

## РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ VP 1 И VP 2 ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЦЫПЛЯТ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

*<sup>2</sup>А.К.Алиева, <sup>1</sup>П.А.Красочко, <sup>1</sup>Д.Л.Жук, <sup>3</sup>Н.К.Еремец, <sup>3</sup>Л.С.Люлькова*

<sup>1</sup>УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»,  
Витебск, Республика Беларусь

*krasochko@mail.ru, daria.zhuk1988@bk.ru;*

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный экономический  
университет», Санкт-Петербург

*aaizanat@mail.ru;*

<sup>3</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический  
институт биологической промышленности», Щелково, Московской обл.

*e-mail:vnitibp@mail.ru*

**Резюме.** Целью настоящих исследований является получение рекомбинантных белков вируса инфекционной анемии цыплят для конструирования диагностических тест-систем. Оптимизация последовательности фрагмента гена VP1 и VP2, хроматографическую очистку белка CAV-VP1-VP2 проводили методом металл-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях с последующим рефолдингом. С помощью вышеописанного метода максимальный выход растворимого белка - порядка 25% - достигается при использовании 5 мМ фосфатный буфера, содержащего 0.02% Brij-35 при pH 7.80. В указанных условиях с 500 мл культуры штамма-продуцента было получено 1.3 мг белка CAV-VP1-VP2 в концентрации 600 мкг/мл.

**Summary.** The aim of the present studies is to obtain recombinant proteins of the chicken infectious anemia virus for the construction of diagnostic test systems. Optimization of the sequence of the gene fragment VP1 and VP2, chromatographic purification of the protein CAV-VP1-VP2 was carried out by metal-affinity chromatography under denaturing conditions, followed by refolding. By the method described above, a maximum soluble protein yield of about 25% is achieved using a 5 mM phosphate buffer containing 0.02% Brij-35 at pH 7.80. Under

these conditions, 1.3 mg of CAV-VP1-VP2 protein at a concentration of 600 µg/ml was obtained with 500 ml of culture of the producer strain.

**Ключевые слова:** инфекционная анемия цыплят, экспрессия генов, рекомбинантный белок VP1 и VP2.

**Key words:** infectious anemia of chickens, gene expression, recombinant protein VP1 and VP2

**Введение.** Производство рекомбинантных белков стало возможным благодаря генной инженерии. Рекомбинантные белки – это белки, производимые с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Первым рекомбинантным белком, полученным методом биосинтеза является инсулин (1978). Использование технологии рекомбинантной ДНК решает проблему дефицита животного сырья, позволяет нарабатывать лекарственные средства в необходимом количестве с высокой частотой [1,2,10].

Первым биообъектом для получения рекомбинантного белка явилась кишечная палочка (*E.Coli*). Получаемый белок оставался внутри клетки и был малодоступен для протеаз для выделения белков, следовательно, необходимо было разрушать клетку, что весьма трудоемко и затрудняет очистку продукта. Затем стали использовать сенную палочку (*Bac. subtilis*), дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), псевдомонады (*Pseudomonas*). У них секреция белков происходит в культуральную жидкость, это является положительным моментом, так как не нужно проводить трудоемкую стадию по разрушению клеток для выделения белков [6,8,9].

**Целью настоящих исследований** является получение рекомбинантных белков вируса инфекционной анемии цыплят для конструирования диагностических тест-систем

**Материалы и методы.** Этапы создания рекомбинантной ДНК:

1. Рестриктазное расщепление ДНК, вырезание необходимого фрагмента ДНК (гена) из исходной ДНК организма-донора. Можно так же синтезировать нужный ген.

2. Определение точных границ гена.

3. Обработка рестриктазами вектора для клонирования, который будет реплицироваться в клетке хозяина (плазида, бактериофаг).

4. Сшивание лигазой двух фрагментов ДНК с образованием рекомбинантной ДНК.

5. Введение рекомбинантной ДНК в клетку-хозяина. Этот процесс называется трансформацией.

6. Идентификация и отбор клеток, несущих рекомбинантную ДНК.

7. Получение специфичного белка, синтезированного трансформированными клетками хозяина [4,5,9].

За рубежом разработана субъединичная вакцина против ИАЦ с использованием белков VP 1 и VP 2, которые синтезированы в клетках насекомых с использованием бакуловирусного вектора, который обеспечивает одновременную экспрессию генов, кодирующих данные белки в одной клетке. Показано, что белки VP 1 и VP 2, полученные в данной системе, индуцируют вируснейтрализующие антитела, которые обеспечивают защиту молодняка от заражения патогенным вирусом [3,7].

**Результаты исследований.** Получение телец включения. Культуральную биомассу штамма-продуцента ресуспендировали в буфере PBS из расчета 5 мл буфера на 1 г биомассы. К суспензии добавляли 10% раствор Тритона X-114 до конечной концентрации 0.1% и 100 мМ раствор PMSF до конечной концентрации 1 мМ. Клетки разрушали, обрабатывая суспензию ультразвуком на ледяной бане 5 раз по 1 минуте с перерывами в 2 минуты. Лизат центрифугировали при +4 °С в течение 1 часа с ускорением 13000 g. Супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в буфере PBS, содержащем 0.01% Твин 20. Суспензию центрифугировали при +4С в течение 1 часа с ускорением 13000 g, супернатант отбрасывали. Полученный осадок телец включения хранили при -20С.

Хроматографическую очистку белка CAV-VP1-VP2 проводили методом металл-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях. Осадок телец включения ресуспендировали в стартовом буфере (50 мМ фосфат натрия, 500 мМ хлорид натрия, 5 мМ имидазол, 6 М гуанидина гидрохлорид, рН = 7.80) с добавлением PMSF до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с интенсивным перемешиванием. Раствор фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Sartorius). Хроматографию проводили на аппарате АКТА start (GE Healthcare). Хроматографическую колонку HisTrap FF Crude объемом 1 мл (GE Healthcare) уравнивали 5 мл стартового буфера, вносили раствор телец включения, отмывали колонку 20 мл стартового буфера и элюировали целевой белок 10 мл элюирующего буфера (50 мМ фосфат натрия, 500 мМ хлорид натрия, 500 мМ имидазол, 6 М гуанидина гидрохлорид, рН = 7.80). Скорость потока

подвижной фазы составляла 1 мл/мин, скорость внесения раствора телец включения - 0.5 мл/мин. Мониторинг оптической плотности элюата осуществляли на длине волны 280 нм. Фракции с оптической плотностью более 0.4 mAU, объединяли, добавляли 500 мМ раствор ЭДТА до конечной концентрации 1 мМ и хранили при +4С. Концентрацию белка определяли методом Лоури на спектрофотометре NanoDrop (Thermo). Образец хроматограммы показан на рис.1.

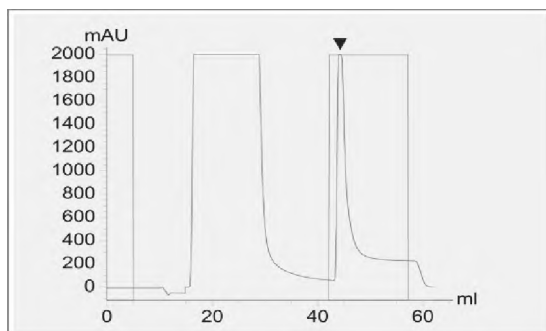


Рис.1. Хроматограмма очистки белка CAV-VP1-VP2. Синим цветом показано поглощение на длине волны 280 нм; ▼ - пик целевого белка.

Рефолдинг очищенного белка проводили методом разбавления. Буфер для рефолдинга охлаждали до +4С. Далее, раствор очищенного белка вносили в охлаждённый буфер для рефолдинга до конечной концентрации белка равной 100 мкг/мл, перемешивали и инкубировали в течение 12 часов при +4 °С. Далее, раствор диализовали против буфера для рефолдинга в течение 12 часов при +4С и центрифугировали при +4С в течение 20 минут с ускорением 13000g. Супернатант, содержащий рефолдированный белок, фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0.45 мкм (Sartorius). Чистоту препарата определяли методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле с последующей денситометрией на аппарате ChemiDoc MP (Bio-Rad). Далее, очищенный белок концентрировали в 10 раз при помощи центрифужного концентратора Vivaspin Turbo 15 (Sartorius). Концентрацию белка в конечном препарате определяли методом Лоури на спектрофотометре NanoDrop (Thermo). Выход белка в растворимой форме определяли по формуле:

$$R\% = ((C_r * V_r) / (C * V)) * 100,$$

где:

R% - выход растворимого белка; C - концентрация белка до рефолдинга; V - объем белка до рефолдинга; C<sub>r</sub> - концентрация белка после рефолдинга; V<sub>r</sub> - объем белка после рефолдинга.

В таблице 1 показаны данные, полученные при подборе состава буфера для рефолдинга.

Таблица 1 - Выход растворимого белка при рефолдинге в испытываемые буферы для рефолдинга

	Испытуемый буфер для рефолдинга	R%
1	5 мМ фосфат натрия, pH = 7.80	< 5 %
2	5 мМ фосфат натрия, pH = 7.80 + 0.1% Tween 20	11 %
3	5 мМ фосфат натрия, pH = 7.80 + 0.02% Brij35	27 %
4	5 мМ фосфат натрия, pH = 7.80 + 1 М L-аргинин	18 %
5	5 мМ ацетат натрия, pH = 5.00	< 5 %
6	5 мМ ацетат натрия, pH = 5.00 + 0.5 М трегалоза	< 5 %
7	20 мМ Трис-гидрохлорид, pH = 8.80	< 5 %
8	20 мМ Трис-гидрохлорид, pH = 8.80 + 20% глицерин	< 5 %
9	20 мМ Трис-гидрохлорид, pH = 8.80 + 20% маннитол	< 5 %
10	20 мМ HEPES, pH = 7.00	< 5 %
11	20 мМ HEPES, pH = 7.00 + 200 мМ мочевины	12 %
12	20 мМ HEPES, pH = 7.00 + 1 М L-аргинин	18 %

В ходе эксперимента по подбору состава буфера для рефолдинга было установлено, что максимальный выход растворимого белка - порядка 25% - достигается при использовании 5 мМ фосфатный буфера, содержащего 0.02% Brij-35 при pH 7.80. В указанных условиях с 500 мл культуры штамма-продуцента было получено 1.3 мг белка SAV-VP1-VP2 в концентрации 600 мкг/мл.

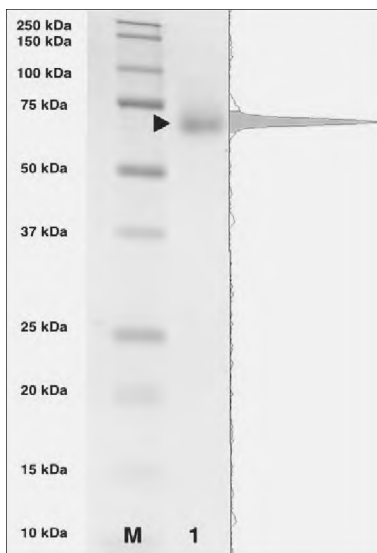


Рис.2. Электрофореграмма и денситограмма препарата CAV-VP1-VP2. М - маркеры молекулярного веса; 1 - препарат CAV-VP1-VP2. ► - бэнд целевого белка.

Таким образом, приведенные данные показали, что с помощью вышеописанного метода максимальный выход растворимого белка - порядка 25% - достигается при использовании 5 мМ фосфатный буфера, содержащего 0.02% Вrij-35 при рН 7.80. В указанных условиях с 500 мл культуры штамма-производителя было получено 1.3 мг белка CAV-VP1-VP2 в концентрации 600 мкг/мл.

### Литература

- 1.Алиев А.С. и др. Патогенность изолятов вируса инфекционной анемии цыплят. Ветеринария. – 2015. – 5. - С. 20 - 26.
- 2.Грудинин М.П. и др. Получение и характеристика рекомбинантного белка VP1 вируса инфекционной анемии цыплят //Ветеринария. – 2018. - 8. – С.34-41.
- 3.Koch G. et al. Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. Vaccine. – 1995. – 13. – P.763 -770.
- 4.Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. – 1970. - P. 680 - 685. doi :10.1038/227680a0.
- 5.Lee M.S., Lien YY, Feng S.H., Huang R.L., Tsai M.C., Chang W.T., Chen H.J. Production of chicken anemia virus (CAV) VP1 and VP2 protein expressed by recombinant Escherichia coli. Process Biochem. - 2009. - 44. - P.390 - 395.
- 6.Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with the Fooling Phenol Reagent //J. Biol. Chem. - 1951. -193. – P.265 - 275.
- 7.Noteborn M., Verschuieren C., Koch G., Van der Eb A. Simultaneous expression of re-

combinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope //J. Gen. Virol. – 1998. – 79. – P.3073 - 3077.

8.Pallister R.J., Fahey K.J., Sheppard M. Cloning and sequencing of the chicken anemia virus (CAV) ORF- 3 gene, and the development of an ELISA for the detection of serum antibody to CAV//Veterinary Microbiology. – 1994. – 39. – P.167 - 178.

9.Pringle C.R. Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology. Sydney, Australia //Archives of Virology. – 1999. – 144. – P.2065 - 2070.

10.Renshaw R.W., Soine C., Weinkle T, O'Connell PH., Ohashi K., Watson S., Lucio B., Harrington S., Schat K.A. A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture //J. Virol. – 1996. – 70. – P.8872 - 8878.

DOI 10.47804/978-5-89904-028-3\_2020\_157

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ ИММУНИЗИРУЮЩЕЙ ДОЗЫ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНТЕРИТОВ ТЕЛЯТ

<sup>1</sup>П.А.Красочко, <sup>1</sup>Я.П.Яромчик, <sup>1</sup>П.П.Красочко, <sup>2</sup>В.И.Еремец,  
<sup>2</sup>Е.Э.Школьников, <sup>2</sup>И.В. Павленко

<sup>1</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», Витебск, Республика Беларусь  
e-mail: krasochko@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»,  
Щелково, Московской обл.  
e-mail:vnitibp@mail.ru

**Резюме.** Оптимальная доза для вирусов инфекционного ринорахеита, вирусной диареи, рота-, и коронавируса с инфекционным титром от 5,5 до 7,0 lg ТЦД<sub>50/см<sup>3</sup></sub>, составил при проведении иммунизации коров объеме 5,0 см<sup>3</sup>. Для каждого бактериального штамма E.coli K99, K88, A20 и S. dublin и S. enteritidis, оптимальная доза составляет 2,5 млрд. бактериальных тел в 1,0 см<sup>3</sup>.

**Summary.** The optimum dose for virus antigens with infectious titres from 5,5–6,5 lg TCI<sub>50/sm<sup>3</sup></sub> for cows forms 5,0 sm<sup>3</sup>. The optimum dose for each bacterial strains E.coli F4, F5, Att25 and S. dublin, S. enteritidis forms 2,5 milliard bacterial cells in 1,0 sm<sup>3</sup>.

**Ключевые слова:** вакцина, инфекционный ринорахеит, вирусная диарея, ротавирусы, коронавирусы, эшерихии, сальмонеллы.