–1429. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jvi.01443-12>
12. Truong C., Mahe D., Blanchard P., Le Dimna M., Madec F., Jestin A., Albina E. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Archives of Virology*. 2001; 146 (6): 1197–1211. <https://doi.org/10.1007/s007050170115>
13. Davies B., Wang X., Dvorak C. M. T., Marthaler D., Murtaugh M. P. Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster. *Virus Research*. 2016; 217: 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.02.010>
14. Раев С. А. Специфическая профилактика цирковиральных болезней свиней: современное состояние и перспективы. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2014; (1): 26–29. EDN: SAHYWN
15. Correa-Fiz F., Franco G., Llorens A., Segalés J., Kekarainen T. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genetic variability under natural infection scenario reveals a complex network of viral quasispecies. *Scientific Reports*. 2018; 8 (1):15469. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33849-2>
16. Wu P.-C., Chen T.-Y., Chi J.-N., Chien M.-S., Huang C. Efficient expression and purification of porcine circovirus type 2 virus-like particles in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2016; 220: 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.017>
17. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72 (1–2): 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
18. Page M., Thorpe R. Purification of IgG using DEAE-sepharose chromatography. In: *The Protein Protocols Handbook*. Ed. by J. M. Walker. Totowa: Humana Press; 2002; 987–988. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:987>
19. Мухамеджанова А. Г., Ахмадеев Р. М., Мифтахов Н. Р., Насыров Ш. М., Алеева З. З., Яруллина Г. М., Арутюнян Г. С. Оптимизация схем гипериммунизации лабораторных животных высокоочищенным антигеном вируса бешенства. *Ветеринария*. 2020; (10): 25–29. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.10.25-29>
20. Guo L., Lu Y., Huang L., Wei Y., Liu C. Identification of a new antigen epitope in the nuclear localization signal region of porcine circovirus type 2 capsid protein. *Intervirology*. 2011; 54 (3): 156–163. <https://doi.org/10.1159/000319838>
21. Hung L.-C. Carboxyl-terminal decoy epitopes in the capsid protein of porcine circovirus type 2 are immunogenicity-enhancers that elicit predominantly specific antibodies in non-vaccinated pigs. *Viruses*. 2022; 14 (11):2373. <https://doi.org/10.3390/v14112373>
22. Mo X., Li X., Yin B., Deng J., Tian K., Yuan A. Structural roles of PCV2 capsid protein N-terminus in PCV2 particle assembly and identification of PCV2 type-specific neutralizing epitope. *PLoS Pathogens*. 2019; 15 (3):e1007562. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007562>
23. Shang S.-B., Jin Y.-L., Jiang X.-T., Zhou J.-Y., Zhang X., Xing G., et al. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Molecular Immunology*. 2009; 46 (3): 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.028>
24. Triple B. R., Kerrigan M., Crossland N., Potter M., Faaborg K., Hesse R., Rowland R. R. R. Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011; 18 (5): 749–757. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cvi.00418-10>
25. Khayat R., Brunn N., Speir J. A., Hardham J. M., Ankenbauer R. G., Schneemann A., Johnson J. E. The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. *Journal of Virology*. 2011; 85 (15): 7856–7862. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jvi.00737-11>
26. Xi X., Mo X., Xiao Y., Yin B., Lv C., Wang Y., et al. Production of *Escherichia coli*-based virus-like particle vaccine against porcine circovirus type 2 challenge in piglets: Structure characterization and protective efficacy validation. *Journal of Biotechnology*. 2016; 223: 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.025>
27. Zhang C., Zhu S., Wei L., Yan X., Wang J., Quan R., et al. Recombinant flagellin-porcine circovirus type 2 cap fusion protein promotes protective immune responses in mice. *PLoS ONE*. 2015; 10 (6):e0129617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129617>
28. Rai V., Upmanyu V., Mohd G., Kumar R., Koppad S., Ansari A., et al. Comparing the efficiency of different *Escherichia coli* strains in producing recombinant capsid protein of porcine circovirus type 2. *Molecular and Cellular Probes*. 2020; 52:101556. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101556>

REFERENCES

1. Baekbo P., Kristensen C. S., Larsen L. E. Porcine circovirus diseases: a review of PMWS. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2012; 59 (Suppl. 1): 60–67. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01288.x>
2. Tassis P. D., Tsakmakidis I., Papatsiros V. G., Koulialis D., Nell T., Brelou G., Tzika E. D. A randomized controlled study on the efficacy of a novel combination vaccine against enzootic pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*) and porcine Circovirus type 2 (PCV2) in the presence of strong maternally derived PCV2 immunity in pigs. *BMC Veterinary Research*. 2017; 13 (1):91. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1014-7>
3. Young M. G., Cunningham G. L., Sanford S. E. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *Journal of Swine Health and Production*. 2011; 19 (3): 175–180. <https://www.aasv.org/shap/issues/v19n3/v19n3p175.pdf>
4. Bulgakov A. D., Grebennikova T. V., Yuzhakov A. G., Aliper T. I., Nepoklonov E. A. Molecular genetic analysis of genomes of porcine respiratory and reproductive syndrome viruses and porcine circovirus type 2 circulating on the territory of the Russian Federation. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2014; 29 (4): 190–194. <https://doi.org/10.3103/S0891416814040028>
5. Litenkova I. Yu., Bogomolova O. A., Matveeva I. N., Chumakova M. S. Effectivnost' vaktsinatsii porosyat inaktivirovannoi tsel'novirionnoi vaktsinnoi protiv tsirkovirusa svinei vtorogo tipa = Effectiveness of vaccination of piglets with inactivated whole-virion vaccine against porcine circovirus virus type 2. *Effektivnoe zhivotnovodstvo*. 2022; (2): 64–65. EDN: NEMMUB (in Russ.)
6. Raev S. A., Yushakov A. G., Alekseev K. P., Anoyatbekov M., Verhovskij O. A., Aliper T. I. Porcine circovirus associated diseases diagnosis at industrial pig farm conditions. *Agrarian Science*. 2019; (11–12): 30–32. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-333-10-30-32> (in Russ.)
7. Karpova O. O., Matveeva I. N. Cell cultivation: a comparative analysis of traditional and innovative technologies. *Veterinarian*. 2022; (5): 14–18. EDN: RRYWMM (in Russ.)
8. Lv Q.-Z., Guo K.-K., Zhang Y.-M. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes*. 2014; 49 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1099-z>
9. Zhou J., Wang Y., Zhou L., Qiu Y., Zhao J., Dai B., et al. Interaction network of porcine circovirus type 3 and 4 capsids with host proteins. *Viruses*. 2022; 14 (5):939. <https://doi.org/10.3390/v14050939>
10. Parthiban S., Ramesh A., Karuppannan A. K., Dhinakar Raj G., Hemalatha S., Kirubakaran J. J., et al. Molecular prevalence of porcine circovirus 2 infection: foremost report in southern states of India. *Exploratory Animal and Medical Research*. 2022; 12 (1): 99–108. <https://doi.org/10.52635/eamr/12.1.99-108>
11. He J., Cao J., Zhou N., Jin Y., Wu J., Zhou J. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Journal of Virology*. 2013; 87 (3): 1420–1429. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jvi.01443-12>
12. Truong C., Mahe D., Blanchard P., Le Dimna M., Madec F., Jestin A., Albina E. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Archives of Virology*. 2001; 146 (6): 1197–1211. <https://doi.org/10.1007/s007050170115>
13. Davies B., Wang X., Dvorak C. M. T., Marthaler D., Murtaugh M. P. Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster. *Virus Research*. 2016; 217: 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.02.010>

14. Raev S. A. Vaccination against porcine circovirus diseases: the present state and future prospects. *Russian Veterinary Journal. Productive animals*. 2014; (1): 26–29. EDN: SAHYWN (in Russ.)
15. Correa-Fiz F, Franzo G, Llorens A, Segalés J, Kekkarainen T. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genetic variability under natural infection scenario reveals a complex network of viral quasispecies. *Scientific Reports*. 2018; 8 (1):15469. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33849-2>
16. Wu P.-C., Chen T.-Y., Chi J.-N., Chien M.-S., Huang C. Efficient expression and purification of porcine circovirus type 2 virus-like particles in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2016; 220: 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.017>
17. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72 (1–2): 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
18. Page M., Thorpe R. Purification of IgG using DEAE-sepharose chromatography. In: *The Protein Protocols Handbook*. Ed. by J. M. Walker. Totowa: Humana Press; 2002; 987–988. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:987>
19. Mukhamedzhanova A. G., Akhmadeev R. M., Miftakhov N. R., Nasyrov Sh. M., Aleeva Z. Z., Yarullina G. M., Arutyunjan G. S. Optimization of laboratory animals hyperimmunization schemes with a highly purified rabies virus antigen. *Veterinariya*. 2020; (10): 25–29. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.10.25-29> (in Russ.)
20. Guo L., Lu Y., Huang L., Wei Y., Liu C. Identification of a new antigen epitope in the nuclear localization signal region of porcine circovirus type 2 capsid protein. *Intervirology*. 2011; 54 (3): 156–163. <https://doi.org/10.1159/000319838>
21. Hung L.-C. Carboxyl-terminal decoy epitopes in the capsid protein of porcine circovirus type 2 are immunogenicity-enhancers that elicit predominantly specific antibodies in non-vaccinated pigs. *Viruses*. 2022; 14 (11):2373. <https://doi.org/10.3390/v14112373>
22. Mo X., Li X., Yin B., Deng J., Tian K., Yuan A. Structural roles of PCV2 capsid protein N-terminus in PCV2 particle assembly and identification of PCV2 type-specific neutralizing epitope. *PLoS Pathogens*. 2019; 15 (3):e1007562. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007562>
23. Shang S.-B., Jin Y.-L., Jiang X.-T., Zhou J.-Y., Zhang X., Xing G., et al. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Molecular Immunology*. 2009; 46 (3): 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.028>
24. Triple B. R., Kerrigan M., Crossland N., Potter M., Faaberg K., Hesse R., Rowland R. R. Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011; 18 (5): 749–757. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cvi.00418-10>
25. Khayat R., Brunn N., Speir J. A., Hardham J. M., Ankenbauer R. G., Schneemann A., Johnson J. E. The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. *Journal of Virology*. 2011; 85 (15): 7856–7862. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jvi.00737-11>
26. Xi X., Mo X., Xiao Y., Yin B., Lv C., Wang Y., et al. Production of *Escherichia coli*-based virus-like particle vaccine against porcine circovirus type 2 challenge in piglets: Structure characterization and protective efficacy validation. *Journal of Biotechnology*. 2016; 223: 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.025>
27. Zhang C., Zhu S., Wei L., Yan X., Wang J., Quan R., et al. Recombinant flagellin-porcine circovirus type 2 cap fusion protein promotes protective immune responses in mice. *PLoS ONE*. 2015; 10 (6):e0129617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129617>
28. Rai V., Upmanyu V., Mohd G., Kumar R., Koppad S., Ansari A., et al. Comparing the efficiency of different *Escherichia coli* strains in producing recombinant capsid protein of porcine circovirus type 2. *Molecular and Cellular Probes*. 2020; 52:101556. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101556>

Поступила в редакцию / Received 13.12.2023

Поступила после рецензирования / Revised 17.01.2024

Принята к публикации / Accepted 14.02.2024

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Галеева Антонина Глебовна, канд. вет. наук, заведующий лабораторией вирусных антропоознозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-2650-6459>, e-mail: antonina-95@yandex.ru

Ахунова Алсу Рузалева, младший научный сотрудник лаборатории вирусных антропоознозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0009-0006-0211-3334>, e-mail: aahunova@mail.com

Усольцев Константин Валерьевич, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического анализа, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5279-9836>, e-mail: ukv3@mail.ru

Хаммадов Наиль Ильдарович, канд. биол. наук, заведующий лабораторией молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5669-1486>, e-mail: nikhammadov@mail.ru

Ефимова Марина Анатольевна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных антропоознозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»; профессор ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-8786-1310>, e-mail: marina-2004r@mail.ru

Antonina G. Galeeva, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Viral Anthropozoonoses, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2650-6459>, e-mail: antonina-95@yandex.ru

Alsu R. Akhunova, Junior Researcher, Laboratory for Viral Anthropozoonoses, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0009-0006-0211-3334>, e-mail: aahunova@mail.com

Konstantin V. Usoltsev, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory for Molecular and Genetic Analysis, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5279-9836>, e-mail: ukv3@mail.ru

Nail I. Khammatov, Cand. Sci. (Biology), Head of Laboratory for Molecular and Genetic Analysis, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5669-1486>, e-mail: nikhammadov@mail.ru

Marina A. Efimova, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory for Viral Anthropozoonoses, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety; Professor, Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-8786-1310>, e-mail: marina-2004r@mail.ru

Вклад авторов: Галеева А. Г. – концепция исследования, работа с литературой, проведение экспериментов, подготовка текста; Ахунова А. Р. – проведение экспериментов, сбор материала, подготовка текста; Усольцев К. В. – биоинформатический анализ, работа с литературой; Хаммадов Н. И. – проведение экспериментов, интерпретация данных; Ефимова М. А. – администрирование, анализ и обобщение результатов исследования.

Contribution: Galeeva A. G. – development of the study design, literature analysis, conducting experiments, preparation of the paper text; Akhunova A. R. – conducting experiments, data collection, preparation of the paper text; Usoltsev K. V. – bioinformatic analysis, literature analysis; Khammatov N. I. – conducting experiments, data interpretation; Efimova M. A. – administering, study result analysis and generalization.