

витаминовых добавок (БМВД) в свиноводстве / В.С. Шурхай // Значение научных студенческих кружков в инновационном развитии агропромышленного комплекса региона. Сборник научных тезисов студентов. / В.С. Шурхай. – п. Молодежный, 2023. – С. 557–558.

УДК 619:616.98:635.5

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ VP 1 И VP 2 ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЦЫПЛЯТ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Красочко И.А., Жук Д.Л.

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

*Оптимизация последовательности фрагмента гена VP1 и VP2, хроматографическую очистку белка CAV-VP1-VP2 проводили методом металл-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях с последующим рефолдингом. **Ключевые слова:** инфекционная анемия цыплят, экспрессия генов, рекомбинантный белок VP1 и VP2*

PRODUCTION CHICKEN INFECTIOUS ANEMIA VIRUS RECOMBINANT PROTEINS FOR THE DESIGN OF DIAGNOSTIC TEST SYSTEMS.

Krasochko I.A., Zhuk D.L.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

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]

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 (плазмида, 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].

Материалы и методы исследований. Для получения телец включений 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 +4С 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 СAV-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).

Результаты исследований. 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 +4С. Далее, раствор диализовали против буфера для рефолдинга в течение 12 часов при +4С и центрифугировали при +4С в течение 20 минут с ускорением 13000 g. 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_r - концентрация белка после рефолдинга; V_r - объем белка после рефолдинга.

Заключение. 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 CAV-VP1-VP2 в концентрации 600 мкг/мл.

Литература. 1. Алиев А.С. и др. Патогенность изолятов вируса инфекционной анемии цыплят. *Ветеринария*. 2015; 5:20 - 26. 2. Грудинин М.П. и др. Получение и характеристика рекомбинантного белка VP1 вируса инфекционной анемии цыплят. *Ветеринария*. 2018; 8:34-41. 3. Koch G. et al. Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. *Vaccine*. 1995; 13:763 -770. 4. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680 - 685. 5. Lee M.S., Lien YY, Feng S.H., Huang R.L., Tsai M.C., Chang W.T., Chen H.J. Production of chicken anaemia virus (CAV) VP1 and VP2 protein expressed by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem*. 2009; 44:390 - 395. 6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with the Folling Phenol Reagent. *J. Biol. Chem*. 1951; 193:265 - 275. 7. Noteborn M., Verschueren C., Koch G., Van der Eb A. Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken

anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. J. Gen. Virol. 1998; 79:3073 - 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; 39:167 - 178. 9. Pringle C.R. Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology. Sydney, Australia. Archives of Virology. 1999; 144:2065 - 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; 70:8872 - 8878.

УДК 619/23

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧНОСТИ АКТИНОБАЦИЛЛЯРНОЙ ПНЕВМОНИИ У СВИНЕЙ

***Красочко И .А., **Пулиш А.В**

***УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь**

****ЗАО «Консул»**

*Цель исследования - изучение эффективности вакцин против актинобациллярной плевропневмонии, применяемых в Республике Беларусь. Вакцинация свиней против актинобациллярной плевропневмонии позволила получить положительную динамику в реализации откормочного поголовья. Если за 2022 год было реализовано 14 978 голов, общим весом 1 635,9 тонны, то в 2023 году реализация откормочного составила 18 354 головы, общим весом 1 992,5 тонны, что выше предыдущего года на 18,4% и 17,9% соответственно. Это мероприятие позволило повысить эффективность выращивания откормочного молодняка и получения количества реализованных голов на убой (+3376 голов) в прежних весовых кондициях но в более раннем возрасте. **Ключевые слова:** вакцина, актинобациллярная плевропневмония, откорм, эффективность.*

ANALYSIS OF EFFICACY OF ACTINOBACILLARY PNEUMONIA SPECIFICITY AGENTS IN PIGS.

***Krayochko I.A., **Pulish A.V.**

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

****ZAO "Consul"**

The purpose of the study is to study the effectiveness of vaccines against actinobacillary pleuropneumonia used in the Republic of Belarus. Vaccination of pigs against actinobacillary pleuropneumonia made it possible to obtain positive