

эти мероприятия и не откажутся от надежд на вакцины, которые только отвлекают владельцев продуктивных животных от проведения эффективных профилактических мер.

Случаи заболевания животных некробактериозом предупреждают не с помощью различных препаратов, а с помощью знаний эпизоотического процесса этой инфекционной болезни. Прежде всего учитывают резервуары и факторы передачи возбудителя инфекции, пути и механизмы, по которым он передаётся, пусковой механизм и движущую силу эпизоотического процесса. Разумеется, очень важно уметь использовать эти знания и применять их в конкретных хозяйственных условиях.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляков В.Д., Каминский Г.Д. Скрытые пружины эпидемий и профилактика будущего // Гипотезы. Прогнозы (Будущее науки): международный вестник. — М.: Знание, 1988. — С. 172–184.
2. Джупина С.И. Причины заболеваемости и профилактика некробактериоза // Ветеринария. — 2005. — № 7. — С. 7–10.
3. Джупина С.И. Рациональная эпизоотологическая классификация инфекционных болезней с.-х. живот-

ных // Вестник Российской академии с.-х. науки. — 2001. — № 2. — С. 71–75.

4. Држевецкая И.А. Основы физиологии и обмена веществ и эндокринной системы. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Высшая школа, 1983. — 272 с.

5. Коваленко Я.Р. Анаэробные инфекции сельскохозяйственных животных. — М.: Сельхозгиз, 1954. — 360 с.

6. Лукьяновский В.А. Биотехнологические закономерности возникновения ортопедических болезней у коров // Ветеринария. — 1997. — № 10. — С. 35–41.

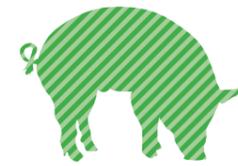
7. Петров Р.В. Иммунология. — М.: Медицина, 1987. — 416 с.

8. Пути оздоровления хозяйств от болезней пальцев, копыт и некробактериоза / Д.А. Хузин, Х.Н. Макаев, К.Х. Попунди [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2013. — № 4 (7). — С. 22–27.

9. Розен В.В. Основы эндокринологии. — М.: Высшая школа, 1989. — С. 305–308.

10. Самоловов А.А., Лопатин С.В. Хромота — отражение системных метаболических болезней молочного рогатого скота // Инновации и продовольственная безопасность. — 2014. — № 2. — С. 76–80.

11. Самоловов А.А. Некробактериоз крупного рогатого скота. — Новосибирск, 1998. — 139 с.



## БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

УДК 619:616.98:578.842.1:616-078

# КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ В *E. COLI* ГЕНОВ K205R И B602L ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

А.В. Щербаков<sup>1</sup>, А.С. Яковлева<sup>2</sup>, А.М. Тимина<sup>3</sup>, М.Р. Якупов<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>3</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>4</sup> аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

#### РЕЗЮМЕ

Проведено молекулярное клонирование генов K205R и B602L вируса африканской чумы свиней в *E. coli*. Отработаны условия экспрессии и очистки, обеспечивающие высокий выход рекомбинантных белков. Очистку растворенных рекомбинантных белков проводили методом металл-хелатной хроматографии с применением Ni-NTA-agarose («Qiagen»). Рекомбинантные антигены биологически безопасны, более технологичны в приготовлении и обеспечивают более высокую специфичность ИФА. Выход очищенного протеина со 100 мл культуры *E. coli* составил 1,5 мг для рK205R и 2 мг для рB602L.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней, рекомбинантные белки рK205R и рB602L, экспрессия.

#### ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) — вирусная болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, цианозом кожи и обширными геморрагиями во внутренних органах. Для АЧС характерно многообразие форм течения болезни: от сверхострой и острой со 100% летальностью до хронической.

АЧС эндемична в Африке, Сардинии (Италия), а с 2007 г. в Закавказье и Российской Федерации. Экономический ущерб, наносимый африканской чумой свиней, складывается из прямых потерь по радикальной ликвидации болезни, ограничений в международной торговле и измеряется десятками миллионов долларов.

Возбудитель африканской чумы свиней — крупный оболочечный вирус семейства *Asfarviridae*, рода *Asfivirus*. Геном вируса АЧС, представленный двухцепоч-

ечной ДНК длиной 170–192 тысячи пар нуклеотидов, кодирует до 150 белков. Из них не менее 28 являются структурными [3].

В связи с тем, что эффективные и безопасные вакцины против АЧС не разработаны, борьба с болезнью ведется путем ее диагностики и ликвидации очагов заболевания.

Лабораторная диагностика АЧС основана на выявлении возбудителя болезни или антител к нему в крови и органах инфицированных животных. Методы прямого обнаружения вируса (выделение в культуре клеток, РПИФ, ПЦР) являются приоритетными для диагностики сверхострых и острых форм АЧС. Серологические методы предпочтительны для диагностики подострых и хронических форм болезни, обнаружение антител

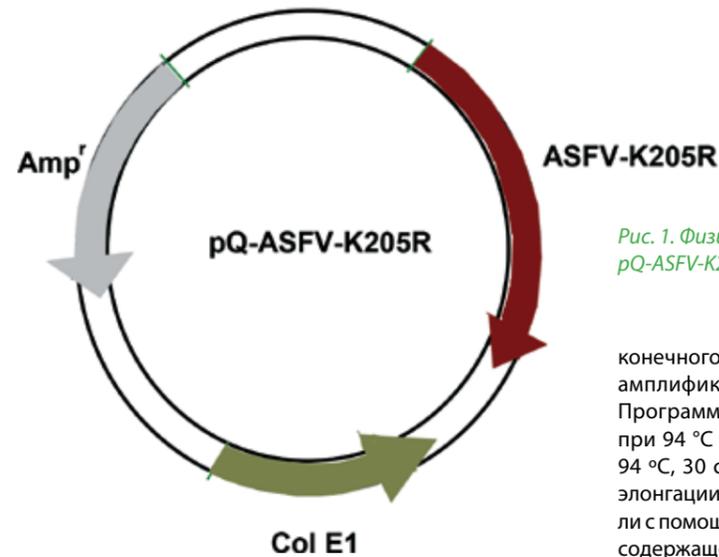


Рис. 1. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pQ-ASFV-K205R

конечного объема 50 мкл. Реакцию проводили в ДНК-амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Программа включала 3 мин начальной денатурации при 94 °C и 35 циклов ПЦР: 30 сек. денатурации при 94 °C, 30 сек. отжига праймеров при 55 °C и 40 сек. элонгации при 72 °C. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА.

**Молекулярное клонирование** генов K205R и B602L осуществляли по общепринятым методикам [1].

**Экспрессия рекомбинантных белков.** Культивирование *E. coli* проводили в орбитальном шейкере при 150 об/мин и 37 °C. В дневную культуру клеток, достигшую логарифмической фазы роста, добавляли индуктор IPTG (Promega, США). Уровень экспрессии и размер рекомбинантных белков определяли с помощью электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гены K205R и B602L амплифицировали методом ПЦР, используя ДНК российского изолята вируса АЧС. В реакции применяли праймеры, содержащие сайты рестрикции Bam HI и Hind III. После обработки соответствующими рестриктазами ампликоны клонировали в экспрессирующий плазмидный вектор под T5-промотор. Физические карты рекомбинантных плазмид представлена на рис. 1 и 2.

В результате трансформации рекомбинантными плазмидами компетентных клеток JM109 *E. coli* получили клоны, экспрессирующие рекомбинантные белки rK205R и rB602L вируса АЧС. Молекулярный вес рекомбинантных белков соответствовал расчетному (рис. 3, треки 1 и 3).

С целью повышения уровня накопления рекомбинантных белков в клетках *E. coli* были проведены эксперименты по оптимизации условий экспрессии. Оптимизацию проводили по двум параметрам: концентрации индуктора (ИПТГ) и времени экспрессии.

Влияние концентрации индуктора на уровень экспрессии изучали в диапазоне от 0,01 до 2 мМ. Уровень экспрессии белков определяли визуально по электрофореграмме. Накопление рекомбинантных белков rK205R и rB602L достигало максимума при концентрации ИПТГ 0,5 мМ и при дальнейшем повышении концентрации индуктора не менялось.

Полученные результаты позволили установить, что концентрация ИПТГ 0,5 мМ является достаточной для экспрессии рекомбинантных белков rK205R и rB602L, и все дальнейшие эксперименты по экспрессии проводились с использованием этой концентрации индуктора.

После определения оптимальной концентрации индуктора исследовали кинетику экспрессии белков.

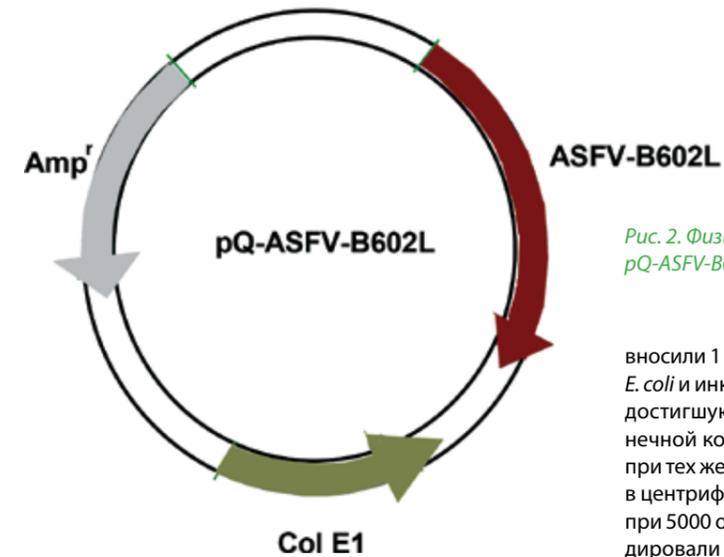


Рис. 2. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pQ-ASFV-B602L

Для этого аликвоты дневной культуры отбирали через 0,25; 0,5; 1; 2; 4 и 18 ч после индукции и анализировали в 12%-ном полиакриламидном геле. Было обнаружено, что белки являются относительно стабильными, поскольку даже после 18 ч экспрессии не наблюдалось их протеолиза. Накопление белков rK205R и rB602L достигало максимума через 4 ч после индукции и далее не менялось, поэтому все последующие эксперименты проводились именно с таким временным режимом.

Следующий этап исследований заключался в отработке условий очистки и концентрирования белков rK205R и rB602L. Рекомбинантные белки содержали на N-конце шесть остатков гистидина. Это позволяло проводить очистку rK205R и rB602L методом металл-хелатной хроматографии. В связи с тем, что рекомбинантные белки накапливались в клетках *E. coli* в нерастворимой форме, их очистку проводили в денатурирующих условиях.

При использовании в качестве денатурирующего агента 8М мочевины в раствор переходила лишь незначительная часть рекомбинантных белков, большая же часть их при центрифугировании выпадала в осадок вместе с клеточным дебрисом. С помощью 6М гуанидин хлорида белки rK205R и rB602L растворялись в гуанидин хлориде значительно лучше, чем в мочеvine. В связи с этим 6М гуанидин хлорид был включен в состав буфера для лизиса клеток и промывки.

Очистку растворенных рекомбинантных белков проводили методом металл-хелатной хроматографии с применением Ni-NTA-agarose (Qiagen). Рекомендуемые фирмой-изготовителем сорбента условия элюции рекомбинантных белков оказались непригодными, поскольку белки не снимались с сорбента при использовании стандартных условий: низких значений pH или 0,2М имидазола. Лишь при повышении концентрации имидазола в элюирующем буфере до 0,4М удалось добиться элюции большей части каждого из белков. Дальнейшее повышение концентрации имидазола в элюирующем буфере не повлияло на выход белков в элюате. Таким образом, оптимальным условием элюирования белков являлось использование 0,4М раствора имидазола.

В результате оптимизации всех параметров была принята следующая схема экспрессии и очистки рекомбинантных белков rK205R и rB602L. В колбу со 100 мл среды LB, содержащей 100 мг/мл ампициллина,

вносили 1 мл ночной культуры рекомбинантного клона *E. coli* и инкубировали при 170 об/мин, 37 °C. В культуру, достигшую плотности  $OD_{600}=0,5$ , вносили ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ и инкубировали еще 4 ч при тех же условиях. Культуру клеток *E. coli* переносили в центрифужные стаканы и осаждали в течение 15 мин при 5000 об/мин. Надосадок удаляли, осадок ресуспендировали в 5 мл лизирующего/промывочного раствора (6М гуанидин гидрохлорид, 0,1М  $NaH_2PO_4$ , 0,01М Трис-НСI, pH 8,0) и перемешивали в течение 30 мин. Лизат центрифугировали в течение 5 мин при 12000 g. Осадок удаляли, к надосадку добавляли 1 мл сорбента (Ni-NTA агароза) и перемешивали в течение 15 мин, после чего суспензию центрифугировали в течение 1 мин при 12000 g. Надосадок сливали, осадок дважды промывали 10 мл лизирующего/промывочного раствора. Для элюции рекомбинантного белка к осадку добавляли 1 мл элюирующего раствора (0,4М имидазол, 0,1М  $NaH_2PO_4$ , 0,01 мМ Трис-НСI, pH 8,0), перемешивали в течение 1 мин, после чего центрифугировали течение 1 мин при 12000 g. Надосадок содержал очищенный рекомбинантный белок. Для оценки степени очистки и концентрации рекомбинантных белков проводили электрофорез в 12%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли.

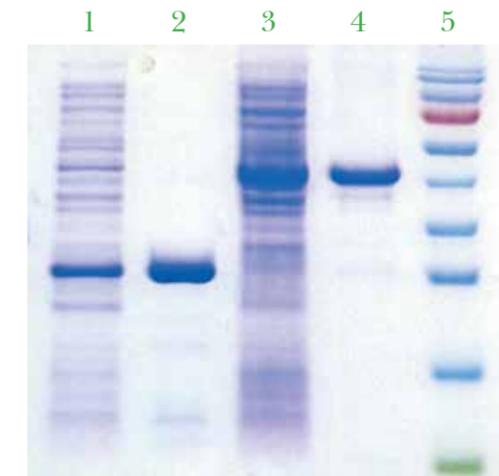


Рис. 3. Экспрессия в *E. coli* рекомбинантных белков rK205R и rB602L вируса АЧС, анализ в 12%-ном полиакриламидном геле

1 — экспрессия в *E. coli* рекомбинантного белка rK205R; 2 — очищенный препарат рекомбинантного белка rK205R; 3 — экспрессия в *E. coli* рекомбинантного белка rB602L; 4 — очищенный препарат рекомбинантного белка rB602L; 5 — маркер молекулярной массы белков (170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 10 кДа).

к вирусу АЧС является основным способом выявления животных, инфицированных низковирулентными штаммами [2].

В качестве основного метода серологической диагностики АЧС Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) рекомендует иммуноферментный анализ. В иммуноферментном анализе, рекомендованном МЭБ (далее МЭБ-ИФА), в качестве антигена используются частично очищенные препараты белков вируса АЧС, выращенного в культуре клеток MS [6]. Получение такого антигена трудно стандартизировать, и оно связано с биологическими рисками. Кроме того, при высокой чувствительности МЭБ-ИФА его специфичность относительно невысока [4].

В связи с этим активно ведутся исследования по получению и использованию в серодиагностике АЧС рекомбинантных антигенов. Рекомбинантные антигены биологически безопасны, более технологичны в приготовлении и обеспечивают более высокую специфичность ИФА. К настоящему времени описано применение в серодиагностике АЧС нескольких рекомбинантных белков: p54 [7, 8], p30 [9, 11], pp62 [5], p10, p72, pA104R, pC44L, pCP312R [12]. В 2009 г С. Gallardo и соавт. показали, что перспективными антигенами для серодиагностики АЧС являются рекомбинантные белки rK205R и rB602L. ИФА с применением этих рекомбинантных антигенов отличался высокой чувствительностью и специфичностью при выявлении антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней [10].

Цель работы состояла в том, чтобы экспрессией в *E. coli* получить рекомбинантные белки rK205R и rB602L и отработать условия их экспрессии и очистки.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирусы.** Для молекулярного клонирования генов K205R и B602L использовали изолят Оренбург-2008 вируса АЧС.

**Выделение вирусной ДНК** осуществляли с использованием 6М гуанидин тиоцианата и стекловолокнистых фильтров GF/F.

**ПЦР.** Для проведения ПЦР собирали реакционную смесь, которая содержала 5 мкл 10 × буфера для ПЦР, 3 мМ  $Mg^{2+}$ , 0,2 мМ dNTPs, 2 ед. Taq ДНК-полимеразы, по 20 пмоль праймеров, 5 мкл раствора ДНК и воду до

С применением описанной технологии удалось получить очищенные препараты рекомбинантных белков с высокой концентрацией. Выход очищенного протеина со 100 мл культуры *E. coli* составил 1,5 мг для рK205R и 2 мг для рB602L (рис. 3, треки 2 и 4).

На основе полученных рекомбинантных антигенов планируется разработать непрямой вариант ИФА для выявления антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней.

### ВЫВОДЫ

Проведено молекулярное клонирование генов K205R и B602L вируса АЧС. Получены клоны *E. coli*, экспрессирующие рекомбинантные белки рK205R и рB602. Отработаны условия экспрессии и очистки, обеспечивающие высокий выход очищенных препаратов рекомбинантных белков.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М: Мир, 1984. — 480 с.
2. African swine fever // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. — 2012. — Vol. 2, Chap. 2.8.1. — URL: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (дата обращения: 01.10.14).
3. African swine fever / J.M. Sanchez-Vizcaino, B. Straw, S. D'Alaire, W. Mengeling // Diseases of Swine / ed. B.E. Straw [et al.]. 9<sup>th</sup> ed. — Ames, Iowa, 2006. — P. 291–298.
4. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples / C. Cubilos, S. Gomez, N. Moreno [et al.] // Virus Res. — 2013. — Vol. 173. — P. 159–167.
5. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect

cells / C. Gallardo, E. Blanco, J.M. Rodriguez [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44. — P. 950–956.

6. Escribano J.M., Pastor M.J., Sanchez Vizcaino J.M. Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever // Am. J. Vet. Res. — 1989. — Vol. 50. — P. 1118–1122.

7. High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents / J.M. Oviedo, F. Rodriguez, P. Gomez-Puertas [et al.] // J. Virol. Meth. — 1997. — Vol. 64. — P. 27–35.

8. Highly specific confirmatory western blot test of African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54 / C. Alcaraz, F. Rodriguez, J. Oviedo [et al.] // J. Virol. Meth. — 1995. — Vol. 52. — P. 111–119.

9. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced on *Trichoplusia ni* larvae / D.M. Perez-Filgueira, F. Gonzalez-Camacho, C. Gallardo [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44. — P. 3114–3121.

10. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever / C. Gallardo, A.L. Reis, G. Kalema-Zikusoka [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. — 2009. — Vol. 16. — P. 1012–1020.

11. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae / M. Barderas, A. Wigdorovitz, F. Merelo [et al.] // J. Virol. Meth. — 2000. — Vol. 89. — P. 129–136.

12. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus / A.L. Reis, R.M. Parkhouse, A.R. Penedos [et al.] // J. Gen. Virol. — 2007. — Vol. 88. — P. 2426–2434.

# CLONING AND EXPRESSION OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS K205R AND B602L GENES IN *E. COLI*

A.V. Scherbakov<sup>1</sup>, A.S. Yakovleva<sup>2</sup>, A.M. Timina<sup>3</sup>, M.R. Yakupov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Leading Scientist, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

<sup>2</sup> Senior Scientist, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

<sup>3</sup> Senior Scientist, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

<sup>4</sup> Postgraduate, FGBI «ARRIAH», Vladimir

### SUMMARY

A molecular cloning of African swine fever virus k205r and b602l genes in *E. coli* was carried out. The expression and purification conditions ensuring high yield of recombinant proteins were optimized. Dissolved recombinant proteins were purified by metal-chelate affinity chromatography using Ni-NTA-agarose («Qiagen»). Recombinant antigens are biologically safe, easier to prepare and ensure higher ELISA specificity. The purified protein yield from 100 ml of *E. coli* culture was 1,5 mg for pK205R and 2 mg for pB602L.

Key words: African swine fever virus, pK205R and pB602L recombinant proteins, expression.

### INTRODUCTION

African swine fever (ASF) is a viral disease of pigs characterized by fever, skin cyanosis and extensive hemorrhages in internal organs. ASF is also characterized by various forms; from a peracute and acute with 100% mortality to a chronic form.

ASF is endemic in Africa, Sardinia (Italy) and starting from 2007 in Transcaucasia and the Russian Federation. Economic losses caused by African swine fever are associated with both measures taken to eradicate the disease and restrictions in international trade and worth tens of millions of U.S. dollars.

ASF agent is a large enveloped virus from *Asfivirus* family, *Asfivirus* genus. ASF virus contains a double-stranded DNA genome of 170 to 192 kbp which codes up to 150 proteins. At least 28 out of them are structural [3].

Due to the fact that no effective and safe vaccines against ASF have been developed the disease is controlled by its timely diagnosis and outbreak eradication.

ASF laboratory diagnosis is based on the detection of the disease agent or antibodies in blood and organs of infected animals. Direct virus detection techniques (isolation in cell culture, direct IFA, PCR) are of choice for the diagnosis of peracute and acute ASF forms. Serological methods are preferred for the diagnosis of subacute and chronic forms of the disease; detection of ASFV antibodies is the major tool to detect animals infected with low virulent strains [2].

The World Organization for Animal Health recommends enzyme-linked immunosorbent assay as a technique of the first choice for ASF serological diagnosis. In