

Список использованной литературы

1. Красочко, П. А. *Продукты пчеловодства : свойства, получение, применение* / П. А. Красочко, Н. Г. Еремия. – Кишинэу; Витебск : Без издательства, 2022. – 723 с. – ISBN 978-9975-164-76-4. – EDN IYWZEE.
2. Красочко, П. А. *Технология продуктов пчеловодства и их применение : Учебник для вузов* / П. А. Красочко, Н. Г. Еремия. – Санкт-Петербург : Издательство "Лань", 2022. – 660 с. – ISBN 978-5-8114-8533-8. – EDN RHDZOS.
3. Макарова, В.Г. *Иммунобиологическое действие меда, пыльцы и прополиса* / В.Г.Макарова, М.В. Семенченко, Е.Н. Якушева// Пчеловодство. – 1998. - №5. – С. 52-53
4. Чага и ее биоактивные комплексы: история и перспективы /И.В. Змитрович [и др.], // *Формулы фармации*, 2020, 2(2), 84-93.
5. *Химические и медико-биологические свойства чаги (обзор)* / Шашкина М. Я., Шашкин П. Н., Сергеев А. В. // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2006. – Т. 40. – №. 10. – С. 37-44.

УДК 577.217 + 615.28

РАСТВОРИМОСТЬ ФЬЮЖН-ФОРМЫ МОДИФИЦИРОВАННОГО БЕЛКА E2 ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Пластинина О.В., Сауткина Н.В., Прокулевич В.А., Крюкова К.А.

Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь.

Аннотация. Целью данной работы являлось использование стратегии слияния генов для повышения растворимости целевого рекомбинантного белка. Ген модифицированного белка E2 вируса диареи крупного рогатого скота (BVDV) сливали с углевод-связывающим модулем термофильных бактерий *Thermatoga maritima*. Полученную конструкцию экспрессировали в клетках *E. coli* и определяли растворимость целевого белка. Выведение белка E2 из нерастворимой фракции телец включения позволит удешевить и облегчить производство субъединичной вакцины против BVDV.

Ключевые слова. Вирусная диарея КРС, белок E2, фьюжн-белок, углевод-связывающий модуль, СВМ, вакцина.

SOLUBILITY OF THE FUSION FORM OF THE MODIFIED PROTEIN E2 OF THE BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

Plastinina O.V., Sautkina N.V., Prakulevich U.A., Kryukova K.A.

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

UO "Vitebsk Order" Badge of Honor "State Academy of Veterinary Medicine,"

Vitebsk, Republic of Belarus

Abstract. *The aim of this work was to use a strategy of genes fusion to increase the solubility of the target protein. The gene coding the modified protein E2 of the bovine viral diarrhea virus (BVDV) was merged with the gene coding carbohydrate-binding module of thermophilic bacteria *Thermatoga maritima*. The resulting construct was expressed in *E. coli* cells and the solubility of the target protein was determined. The removal of the E2 protein from the insoluble fraction of inclusion bodies will reduce the cost and facilitate the production of a subunit vaccine against BVDV.*

Keywords. *Bovine viral diarrhea virus, protein E2, fusion protein, carbohydrate-binding module, CBMT, vaccine.*

Введение. Вирусная диарея крупного рогатого скота (Bovine Viral Diarrhoea Virus, BVDV) является одним из основных источников экономических потерь молочно-товарных ферм Беларуси. Заболевание вызывает группа вирусов BVDV, принадлежащих к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Контроль распространения вируса обеспечивается вакцинацией животных и удалением из стада персистентно инфицированных особей. Одним из наиболее безопасных вариантов вакцинации является использование субъединичных вакцин, содержащих антигенные белки вирусов. В случае BVDV действие нейтрализующих антител зараженных животных направлено на иммуногенный гликопротеин E2 внешней оболочки вируса.

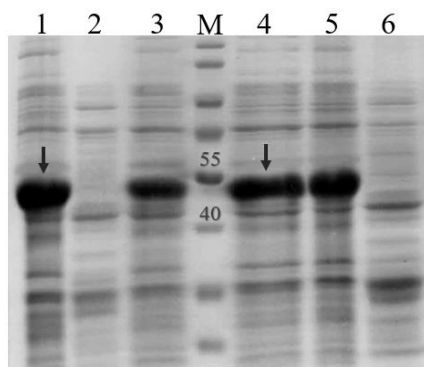
Проведенные ранее исследования показали, что полноразмерный рекомбинантный белок E2 в процессе биосинтеза накапливается в клетках *E. coli* в нерастворимом виде [1]. Основной причиной этому может служить большое количество (до 9) дисульфидных (Cys-Cys) связей в структуре белка E2 и гидрофобные взаимодействия участков белков. Однако модификация гена, кодирующего белок E2, путем его укорачивания до последовательности, кодирующей два первых эпитопных N-концевых домена (модифицированный ген обозначили как *dadb*), с потерей 9 остатков цистеина на C-конце рекомбинантного белка, не привела к накоплению в бактериальных клетках

укороченной формы белка, обозначенного как DADB, в растворимой форме. Температурный фактор также не оказал воздействие на форму белка DADB: нерастворимая форма обнаруживается в бактериях независимо от того проводится культивирование и индукция экспрессии гена при температурах 37 °С или 20 °С. Одной из стратегий получения в клетках бактерий правильно фолдированных белков является слияние целевого белка с фьюжн-партнёром и получение химерного белка. Таким фьюжн-партнёром может выступать растворимый углевод-связывающий модуль CBM9–2 термофильных бактерий *Thermatoga maritima* (CBMT).

Целью данной работы являлось клонирование и экспрессия гибридного гена *cbmt-dadb*, состоящего из гена *dadb*, объединенного с углевод-связывающим модулем *cbmt*.

Материалы и методы исследований. Для создания фьюжн-конструкции использовали нуклеотидную последовательность *cbmt* и плазмиду pDADB, содержащую ген *dadb* в составе плазмиды pET-24b(+) (Novagen). Конструирование рекомбинантной плазмиды с последующим ее клонированием в клетках штамма *E. coli* XL1-Blue выполняли по стандартным методикам [2]. ПЦР и рестрикцию проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя ферментов («Thermo Fisher Scientific Inc.»). Индукцию экспрессии генов в составе вектора pET-24b(+) осуществляли согласно протоколу, предложенному производителем плазмид серии pET [3]. Электрофоретический анализ проводили по методу Лэммли [4] в 16 % полиакриламидных гелях (ПААГ), которые затем окрашивали раствором Кумасси синего R-250.

Результаты исследований. Для получения гибридных генов нуклеотидную последовательность *cbmt* по сайту рестрикции NdeI встраивали в плазмиду pDADB. Рекомбинантные плазмиды на наличие вставки проверяли ПЦР-анализом. Поскольку последовательность *cbmt* клонировали по одному сайту рестрикции, проводили ПЦР-анализ и рестрикционный анализ для проверки правильности ориентации вставки. Далее сконструированными плазмидами трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3) и осуществляли индукцию экспрессии гена при 37 °С и 20 °С. В результате зафиксировали наличие в клетках продукта, по массе соответствующего целевому белку CBMT-DADB, который продуцируется в нерастворимой форме (рисунок 1).



1 – осадок клеточного лизата (37 °С), 2 – надосадок клеточного лизата (37 °С), 3 – клетки *E. coli* BL21 (DE3) pCBMT-DADBHis после индукции при 37 °С, 4 – клетки *E. coli* BL21 (DE3) pCBMT-DADBHis после индукции при 20 °С, 5 – осадок клеточного лизата (20 °С), 6 – надосадок клеточного лизата (20 °С). М – маркер молекулярного веса PageRuler Prestained Protein Ladder (10-180) («Thermo Fisher Scientific Inc»). Стрелками указаны целевые белки, находящиеся в осадке, цифры на маркере обозначают массу в кДа

Рисунок 1 – Электрофоретический анализ клеточных лизатов штамма *E. coli* BL21 (DE3) pCBMT-DADB

Заключение. Таким образом установлено, что слияние целевого белка DADB с фьюжн-партнёром CBMT, так же, как и снижение числа дисульфидных мостиков в белке и температуры при культивировании продуцента не приводят к правильному фолдингу белка DADB при накоплении в бактериях.

Список использованной литературы

1. *Экспрессия белка капсидной оболочки вируса диареи крупного рогатого скота в бактериальных клетках/ Н.В. Сауткина [и др.] // Тез. докл. Междунар. науч.-практ. конф. «Биотехнологии микроорганизмов» / г. Минск, БГУ; редкол.: В.А Прокулевич (председ.) [и др.]. – Минск, 2019. – 188–191.*
2. *Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – Москва: Мир, 1984. – 480 с.*
3. *pET Manual system [Electronic resource]. – Mode of access: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf. – Date of access: 10.07.2023.*
4. *Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature (Lond.). – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.*