

дыхание. В первый день рвотных позывов и самой рвоты не наблюдалось, а к концу второго дня отмечали кратковременные рвотные позывы. В обратном направлении препарат задавался однократно, т.к. значительных по времени (более 1 часа) остановок не делалось. У животного признаки кинетоза со рвотой появились через 16 часов движения.

У четырех животных (двоим собакам препарат задавался двукратно при движении туда и обратно с интервалом 16 и 60 дней) никаких симптомов кинетоза, в т.ч. и рвоты, не наблюдалось.

У семи собак (двоим собакам препарат задавался двукратно при движении туда и обратно с интервалом 7 и 30 дней) при всех поездках обнаруживали признаки синдрома укачивания (гиперсаливацию, периодические беспокойство, поскуливание и дрожь). Позывов к рвоте и самой рвоты не наблюдалось, а после поездки поведение животных восстановилось в течение 3-6 часов в шести из девяти случаев приема препарата. Наблюдаемые позывы к рвоте и сама рвота носили кратковременный характер, а поведение животных также восстановилось в течение 3-6 часов после окончания поездки.

Заключение. Среднесмертельная доза (LD₅₀) при однократном пероральном введении препарата, представляющего собой таблетки для внутреннего применения, белым лабораторным мышам составила 3960,625 мг/кг. Таким образом, по классификации ГОСТ 12.1.007-76 относится к 3 классу опасности – вещества умеренно опасные (LD₅₀ от 151 до 5000 мг/кг). Среднесмертельная доза (LD₅₀) при однократном пероральном введении препарата, представляющего собой раствор для инъекций, белым лабораторным мышам составила 20000,0 мг/кг, при однократном подкожном введении составила 6622,0 мг/кг. Таким образом, можно сделать вывод о том, что по классификации ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4 классу опасности – вещества малоопасные (LD₅₀ более 5000 мг/кг).

Результаты клинических исследований позволяют заключить, что ветеринарный препарат можно применять как противорвотное средство в схемах лечения собак, больных гастроэнтеритом, так как по эффективности не уступает ветеринарному препарату «Маропиталь», а также обладает выраженным противорвотным действием при синдроме укачивания у собак.

Литература.

1. Державец, Е. Д. Эффективность маропекса для профилактики рвоты у собак при синдроме укачивания / Е. Д. Державец ; науч. рук. : В. В. Петров, Е. В. Романова // Студенты – науке и практике АПК : материалы 110-й Международной научно-практической конференции студентов и магистрантов, Витебск, 30 мая 2025 г. : в 2 частях / УО ВГАВМ ; редкол. : О. С. Горлова (гл. ред.) [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2025.

2. Джонс, Л. М. Ветеринарная фармакология и терапия / Пер. с англ./ В двух томах. Том 1. Фармакология. – Москва : Колос, 1971. – 488 с.

3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев [и др.] ; под ред. Р. У. Хабриева. – Москва : ЗАО ИИА «Медицина», 2005. – 892 с.

4. Петров, В. В. Сравнительная токсикологическая оценка ветеринарных препаратов на основе маропитанта в зависимости от лекарственной формы / В. В. Петров, Е. В. Романова, К. Р. Дятлов // Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии : материалы VI Международного конгресса / редкол. : А. М. Лунегов, Н. Л. Андреева, О. С. Попова [и др.]. – Санкт-Петербург : Изд-во ЛЕМА, 2024. – С. 107-109.

5. Пламб, Дональд К. Фармакологические препараты в ветеринарной медицине / Пер. с англ. / В двух томах. Том 1. (А-Н). – Москва : Издательство «Аквариум», 2019. – 1040 с.

Поступила в редакцию 31.03.2026.

УДК 579.66:579.62

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО Т- И В-КЛЕТОЧНЫЕ ЭПИТОПЫ БЫЧЬЕГО КОРОНАВИРУСА

Петруша Я.В., Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

*Синтезирован ген с, кодирующий полиэпитопный вакцинный белок против бычьего коронавируса, включивший 4 Т-хелперных, 4 Т-киллерных и два В-клеточных эпитопа, предположительно обуславливающих формирование вирусспецифической клеточной и нейтрализующей защиты крупного рогатого скота. Синтетический ген введен в вектор pET24a и проверен секвенированием, полимеразной цепной реакцией (ПЦР), рестрикционным анализом. Результаты тестовой экспрессии указывают на то, что созданная конструкция может быть использована для синтеза полиэпитопного белка-антигена в бактериальных клетках штамма E. coli BL-21 (DE3). **Ключевые слова:** Bovine coronavirus, коронавирус, синтетический ген, В- и Т-клеточные эпитопы, полиэпитопный рекомбинантный белок, E. coli, экспрессия.*

BACTERIAL EXPRESSION OF SYNTHETIC GENE CODING FOR PROTEIN WITH BOVINE CORONAVIRUS T- AND B-CELL EPITOPES

Piatrusha Y.V., Prokulevich V.A.

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Gene c, coding for polyepitope vaccine protein against bovine coronavirus, was synthesized. The protein includes 4 T-helper, 4 T-killer and 2 B-cell epitopes, which are supposed to stimulate virus-specific cellular and neutralizing protection in cattle. The synthetic gene was inserted into pET24a vector and verified by sequencing, polymerase chain reaction (PCR), restriction analysis. Results of test expression indicate that this construct can be used to synthesize polyepitope protein in E. coli BL-21 (DE3)-cells. Keywords: Bovine coronavirus, coronavirus, synthetic protein, B- and T-cell epitopes, polyepitope recombinant protein, E. coli, expression.

Введение. Бычий коронавирус (Bovine coronavirus, BCoV) является причиной диареи и/или респираторных заболеваний телят [1–3]. Диарея и сопутствующие инфекции вызывают ослабление животных, замедление их развития и интенсивности роста [4, 5], что приводит к снижению экономической эффективности скотоводства.

Для защиты от коронавирусной инфекции необходимо разрабатывать новые профилактические и лечебные препараты. К новым разновидностям иммуногенов относятся полиэпитопные (мультиэпитопные) белки, представленные набором пептидных эпитопов, связанных между собой линкерами (группами повторяющихся аминокислот) [6]. Пептидные эпитопы играют центральную роль в формировании приобретенного (специфического) иммунитета. При иммунизации важно запустить два основных типа иммунного ответа – гуморальный, или нейтрализующий (выработка антител В-лимфоцитами против зрелых вирусных частиц во внеклеточной среде), и клеточный (уничтожение инфицированных клеток Т-киллерами). Преимущества вакцин, основанных на полиэпитопных белках, заключаются в возможности более точного контроля иммунологической реакции с нацеливанием на эволюционно законсервированные или важные для функционирования патогена участки. Такие молекулярные совокупности антигенов позволяют быстро проектировать и получать новые вакцинные белки, безопасные для вакцинируемых животных и рабочего персонала. При включении в состав полиэпитопного белка фрагментов из разных серотипов или видов патогенов можно конструировать поливалентные вакцины.

Разработанная *in silico* схема ДНК гена *c*, кодирующего белок с пептидными эпитопами бычьего коронавируса (получившего название PolyE_BCoV) для иммунизации телят, в составе экспрессионного вектора предложена ранее [7]. В статье представлены результаты перехода от виртуальной модели синтетического гена *c* к его реальному биологическому образцу в составе вектора pET24a, обуславливающему биосинтез белка PolyE_BCoV в экспрессионном штамме *E. coli* BL-21 (DE3).

Материалы и методы исследований. Ген, кодирующий белок PolyE_BCoV (обозначен как ген *c*), синтезирован методом Сэнгера компанией Evrogen (Россия) согласно схеме по [7]. Ген *c* вводили в вектор pET24a (Novagen). Вектор pET24b без гена *c* брали в качестве контроля. Схему гена внутри плазмиды генерировали программой SnapGene.

Клонирование плазмиды в бактериальные клетки осуществляли методом кальциевой трансформации [8, с. 139–141]. Клетки бактериального штамма *E. coli* BL-21 (DE3) использовали для экспрессии синтезированного гена. Для получения в экспериментах достаточного количества плазмидной ДНК плазмиды поддерживали в штамме *E. coli* XL-1 Blue. Оба штамма взяты из коллекции НИЛ Биотехнологии.

Выделение плазмидной ДНК из клеток проводили по протоколу QIAprep® Spin Miniprep Kit. ПЦР с ДНК, извлеченной кипячением из бактериальных клеток, проводили с использованием T7 праймеров векторов серии pET и полимеразой Phusion от компании Thermo Fisher Scientific. При рестрикции ДНК использовали реактивы от Thermo Fisher Scientific. Молекулярные массы полученных фрагментов ДНК после ПЦР и рестрикции выявляли при помощи электрофореза в 1 %-ном агарозном геле с маркером GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher).

Клетки бактерий выращивали в среде LB (10 г бактопептона; 5 г дрожжевого экстракта; 10 г NaCl в 1 л воды; pH 6,8) в течение 1 часа 40 минут при 37 °С. Канамицин добавляли в среду до конечной концентрации 30 ед./мл. Изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) добавляли в среду до конечной концентрации 1,0 мМ и проводили экспрессию при 37 °С в течение 1 часа (для содержащего ген *c* штамма) или 3 часов (для штамма pET24b с вектором без гена).

Синтез рекомбинантных белков проверяли сравнением образцов клеточного белка. Отрицательными контролями служили культуры клеток с вектором без гена и до добавления индуктора. Результаты экспрессии анализировали путем электрофореза клеточного белка в полиакриламидном геле (ПААГ) в системе Лэммли [9]. Для определения примерного размера белка в отдельную дорожку загружали белковую лестницу молекулярных масс Prestained Protein Ladder (10–180 kDa) от neoFroxx.

Результаты исследований. Кодировую часть полиэпитопного гена с размером 480 п.н. (расположена между сайтами рестрикции NdeI и EcoRI на рисунке 1), содержащую Т- и В-клеточные эпитопы бычьего коронавируса, синтезировали *in vitro* согласно спроектированной *in silico* последовательности ДНК [7]. В процессе синтеза ДНК для успешной экспрессии рекомбинантного белка учитывали индекс адаптации кодонов CAI (Codon Adaptation Index) в клетках *E. coli*, который составил близкое к оптимальному значение (0,86). В гене нет синонимических повторов ДНК, которые могут нарушать процессы его синтеза и транскрипцию.

Ген с содержит четыре различных по первичной структуре участка размером по 45 п.н. (15 кодонов ДНК, кодирующих по 15 аминокислот), каждый из которых определяет свой тип Т-хелперных эпитопов (обозначены синим цветом на рисунке 1). Т-киллерные эпитопы (обозначены зеленым цветом на рис. 1) также представлены четырьмя уникальными участками размером по 27 п.н. (9 кодонов, 9 аминокислот). Наличие в полиэпитопном белке восьми Т-клеточных эпитопов в теории обеспечивает выявление и уничтожение внутриклеточного вируса. Такое количество и разнообразие Т-клеточных вирусных эпитопов предполагает успех противовирусного лечения посредством индукции специфических Т-клеточных ответов. Кроме того, в состав гена с включены два фрагмента ДНК размером 36 п.н. (12 кодонов, 12 аминокислот) и 66 п.н. (22 кодона, 22 аминокислоты), соответствующие двум эпитопам В-типа, определяющим формирование нейтрализующих антител (обозначены фиолетовым цветом на рисунке 1). Различные по первичной структуре ДНК эпитопы выбраны с учетом того факта, что телята вида *Bos taurus* разных пород могут отличаться между собой реакциями на конкретные эпитопные пептиды, вследствие чего один и тот же эпитоп может проявить иммуногенность в одной особи и не вызывать никакого ответа в другой. Наличие в полиэпитопном белке десяти антигенных последовательностей в значительной степени повышает эффективность противовирусной защиты и придает ему специфические против коронавируса терапевтические свойства. Полноценный целевой белок спроектирован таким образом, что для увеличения иммуногенности Т-хелперные и В-клеточные эпитопы разделяются полилинкерами из аминокислот КК (лизин-лизин), а Т-киллерные эпитопы – аминокислотами ААУ (аланин-аланин-тирозин).

Плазмиду, обозначенную как рЕТ24а+с, получили путем вставки гена с в молекулу ДНК вектора рЕТ24а между сайтами рестрикции NdeI и EcoRI. Ген с вставлен между стандартными для рЕТ-векторов промотором и терминатором фага Т7 (на рисунке 1 обозначены белым цветом). При индукции лактозного оперона ИПТГ либо лактозой сильный промотор бактериофага Т7 должен стимулировать образование белка массой около 17,5 кДа.

Расчеты показывают, что полимеразная цепная реакция (ПЦР) с праймерами Т7F и Т7R (подписаны фиолетовыми буквами, рисунок 1) должна приводить к формированию ампликона размером в 697 п.н., который, помимо кодирующей области, включает область промотора и часть терминатора.

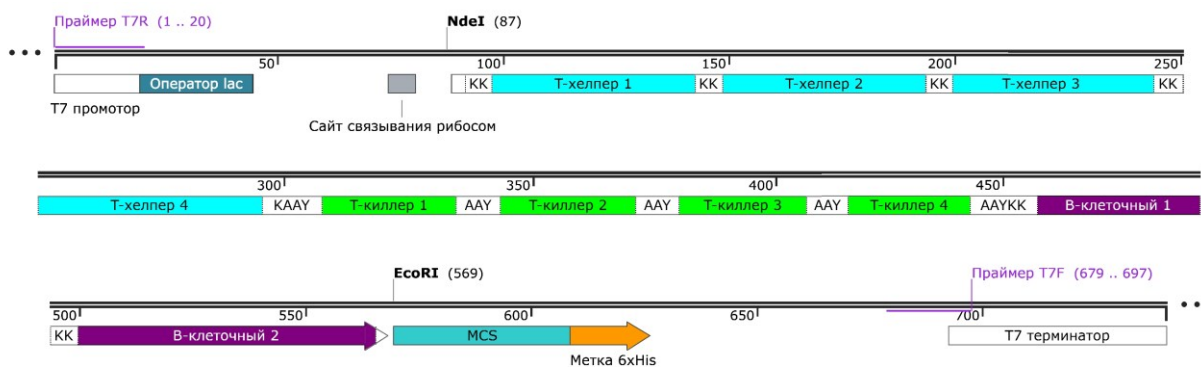


Рисунок 1 – Ген с в составе плазмиды рЕТ24а+с:

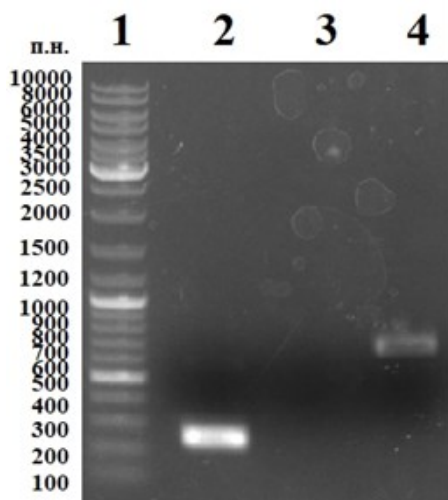
фиолетовыми буквами подписаны праймеры к участку плазмиды с геном;
 КК, ААУ — полилинкеры между эпитопами; MCS – сайт множественного клонирования;
 6xHis – не вошедшая в кодирующую область полигистидиновая метка; многоточия
 на концах указывают на последовательности плазмиды, окружающие ген

Прежде чем использовать синтезированный ген с в составе плазмиды, установили его соответствие ожидаемой нуклеотидной последовательности, так как в процессе синтеза ДНК не исключены ошибки. Секвенированием по методу Сэнгера получили 2 независимых прочтения (сиквенса) ДНК гена с в векторе рЕТ24а (плаزمиды рЕТ24а+с). Сиквенсы полностью совпали с целевой последовательностью гена. Точность распознавания каждого отдельного нуклеотида гена не была ниже 99,9 %.

Плазмиду трансформировали кальциевым методом в клетки экспрессионного штамма *E. coli* BL-21 (DE3) и в клетки штамма *E. coli* XL-1 Blue, приспособленного для длительного хранения

плазмид. Полученные бактериальные штаммы обозначены соответственно как *E. coli* XL-1 Blue рЕТ24а+с и *E. coli* BL-21 (DE3) рЕТ24а+с.

Из клеток экспрессионного штамма *E. coli* BL-21 (DE3) рЕТ24а+с выделили общую ДНК, включающую плазмидную, и провели ее ПЦР-анализ. В результате прошедшей амплификации выявлен близкий к ожидаемому (697 п.н.) размеру фрагмент, соответствующий гену *s* (линия 4, рисунок 2).



Линия 1: лестница молекулярных масс ДНК.

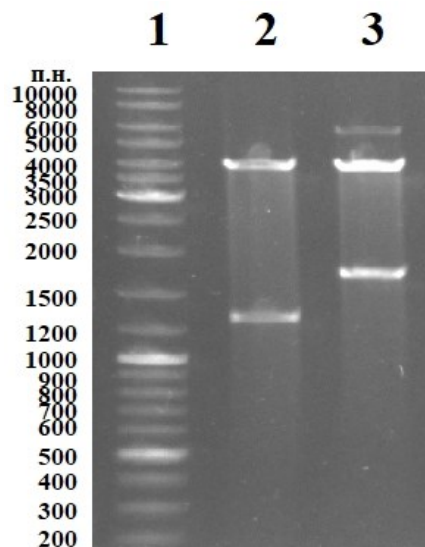
Линия 2: положительный контроль – область с T7 промотором и терминатором из вектора рЕТ24b.

Линия 3: отрицательный контроль – смесь для ПЦР без ДНК.

Линия 4: продукт амплификации области, включающей ген *s*, из плазмиды рЕТ24а+с

Рисунок 2 – Результаты ПЦР с общей ДНК, выделенной из клеток штамма *E. coli* BL-21 (DE3) рЕТ24а+с

С выделенной из клеток штамма *E. coli* XL-1 Blue плазмидной ДНК провели рестрикционный анализ в качестве дополнительного этапа проверки. Рестрикция ДНК плазмиды рЕТ24а+с по сайтам *Sma*I и *Nde*I привела к формированию двух фрагментов: один составил около 4000 п.н., размер другого составил между 1500–2000 п.н. В смеси ДНК выявлена также линеаризованная форма плазмиды, близкая по размерам к 6000 п.н. (линия 3, рисунок 3). Согласно карте плазмиды произвели расчет размеров фрагментов ДНК после рестрикции: 4002 и 1746 п.н. Полученные результаты согласуются с предсказанием, основанным на последовательности рЕТ24а+с. В качестве контроля использовали ДНК близкого по строению вектора рЕТ24b без гена, при разрезании которого образовались ожидаемые фрагменты: один около 4000 п.н., второй между 1200 и 1500 п.н. (линия 2, рисунок 3).



Линия 1: лестница молекулярных масс ДНК.

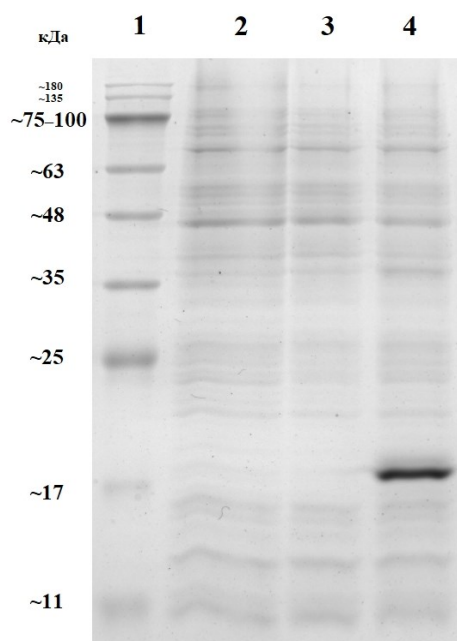
Линия 2: продукты разрезания рЕТ24b близкого по строению к исходному вектору рЕТ24а.

Линия 3: продукты разрезания рекомбинантной плазмиды рЕТ24а+с

Рисунок 3 – Результаты рестрикции плазмидной ДНК рестриктазами *Sma*I и *Nde*I.

Таким образом, результаты секвенирования, ПЦР-анализа и рестрикции ДНК указывают на то, что в составе рекомбинантной плазмиды рЕТ24а+с находится полноценный ген *s* белка PolyE_VCoV с B- и T-клеточными эпитопами бычьего коронавируса, локализованный между промотором и терминатором фага T7.

Экспрессию гена *s* в составе вектора рЕТ24а осуществили в клетках штамма *E. coli* BL-21 (DE3). Белковый электрофорез лизатов клеток штамма *E. coli* BL-21 (DE3) рЕТ24а+с, культивируемых в жидкой питательной среде, показал, что после индукции образовалась хорошо различимая в ПААГ полоска, по размерам близкая к ожидаемому размеру целевого белка – около 17 кДа (линия 4; рис. 4). В культурах штаммов *E. coli* L-21 (DE3) с плазмидой рЕТ24b без гена *s* и *E. coli* BL-21 (DE3) рЕТ24а+с с геном без добавления индуктора не наблюдается накопления белков соответствующей молекулярной массы (линии 2, 3; рисунок 4). Молекулярная масса синтезированного рекомбинантного белка (обозначен как PolyE_VCoV) близка к массе, предсказанной на основании размера последовательности ДНК гена *s*.



Линия 1: лестница молекулярных масс белков.
 Линия 2: белки из клеток штамма с плазмидой рЕТ24а+с до добавления ИПТГ.
 Линия 3: белки из клеток штамма с вектором рЕТ24b без гена после добавления ИПТГ.
 Линия 4: белки из клеток штамма с плазмидой рЕТ24а+с после добавления ИПТГ

Рисунок 4 – Экспрессия белка с эпитопами бычьего коронавируса (PolyE_VCoV)

Рекомбинантная плазида сохранила свойства поликопийности, о чем свидетельствует большое количество целевого (более 20 % от общего) белка (рисунок 4, линия 4).

Заключение. Доказано соответствие синтезированного гена с сконструированной *in silico* последовательности и его расположение под фаговым промотором в плазмиде рЕТ24а. С клонированного гена можно проводить экспрессию искусственного рекомбинантного белка в стандартном экспрессионном штамме *E. coli* BL-21 (DE3) без специальной оптимизации условий культивирования. Ожидается, что полиэпитопный белок, получаемый *in vitro* биотехнологическим способом будет стимулировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ у животных с помощью введенных двух В- и восьми Т-клеточных эпитопов коронавируса. Антигенные свойства полиэпитопного белка будут изучены в условиях *in vivo* на лабораторных и целевых животных после оптимизации условий культивирования.

Литература.

1. Pathology of Neonatal Calf Diarrhea Induced by a Coronavirus-Like Agent / C. A. Mebus, E. L. Stair, M. B. Rhodes, M. J. Twiehaus // *Vet. Pathol.* – 1973. – Vol. 10, № 1. – P. 45–64.
2. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract / M. S. McNulty, D. G. Bryson, G. M. Allan, E. F. Logan // *Veterinary Microbiology.* – 1984. – Vol. 9, № 5. – P. 425–434.
3. Bovine Coronavirus Infects the Respiratory Tract of Cattle Challenged Intranasally / K. R. Soules [et al.] // *Front. Vet. Sci.* – 2022. – Vol. 9 – P. 1–11.
4. Svensson, C. Associations Between Housing, Management, and Morbidity During Rearing and Subsequent First-Lactation Milk Production of Dairy Cows in Southwest Sweden / C. Svensson, J. Hultgren // *Journal of Dairy Science.* – 2008. – Vol. 91, № 4. – P. 1510–1518.
5. The effect of *Cryptosporidium parvum*, rotavirus, and coronavirus infection on the health and performance of male dairy calves / D. L. Renaud, C. Rot, J. Marshall, M. A. Steele // *Journal of Dairy Science.* – 2021. – Vol. 104, № 2. – P. 2151–2163.
6. Advancing peptide-based vaccines against viral pathogens: a narrative review / H. R. Jahantigh [et al.] // *Ther. Adv. Infect. Dis.* – 2026. – Vol. 13 – P. 1–28.
7. Петруша, Я. В. Дизайн рекомбинантного полиэпитопного белка-антигена бычьего коронавируса и ротавируса / Я. В. Петруша, М. И. Потапович, В. А. Прокулевич // *Ветеринарный фармакологический вестник.* – 2025. – № 2. – С. 8–17.
8. Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual* : in 3 vol. / J. Sambrook, D. W. Russell. – 3rd ed. – Cold Spring Harbor, N. Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – Vol. 1 : Molecular cloning – 724 с.
9. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.

Поступила в редакцию 23.03.2026.