

## **ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА КАПСИДА ЦВС-2 НА ОСНОВЕ ШТАММА *E. COLI***

*Белорусский государственный университет, г. Минск*

Цирковиром свиней типа 2 (ЦВС-2) является этиологическим агентом целого ряда заболеваний, объединяемых в научной литературе под общим названием цирковирозные болезни свиней (ЦВБС) [1, 2]. Наиболее серьезным и экономически значимым проявлением ЦВБС является синдром послеотъемного мультисистемного истощения. В периоды эпидемических вспышек инфекций ЦВС-2 смертность в хозяйствах может достигать 50 % [3–5] из-за чрезвычайно высокой летальности данного заболевания [3, 5–7]. В настоящее время инфекции, обусловленные ЦВС-2, присутствуют в каждой стране, связанной со свиноводством, и частота их встречаемости постепенно растет. В связи с этим все большие средства направляются на разработку вакцин и методов диагностики данного вируса.

**Целью** данной работы является создание бактериального продуцента рекомбинантного белка капсида на основе штамма ЦВС-2, циркулирующего в свиноводческих хозяйствах Республики Беларусь.

### **Материалы и методы**

Получение фрагмента генома белорусского штамма ЦВС-2 описывали ранее [8]. Разработку праймеров и расчет основных термодинамических параметров реакции амплификации осуществляли с помощью веб-сервиса Primer3Plus (<http://primer3plus.com>). Ферментативные реакции, в том числе рестрикцию, лигирование, фосфорилирование, дефосфорилирование, обработку фрагментом Кленова и амплификацию проводили в соответствии с инструкциями, предоставленным фирмой-производителем ферментов (Thermo Fisher Scientific Inc.). Для клонирования созданных конструкций

использовали штамм *E. coli* XL1-blue. Для продукции рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 использовали штамм *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL [9].

### Результаты и обсуждение

Системы экспрессии, основанные на векторах серии pET, являются самыми мощными на сегодняшний день инструментами для клонирования и экспрессии рекомбинантных белков в различных штаммах *E. coli*. Данные системы базируются на транскрипционных механизмах бактериофага T7 и являются индуцибельными, позволяя регулировать уровень наработки целевого белка в широком диапазоне.

Для экспериментов по экспрессии белка капсида ЦВС-2 выбрали вектор pET-24b(+), поскольку он содержит самый мощный на сегодняшний день инструмент экспрессии рекомбинантных белков.

Чтобы извлечь открытую рамку трансляции из фрагмента генома ЦВС-2, клонированного ранее [8], использовали метод ПЦР. Для этого, на основании анализа сиквенса клонированного фрагмента, были сконструированы два праймера: F\_NdeI\_PCV2 и R\_XhoI\_PCV2 (табл.).

Параметры разработанных праймеров

Название	Сиквенс 5'→3'	Размер, нт	T <sub>плавл.</sub> , °C	GC, %	Ампликон, п.о.
F_NdeI_PCV2	<b>gtaccat</b> atgacgtatacaaggaggcgt	28	61,5	47,6	~717
R_XhoI_PCV2	ag <b>ctcgag</b> ttaagggttaagtggggggtc	29	62,2	52,4	

Каждый праймер состоял из основной отжигаемой части и небольшой нуклеотидной навески (выделена жирным шрифтом в табл.), содержащей определенный сайт рестрикции (выделен подчеркиванием в табл.) — *NdeI* или *XhoI*. Сайты рестрикции подбирались в соответствии со структурой полилинкера вектора pET-24b(+) и последовательностью амплифицируемой рамки трансляции таким образом, чтобы при лигировании сориентировать вставку в нужном направлении по отношению к промотору фага T7. При проведении ПЦР в качестве матрицы выступал выделенный и очищенный вектор pUC-PCV2, а в ходе реакции образовывался продукт размером ~717 пар оснований (п. о.), который представлял собой, фактически, открытую рамку трансляции гена белка капсида, фланкированную сайтами рестрикции *NdeI* (на 5`конце смысловой цепи) и *XhoI* (на 3`конце смысловой цепи).

Первоначальный план переклонирования предусматривал двойную рестрикцию вектора и амплифицированной вставки с образованием несовместимых липких концов (*NdeI* и *XhoI*) для лигирования в правильной ориентации. Однако в процессе работы выяснилось, что сайт *XhoI* в составе амплифицированного продукта неактивен и не распознается рестриктазой.

В связи с этим был разработан альтернативный двухэтапный вариант получения аналогичной конструкции. На первом этапе разрезанный рестриктазой *XhoI* вектор рЕТ-24b(+) после «затупления» концов фрагментом Кленова лигировался по тупым концам с амплифицированным высокоточной *Pfu* полимеразой фрагментом, содержащим открытую рамку считывания (ОРС) ЦВС-2. Для уменьшения вероятности самолигирования и увеличения доли рекомбинантных молекул вектор рЕТ-24b(+) после «затупления» концов обрабатывался фосфатазой, а продукт амплификации ОРС ЦВС-2, в свою очередь, фосфорилировался с помощью полинуклеотидкиназы. Поскольку вставка могла располагаться в векторе с равной вероятностью в любой ориентации, скрининг клонов после  $Ca^{2+}$ -зависимой трансформации штамма *E. coli* XL1-blue производили путем ПЦР с помощью различных попарных сочетаний четырех праймеров — двух сконструированных при выполнении этапа (табл.) и двух стандартных коммерческих праймеров для секвенирования вставок в векторе рЕТ-24b(+) (T7 Ppromoter и T7 Terminator Primer). Очевидно, что при правильной ориентации вставки продукт амплификации должен появляться при использовании любого прямого праймера (F\_NdeI\_PCV2 или T7\_F) в сочетании с любым обратным (R\_XhoI\_PCV2 или T7\_R), при использовании же только прямых или только обратных праймеров продукт отсутствует и может появляться лишь при неправильной ориентации вставки.

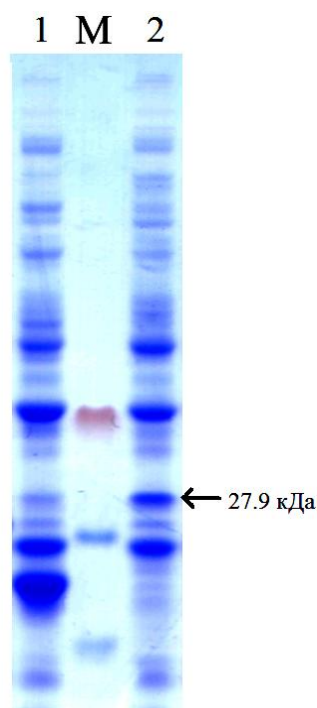


Рис. Результаты экспрессии рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 в штамме *E. coli*: 1 — положительный контроль, рекомбинантный свиной альфа-интерферон (19 кДа); М — маркеры молекулярного веса белков SM1861 (Thermo Fisher Scientific Inc.); 2 — продукция рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 (27,9 кДа)

Из отобранного таким образом положительного клона выделялась векторная ДНК, которая впоследствии обрабатывалась рестриктазой *NdeI* (при этом вырезался фрагмент длиной около 80 п. о., содержащий полилинкер) и после электрофореза и выделения из агарозного геля вектор лигировался сам на себя. В итоге получилась конструкция, аналогичная первоначально запланированному варианту, в котором рекомбинантный вектор лишен полилинкера и открытая рамка трансляции гена белка капсида ЦВС-2 совмещена с регуляторными элементами вектора без дополнительных ненужных аминокислотных остатков и нуклеотидных последовательностей. После  $Ca^{2+}$ -зависимой трансформации штамма *E. coli* BL21-CodonPlus предварительные эксперименты по экспрессии с использованием автоиндукционных сред Стьюдиера показали накопление в клетках продуцента рекомбинантного белка размером 27,9 кДа (рис., на дорожке 2 рекомбинантный продукт обозначен стрелкой).

### Выводы

Таким образом, была создана конструкция для экспрессии в клетках штамма *E. coli* открытой рамки считывания, кодирующей полноразмерный рекомбинантный белок капсида ЦВС-2. Также был получен бактериальный продуцент белка капсида ЦВС-2. Полученные результаты будут использованы для разработки отечественных методов диагностики и профилактики цирковирусных инфекций свиней.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Орлянкин, Б. Г. Цирковирусные болезни свиней / Б. Г. Орлянкин, А. М. Мишин // Свиноводство. 2010. № 5. Р. 50–53.
2. Раев, С. А. Специфическая профилактика цирковирусных болезней свиней : современное состояние и перспективы / С. А. Раев // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2014. № 1. Р. 26–29.
3. *Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds* / A. K. Cheung [et al.] // Arch. Virol. 2007. Vol. 152, N 5. P. 1035–1044.
4. *The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease — 2004–2006* / S. Carman [et al.] // Can. J. Vet. Res. 2008. Vol. 72, N 3. P. 259–268.
5. *Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome* / I. Morozov [et al.] // J. Clin. Microbiol. 1998. Vol. 36, N 9. P. 2535–2541.
6. *Postweaning multisystemic wasting syndrome : epidemiology and clinical presentation* / J. C. S. Harding [et al.] // Swine Heal. Prod. 1998. Vol. 6, N 6. P. 249–254.
7. *Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome* / J. Quintana [et al.] // Vet. Rec. 2001. Vol. 149, N 12. P. 357–361.
8. Кудин, К. В. Клонирование гена белка капсида белорусского штамма цирковируса свиней 2 типа / К. В. Кудин, В. А. Прокулевич // Вестник БГУ. 2011. Vol. 2, N 2. P. 37–41.
9. *BL21-CodonPlus™ cells correct expression problems caused by codon bias* / C. Carstens [et al.] // Strategies. 2001. Vol. 14, N 2. P. 50–52.

*Kudzin K. V., Prakulevich V. A.*

**Development of the *E. coli*-based strain producing the recombinant PCV2 capsid protein**

PCV2 is the most economically important swine pathogen. It has spread everywhere and become endemic in every pig-producing country. We have developed a pET-24b(+)-based construction for expression of the full length open reading frame, coding the capsid protein of the Belarusian strain PCV2. This construction was introduced into the *E. coli* strain and accumulation of the recombinant protein of the molecular weight of 27.9 kDa was observed. Thus, we have developed a bacterial strain capable of producing the recombinant PCV2 capsid protein.