

ФГБУ «ВНИИЗЖ»

ПРИСВОЕН НОВЫЙ СТАТУС РЕФЕРЕНТНОЙ ЛАБОРАТОРИИ МЭБ

В ходе последней ежегодной Генеральной сессии в Париже Всемирная ассамблея делегатов МЭБ утвердила статус ФГБУ «Федеральный центр здоровья животных» как новой «Референтной лаборатории МЭБ по высокопатогенному и низкопатогенному гриппу птиц и ньюкаслской болезни».



БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ PORCINE DISEASES

УДК 619:578.842.1:612.015.348:575.113

DOI 10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ТРАНСМЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ И БЕЛКИ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ВИРУЛЕНТНОСТЬ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Али Мазлум¹, Н. Г. Зиняков², А. С. Иголкин³, Н. Н. Власова⁴

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

² Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: zinyakov@arriah.ru

³ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

⁴ Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты клонирования генов Х69R, А179L, Е248R, I215L и DP96R изолята Krasnodar 07/17 вируса африканской чумы свиней и анализ их нуклеотидных последовательностей. Полученные клоны пополнили ранее созданную клонотеку, содержащую клоны с 8 генами изолята Krasnodar 06/12. Клоны, содержащие гены Х69R, А179L, Е248R, I215L и DP96R изолята Krasnodar 07/17 вируса африканской чумы свиней, будут использованы для получения рекомбинантных белков и изучения их влияния на репродукцию вируса *in vitro*, их роли в инфекционности вируса, степени выраженности клинических признаков и вирулентности. В работе использовали прокариотический вектор рJET1.2/blunt. Таким образом, имеющаяся в референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ» клонотека дополнена плазмидными конструкциями рJET1.2-Х69R, рJET1.2-А179L, рJET1.2-Е248R, рJET1.2-I215L и рJET1.2-DP96R, несущими 5 генов изолята Krasnodar 07/17 вируса африканской чумы свиней. Доля клонированных генов вируса составила 3,01% генома изолята Krasnodar 07/17, следовательно, общий объем клонотеки достиг 7,82%.

Ключевые слова: африканская чума свиней (АЧС), трансмембранные белки, белки, ответственные за вирулентность вируса АЧС, секвенирование, клонотека генов.

ВВЕДЕНИЕ

Создание репрезентативных клонотек ДНК-последовательностей является эффективным подходом в разработке современных диагностических средств и рекомбинантных вакцин. Кроме того, использование клонотек при анализе структуры генов возбудителей особо опасных болезней исключает использование инфекционного агента, уменьшая опасность работы для исследователя.

Клонотека (библиотека) генов представлена набором рекомбинантных плазмид (или их содержащих клонов бактериальных клеток), несущих различные гены определенного хозяина. Первая клонотека генов была создана в 1977 г. F. Sanger и соавт. [11, 12].

S. D. Kollnberger и соавт. в 2002 г. провели скрининг библиотеки экспрессирующих генов вируса африканской чумы свиней (АЧС) с помощью поликлональной антисыворотки (от свиней, выживших после инфици-

рования вирулентным вирусом АЧС) и идентифицировали 14 серологических иммунодетерминант, включая неструктурные белки рВ602L, рС44L, рСР312R, рЕ183L, рК145R и рК205R, структурные белки рА104R, р10/рК78R, р30/рСР204L, р54/рЕ183L, р72/рВ646L, а также вирусные ферменты: рибонуклеотидредуктазу (рр334L, рр778R), ДНК-лигазу (ррNP419L) и тимидинкиназу (рК169R) [9].

В 2014 г. впервые в Российской Федерации была создана клонотека генов СР204L, КР177R, О61R, ЕР402R, СР530R, Е183L и фрагментов генов В646L, СР2475L вируса АЧС изолята Krasnodar 06/12, клонированных в составе векторной молекулы рJET 1.2. Доля клонированных генов вируса АЧС составляла 4,81% генома изолята Krasnodar 03/12 [2]. В состав данной библиотеки не входили гены Х69R, А179L, Е248R, I215L и DP96R, кодирующие белки рХ69R, рА179L, рЕ248R, убиквитин-конъюгирующий фермент (Е2) и УК соответственно. Эти гены играют важную роль в поддержании вирулентности возбудителя АЧС и влияют на степень выраженности клинических признаков.

Установлено, что для образования полноценных инфекционных вирионов вируса АЧС необходим белок рЕ248R, кодируемый геном Е248R, расположенным в левой концевой вариабельной области генома вируса. Он обладает характеристиками, аналогичными белку р54, и локализуется на внутренней липопротеидной оболочке вирусной частицы [5].

Белок рА179L/5HL, или р21 (вирусный гомолог ВсI2 (vBcl2)), кодируется геном А179L, расположенным в центральной консервативной области генома вируса АЧС, имеет молекулярную массу 19 кДа и блокирует процесс апоптоза в инфицированной клетке [6, 10]. Функция этого белка установлена при экспрессии в гетерологичных системах, таких как вирус осповакцины или бакуловирус [4]. Данный белок синтезируется как на ранней, так и на поздней стадии инфекции, таким образом подтверждая свою решающую роль в выживании клеток на различных этапах жизненного цикла вируса АЧС.

Белок УК с молекулярной массой 10,7 кДа, состоящий из 96 аминокислот, кодируется геном DP96R, расположенным в правом вариабельном конце генома. При анализе нуклеотидных последовательностей гена DP96R, представленных в генетических базах данных, значительного сходства между DP96R и другими генами известных вирусов не обнаружено. Известно, что этот ген ответственен за вирулентность вируса АЧС и степень выраженности клинических признаков. В результате проведенных экспериментов все животные выжили после заражения генетически модифицированным вирусом, лишенным гена DP96R [3].

Убиквитин-конъюгирующий фермент (Е2), кодируемый геном I215L, гомологичен семейству белков, связывающих убиквитин в инфицированной клетке [15]. Процесс начинается со связывания убиквитина с белками для дальнейшей модификации, в этом процессе действуют три фермента: Е1, Е2 и Е3. Фермент Е2 взаимодействует с ферментом Е1 и одним или несколькими Е3, чтобы регулировать их активность, также он может взаимодействовать непосредственно с белками и играть роль в определении путей их модификации, опосредованных убиквитином [7].

Состоящий из 69 аминокислот белок рХ69R кодируется неохарактеризованным в настоящий момент геном Х69R. Однако анализ с помощью программы Vaxign для прогнозирования уровня антигенности белков показал, что Х69R кодирует трансмембранный структурный белок, обладающий способностью эффективно индуцировать выработку антител. Оценка уровня антигенности белков, проведенная для вируса АЧС, отнесла его лишь на 22-ю позицию в качестве кандидата на использование при разработке вакцины [8, 16, 17]. Вследствие чего клонотека, включающая копии данных генов, может быть использована при разработке рекомбинантных и ДНК-вакцин против АЧС или генетически модифицированного вируса. Данный факт обусловил выбор направления работ по пополнению репрезентативной библиотеки клонов генов вируса АЧС.

Целью данной работы являлось получение рекомбинантных плазмид, несущих полноразмерные гены трансмембранных белков и белков, ответственных за вирулентность вируса африканской чумы свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для клонирования выбрали изолят Krasnodar 07/17 вируса АЧС, выделенный из пробы селезенки от павшей домашней свиньи (июль 2017 г., Краснодарский край, ООО «АПК «Петровский»). Патологический материал использовали для заражения культуры клеток селезенки свиней. Вируссодержащую суспензию второго пассажа использовали для выделения ДНК.

Выделение вирусной ДНК осуществляли с помощью набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя [1].

Учет результатов полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили методом электрофоретического разделения в 1,0%-м агарозном геле с детектированием в УФ-свете после окраски бромистым этидием. Для определения длины фрагментов использовали 1 к маркер (Thermo Fisher) с линейкой фрагментов от 250 до 10 000 п.о.

Для проведения секвенирования выделяли ПЦР-продукт из агарозного геля с помощью набора реагентов для элюции ДНК из агарозных гелей (Qiagen) согласно инструкции [14].

Клонирование ПЦР-продуктов проводили согласно руководству CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher) в векторе рJET1.2/blunt с использованием клеток *E. coli* штамма JM109 [13].

Полученные ампликоны секвенировали с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit на капиллярном ДНК-секвенаторе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США).

Для анализа нуклеотидных последовательностей генома штаммов и изолятов вируса АЧС использовали

Рис. 1. Схема полноразмерного генома вируса АЧС штамма Georgia 2007/1 с расположением ОРС генов Х69R, А179L, Е248R, I215L и DP96R

Стрелками указано направление рамки считывания клонированных генов, а в скобках отмечены позиции их локализации. Синим цветом выделены гены с ориентацией в обратном направлении (L), а красным цветом – с ориентацией в прямом направлении (R).



Таблица
Праймеры, использованные для амплификации генов вируса АЧС

Название гена	Позиция в геноме	Направление рамки считывания	Праймеры	Позиции праймеров	Размер фрагмента (п.о.)
E248R	166992–167738	Слева направо	E248R-F	166983 167008	759
			E248R-R	167721 167742	
I215L	173792–174430	Справа налево	I215L-F	173754 173778	717
			I215L-R	174449 174471	
DP96R	184331–184621	Слева направо	DP96R-F	184314 184334	404
			DP96R-R	183698 184718	
A179L	53779–54318	Справа налево	A179L-U	53748 53767	679
			A179L-D	54408 54427	
X69R	19227–19436	Слева направо	X69R-F	18470 18493	1140
			X69R-R	19586 19610	

ресурсы международных баз данных NCBI, EMBL. Сравнительный анализ гомологии нуклеотидных последовательностей генов проводили с помощью программ BioEdit (версия 7.2.5) и Benchling.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работа по получению клонов генов вируса АЧС и анализу их нуклеотидных последовательностей включала в себя несколько этапов.

1. Дизайн праймеров

На основе изучения литературы и проведенного анализа расположения генов X69R, A179L, E248R, I215L и DP96R на физической карте генома изолята Georgia 2007/1 вируса АЧС (рис. 1) определили оптимальные участки для дизайна праймеров.

С помощью программы Benchling рассчитали 5 пар праймеров, фланкирующих полноразмерные перечисленные гены (табл.).

2. Оптимизация условий постановки ПЦР

Температуру отжига праймеров подбирали, используя для постановки реакции градиент температур от 42 до 62 °С с шагом 1 °С на амплификаторе Mastercycler[®]nexus (Eppendorf, Германия). В результате экспериментов оптимизировали условия амплификации фрагментов генома вируса для клонирования. Установили, что оптимальные температуры отжига праймеров находятся в диапазоне 50–55 °С.

3. Клонирование генов вируса АЧС в векторе pJET1.2/blunt

Амплифицированные полноразмерные копии генов (рис. 2) использовали для конструирования рекомбинантных плазмид на основе прокариотического вектора pJET1.2 с последующей трансфекцией полученных конструкций в клетки *E. coli*.

Лигирование встройки с вектором проводили по тупым концам. В среднем для проведения одной реакции лигирования ПЦР-продуктов размером более 1000 п.о. использовали от 50 до 100 нг/μл ДНК и 25 нг/μл вектора pJET1.2/blunt, для ПЦР-продуктов менее 1000 п.о. – от 20 до 50 нг/μл ДНК и 25 нг/μл вектора pJET1.2/blunt.

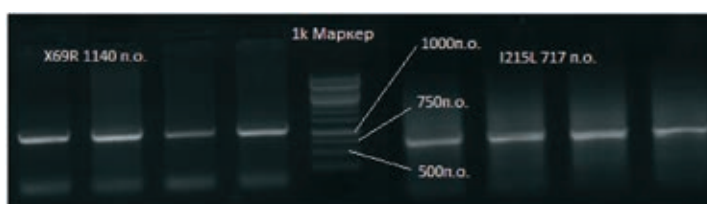
Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli* штамма JM109 в концентрации 10⁶ в 50 мкл.

Выбор прокариотического вектора pJET1.2/blunt для клонирования ПЦР-продуктов обусловлен удобством и простотой манипуляций, поскольку методика не требует проведения очистки ПЦР-продуктов от компонентов реакционной смеси. Кроме того, применение данного вектора позволяет провести клонирование с возможностью получения до 100% положительных клонов, избавляя от необходимости проведения скрининга колоний.

Плазмидную ДНК полученных клонов анализировали в ПЦР на наличие встроек и использовали для

Рис. 2. Результаты электрофоретического разделения в 1%-м геле агарозы ПЦР-продуктов (изолят Krasnodar 07/17 вируса АЧС)

Слева от маркера полосы ПЦР-продуктов при использовании праймеров для амплификации фрагментов, содержащих ген X69R, а справа от маркера – фрагментов, содержащих ген I215L.



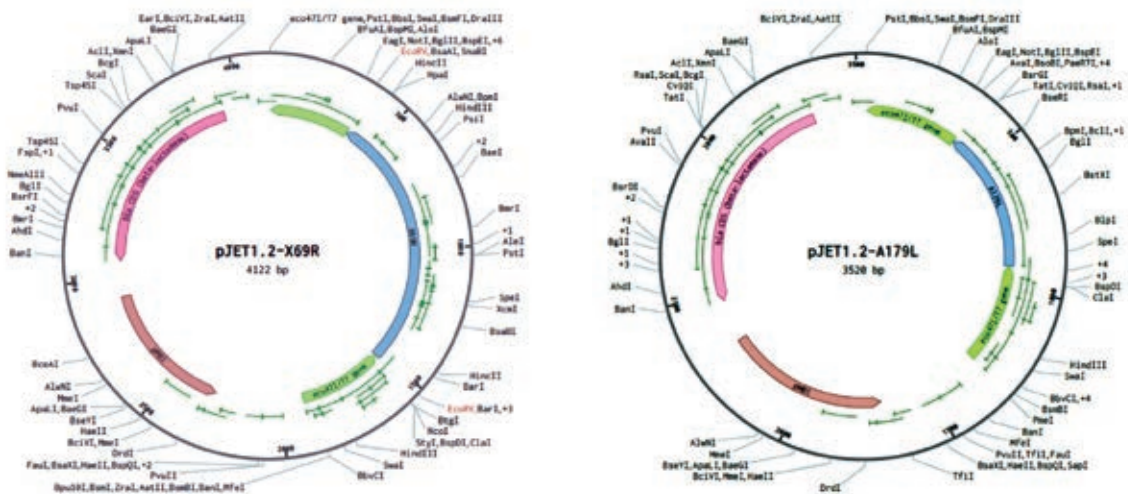


Рис. 3. Схема рекомбинантной плазмиды pJET1.2, несущей ген X69R (слева) и ген A179L (справа) вируса АЧС

Голубая стрелка – встройка клонированного гена; зеленая стрелка – полилинкер плазмиды pJET1.2; розовая стрелка – ген β-лактамазы. В центре – название и размер рекомбинантной плазмиды.

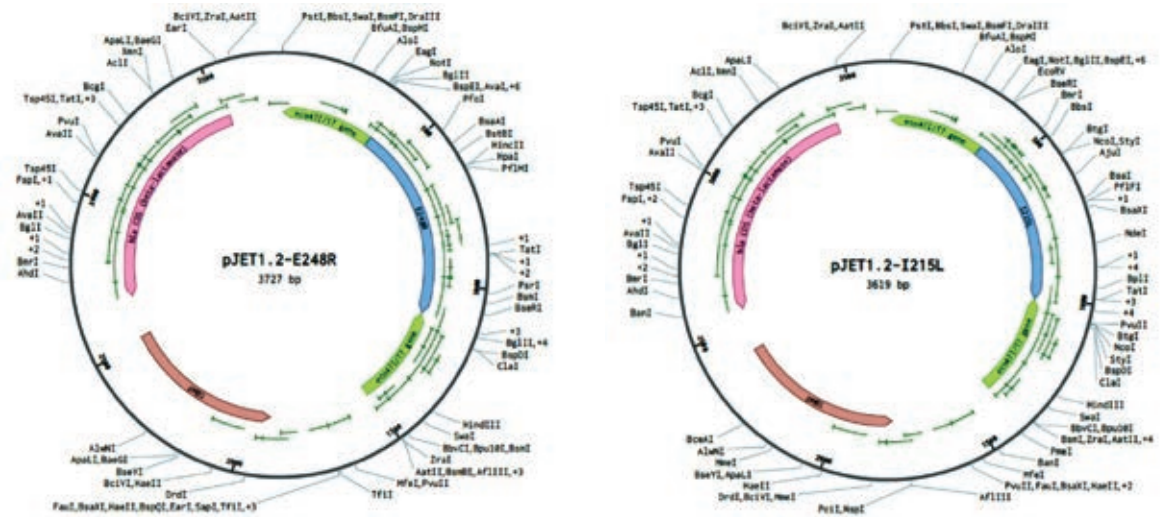


Рис. 4. Схема рекомбинантной плазмиды pJET1.2, несущей ген E248R (слева) и ген I215L (справа) вируса АЧС

Голубая стрелка – встройка клонированного гена; зеленая стрелка – полилинкер плазмиды pJET1.2; розовая стрелка – ген β-лактамазы. В центре – название и размер рекомбинантной плазмиды.

дальнейшего секвенирования. С этой целью были отобраны по 3 клон, содержащих гомологичную вставку каждого гена. Анализ нуклеотидных последовательностей клонированных ПЦР-продуктов подтвердил, что в плазмиде pJET1.2/blunt клонированы полноразмерные гены.

4. Анализ нуклеотидных последовательностей генов вируса АЧС

Поскольку установление ориентации гена в плазмиде является необходимым требованием для дальнейшего переклонирования его в экспрессирующие плазмиды, то при проведении секвенирования использовали праймеры, комплементарные фланкирующим полилинкер-областям плазмиды pJET1.2/blunt. Это дало возможность определить ориентацию клонированного гена. В результате анализа установлено, что

гены A179L и X69R клонированы в обратной ориентации, а E248R, I215L и DP96R – в прямой.

Также провели анализ нуклеотидных последовательностей полноразмерных генов X69R, A179L, E248R, I215L и DP96R изолята Krasnodar 07/17. В результате установили, что они идентичны аналогичным последовательностям генома изолята Georgia 2007/1.

В результате проведенной работы было получено 5 генов вируса АЧС в рекомбинантных плаزمиды: pJET1.2-X69R, содержащая вставку размером 1140 п.о., и pJET1.2-A179L, содержащая вставку размером 679 п.о. (рис. 3); pJET1.2-E248R, содержащая вставку размером 759 п.о., и pJET1.2-I215L, содержащая вставку размером 717 п.о. (рис. 4); pJET1.2-DP96R, содержащая вставку размером 404 п.о. (рис. 5).

Полученные клоны дополнили коллекцию из 8 генов, кодирующих иммунологически значимые белки вируса АЧС (B646L (p72), CP204L (p30), KP177R (p22), O61R (p12), EP402R (CD2v), CP530R (pp62), CP2475L (pp220) и E183L (p54)), созданную в 2014 г. А. А. Варенцовой

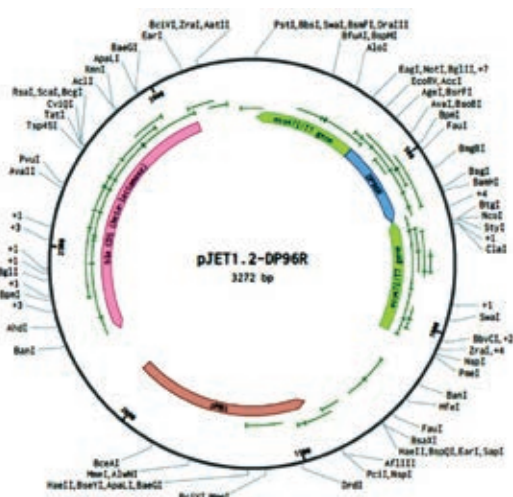


Рис. 5. Схема рекомбинантной плазмиды pJET1.2, несущей ген DP96R вируса АЧС

Голубая стрелка – встройка клонированного гена;
 зеленая стрелка – полилинкер плазмиды pJET1.2;
 розовая стрелка – ген β-лактамазы.
 В центре – название и размер рекомбинантной плазмиды.

и др. [2]. Доля клонированных генов вируса АЧС составила 3,01% генома изолята Krasnodar 07/17, следовательно, общий объем клонотеки достиг 7,82%.

Выбор генов вируса АЧС, представленных в работе, проводился из двух групп: гены (Х69R и E248R), кодирующие трансмембранные белки, и гены (A179L, DP96R и I215L), кодирующие белки, влияющие на вирулентность вируса и степень выраженности клинических признаков АЧС.

Клонотека первой группы генов предназначена для переклонирования в экспрессирующие плазмиды и получения рекомбинантных белков с целью изучения их влияния на репродукцию вируса и установления их роли в этом процессе. Клонотека второй группы может быть использована для получения генетически модифицированного вируса и проведения сравнительного анализа его репродукции, как первый этап в разработке вакцины против вируса АЧС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подобранные олигонуклеотидные праймеры позволили амплифицировать полноразмерные гены Х69R, A179L, E248R, I215L и DP96R вируса АЧС, кодирующие трансмембранные белки и белки, влияющие на вирулентность вируса, а также определить их нуклеотидные последовательности для изолята Krasnodar 07/17.

Получены рекомбинантные плазмидные конструкции, несущие амплифицированные полноразмерные гены.

Плазмидные конструкции pJET1.2-Х69R, pJET1.2-A179L, pJET1.2-E248R, pJET1.2-I215L и pJET1.2-DP96R, входящие в состав представленной в данной работе клонотеки, будут использованы для получения рекомбинантных белков и изучения их влияния на репродукцию вируса АЧС *in vitro*. Кроме того, они могут быть использованы для определения особенностей структуры отдельных генов, создания альтернативных источников генетического материала, как положительный

контроль в ПЦР-диагностике, а также для получения рекомбинантных вирусов и ДНК-вакцин против АЧС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инструкция по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В». – URL: http://www.interlabservice.ru/upload/iblock/ff0/Инструкция%20ДНК-сорб-В_30.10.2012.pdf.
2. Конструирование библиотеки генов, кодирующих иммунологически значимые белки вируса АЧС изолята Krasnodar 06/12 / А. А. Варенцова, И. В. Шевченко, Н. Г. Зиняков [и др.] // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2014. – № 5–1. – С. 28–35.
3. A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic pig / L. Zsák, E. Caler, Z. Lu [et al.] // J. Virol. – 1998. – Vol. 72, No. 2. – P. 1028–1035.
4. African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death / A. Brun, C. Rivas, M. Esteban [et al.] // Virology. – 1996. – Vol. 225, No. 1. – P. 227–230.
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. An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1 / J. G. Neilan, Z. Lu, C. L. Afonso [et al.] // J. Virol. – 1993. – Vol. 67, No. 7. – P. 4391–4394.
7. E2 enzymes: More than just middlemen / M. D. Stewart, T. Ritterhoff, R. E. Klevit, P. S. Brzovic // Cell Res. – 2016. – Vol. 26, No. 4. – P. 423–440. DOI: 10.1038/cr.2016.35.
8. He Y., Xiang Z., Mobley H. L. T. Vaxign: The first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development // J. Biomed. Biotechnol. – Vol. 2010. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/297505>.
9. Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody / S. D. Kollnberger, B. Gutierrez-Castañeda, M. Foster-Cuevas [et al.] // J. Gen. Virol. – 2002. – Vol. 83. – P. 1331–1342.
10. Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus bcl-2 homologue: role of the BH1 domain / Y. Revilla, A. Cebrían, E. Baixeras [et al.] // Virology. – 1997. – Vol. 228, No. 2. – P. 400–404.
11. Menon R., Farina C. Shared molecular and functional frameworks among five complex human disorders: a comparative study on interactomes linked to susceptibility genes // PLoS One. – 2011. – Vol. 6 (4):e18660. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018660>.
12. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA / F. Sanger, G. M. Air, B. G. Barrell [et al.] // Nature. – 1977. – Vol. 265, No. 5596. – P. 687–695.
13. Product Information Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit. – URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012966_CloneJET_PCR_Cloning_40rxn_UG.pdf.
14. QIAquick Gel Extraction Kit Protocol. – URL: http://www.indiana.edu/~lchenlab/protocol_files/agarose_gel_extraction.pdf.
15. Rodríguez J. M., Salas M. L., Viñuela E. Genes homologous to ubiquitin-conjugating proteins and eukaryotic transcription factor SII in African swine fever virus // Virology. – 1992. – Vol. 186, No. 1. – P. 40–52.
16. Safety and immunogenicity of mammalian cell-derived and Modified Vaccinia Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine / J. Lopera-Madrid, J. E. Osorio, Y. He [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2017. – Vol. 185. – P. 20–33. DOI: 10.1016/j.vetimm.2017.01.004.
17. Xiang Z., He Y. Genome-wide prediction of vaccine targets for human herpes simplex viruses using Vaxign reverse vaccinology // BMC Bioinformatics. – 2013. – Vol. 14 (Suppl 4):S2. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/14/S4/S2>.

Поступила 24.03.18

Принята в печать 27.04.18