

**СОЗДАНИЕ ГИБРИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛАВНЫХ
АНТИГЕННЫХ ДОМЕНОВ ГЛИКОПРОТЕИНА E2 ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА 2-ГО ТИПА В СОСТАВЕ ФЬЮЖН-БЕЛКОВ В ШТАММАХ
*ESCHERICHIA COLI***

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

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, oksana02plastinina@gmail.com

Вирусная диарея крупного рогатого скота (Bovine Viral Diarrhoea Virus, BVDV) является одной из преобладающих причин смертности и заболеваемости животных. Значительные экономические убытки, складывающиеся из снижения удоя во время болезни, сниженной репродуктивности, падежа зараженного скота, уменьшения количества молодых особей из-за низкой выживаемости и затрат на лечение и профилактику болезни, затрагивают страны всех континентов.

Заболевание вызывает группа вирусов BVDV, принадлежащих к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Контроль распространения вируса обеспечивается удалением из стада персистентно инфицированных животных, формированием уровня биобезопасности хозяйств и вакцинацией животных.

Вирион вируса BVDV представляет собой нуклеокапсид, в котором заключен одноцепочечный РНК-геном. Основным гликопротеином липидной оболочки является белок E2, который можно рассматривать в качестве объекта для создания субъединичной вакцины, т.к. именно на гликопротеин E2 направлено действие нейтрализующих антител зараженных животных.

На данный момент существуют данные по эффективности вакцины, основой для которой стал экспрессированный в клетках млекопитающих усеченный вариант гликопротеина E2 (tE2), в котором отсутствуют 32 аминокислоты трансмембранной области. Полученные результаты показали, что титры серонейтрализующих антител против BVDV, образование которых вызвано субъединичной вакциной, сопоставимы с титрами, требуемыми для удовлетворительной вакцины против BVDV [1].

Ранее в результате клонирования в клетках *E. coli* открытой рамки считывания, кодирующей полноразмерный белок E2 вируса BVDV 2-го типа, было установлено, что белок экспрессируется преимущественно в нерастворимом виде [2]. Причиной этому могут быть содержащиеся в молекуле 17 цистеиновых остатков, образующих внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи,

причем 9 остатков располагаются в доменах В и D [3] (в других источниках эти два домена объединяются в один – домен III [4]). Так как за связывание вируса с мембраной клетки и проникновение в неё отвечают только первые два домена [4], в качестве субъединичной вакцины можно рассматривать усеченный вариант белка E2, содержащий только домены А и В (или домены I и II).

Мы уже провели работу по клонированию оптимизированных для экспрессии в клетках *E. coli* генов *DADB* и *DADBHis*, кодирующих домены А и В гликопротеина E2, в составе вектора pET-24b(+) (Novagen), а также экспрессировали их в клетках штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3), в результате установили, что белки, названные соответственно *DADB* и *DADBHis*, экспрессируются в нерастворимой форме [5].

Для получения в клетках бактерии *E. coli* растворимого и правильно свернутого белка возможно использование технологии слияния генов и получения фьюжн-белков, в которых фьюжн-партнёром может выступать, например, белок малый убиквитин-подобный модификатор (small ubiquitin-related modifier, SUMO) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [6], стабилизирующий и повышающий растворимость фьюжн-партнёров.

Целью данной работы являлось клонирование гибридных генов *SUMO-DADB* и *SUMO-DADBHis*, состоящих из последовательностей, кодирующих главные антигенные домены А и В гликопротеина E2 BVDV 2-ого типа, объединенных с белком малым убиквитин-подобным модификатором.

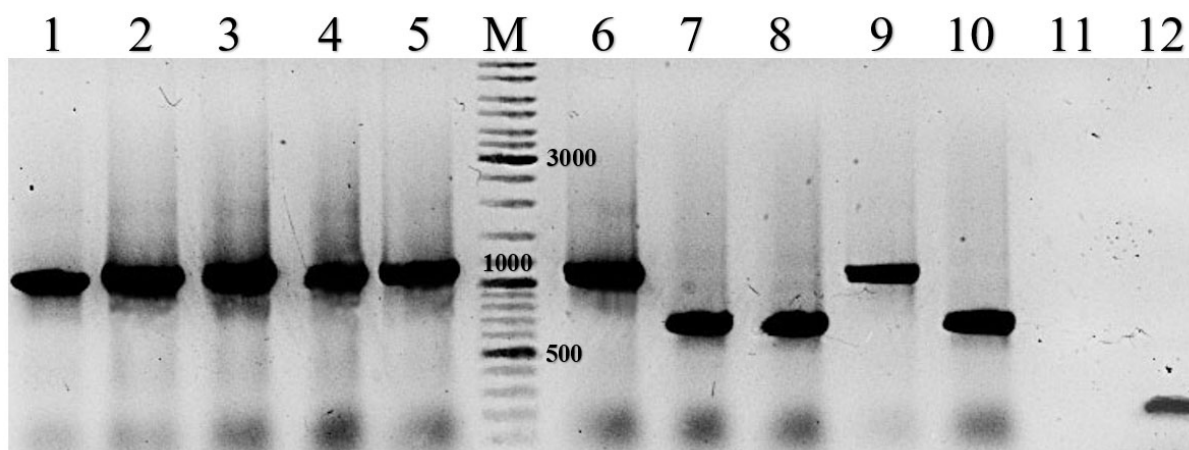
Для получения гибридных генов нуклеотидную последовательность *SUMO* (gBlock) амплифицировали с использованием праймеров PCV 1/2-R и PCV 1-1620, затем клонировали по сайту рестрикции NdeI и встраивали в плазмиды pDADB и pDADBHis. Далее рекомбинантными плазмидами pSUMO-DADB и pSUMO-DADBHis трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-Blue. Полученные клоны трансформантов проверяли на наличие вставки ПЦР-анализом с помощью фланкирующих праймеров T7Promoter и T7Terminator для полилинкерной области плазмиды pET-24b(+). Характеристики использованных праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1. – Характеристики использованных праймеров

Праймер	Последовательность 5'→3'	Размер, п.н.	Температура отжига, °С
PCV 1/2-R	gggacagcagttgaggagtaccat	24	60
PCV 1-1620	tttcggcgccatctgtaacggtttc	25	
T7Promoter	taatacgactcactataggg	20	47
T7Terminator	tatgctagtattgctcag	19	

Результаты электрофореграммы продуктов ПЦР-анализа трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADB и *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADBHis свидетельствовали о наличии 5 положительных клонов из 5 исследованных у трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADB и 2 положительных клонов из 5 исследованных у трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADBHis, т.к. на соответствующих дорожках зафиксировали наличие продукта размером около 1000 п.н. (ожидаемый размер гена *SUMO-DADB* – 1088 п.н., гена *SUMO-DADBHis* – 1077 п.н.) (рисунок 1). Параллельно использовали отрицательный контроль ПЦР, не содержащий матрицы, и пробу, содержащую нативную плазмиду pET-24b(+).

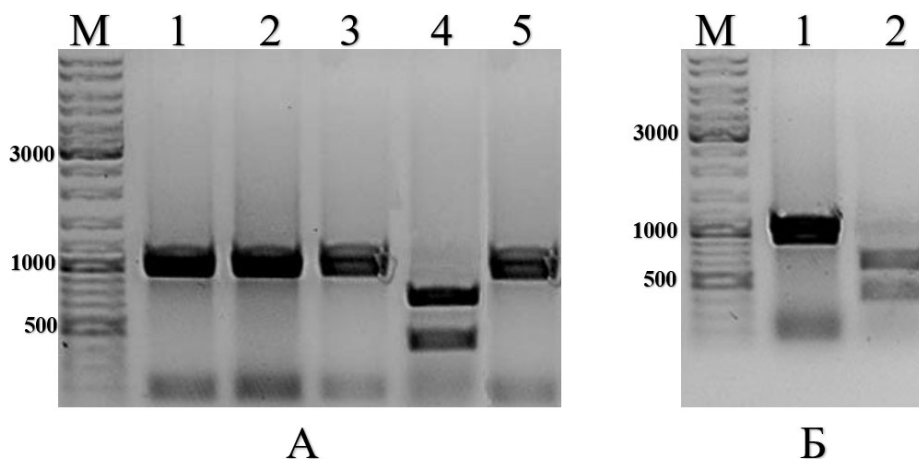
Поскольку последовательность *SUMO* клонировали по одному сайту рестрикции кроме ПЦР-анализа проводили также рестрикционный анализ для проверки правильности ориентации вставки. Для этого ампликоны *SUMO-DADB* и *SUMO-DADBHis* обрабатывали рестриктазой NheI, сайт узнавания которой уникален для гибридных генов. По результатам рестрикционного анализа выявили правильную ориентацию вставки *SUMO* у ампликонов *SUMO-DADB* под номерами 1, 2, 3 и 5 (рисунок 2А) и *SUMO-DADBHis* под номером 1 (рисунок 2Б), т.к. размеры продуктов рестрикции для гена *SUMO-DADB* равны 943 и 145 п.н., а для гена *SUMO-DADBHis* – 932 и 145 п.н.



1-5 – положительные клоны трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADB, 6, 9 – положительные клоны трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADBHis, М – маркер молекулярного веса SM 0333 («Thermo Fisher Scientific Inc.»)

Рисунок 1. – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADB и *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADBHis

При неправильной ориентации вставки *SUMO* у ампликона *SUMO-DADB* под номером 4 (рисунок 2А) и *SUMO-DADBHis* под номером 2 (рисунок 2Б) размеры продуктов рестрикции равны соответственно 682 и 406 п.н., 671 и 406 п.н.



А: 1-5 – ампликоны *SUMO-DADB*, 1-3, 5 – ампликоны с правильной ориентацией вставки.

Б: 1-2 – ампликоны *SUMO-DADBHis*, 1 – ампликон с правильной ориентацией вставки;

М – маркер молекулярного веса SM 0333 («Thermo Fisher Scientific Inc.»)

Рисунок 2. – Электрофореграмма продуктов рестриционного анализа амплифицированных фрагментов *SUMO-DADB* (А) и *SUMO-DADBHis* (Б)

Таким образом, в результате проведенной работы в клетках штамма бактерий *E. coli* XL1-Blue клонированы гибридные конструкции *SUMO-DADB* и *SUMO-DADBHis*, состоящие из генов, кодирующих главные антигенные домены А и В гликопротеина E2 BVDV 2-ого типа, объединенных с белком малым убиквитин-подобным модификатором дрожжей *S. cerevisiae*.

Список использованных источников

1. Safety and efficacy of an E2 glycoprotein subunit vaccine produced in mammalian cells to prevent experimental infection with bovine viral diarrhoea virus in cattle / A. Pecora [et al.] // Vet Res Commun. – 2012. – Vol. 36, No 3. – P. 157–164.

2. 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.

3. Structure of a pestivirus envelope glycoprotein e2 clarifies its role in cell entry / K.El Omari [et al.] // Cell Reports. – 2013. – Vol. 3, No 1. – P. 30–35.

4. Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus / Y. Li [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – Vol. 110, No 17. – P. 6805–6810.

5. Клонирование главных антигенных доменов гликопротеина E2 вируса диареи крупного рогатого скота в клетках *Escherichia coli*: тез. докл. XII Междунар. науч. конф., посвящ. 55-летию Ин-та микробиологии / НАН Беларуси (Минск, 7–11 июня 2021 г.) / орг. ком. конф.: Э.И. Коломиец (председатель) [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2021. – 264 с

6. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins / T. R. Butt [et al.] // Protein Expr. Purif. – 2005. – Vol. 43, No 1. – P. 1–9.