

Получение и анализ продуктов трансляции ДНК-конструкций, несущих гены вируса АЧС CP204L, E183L, EP402L

Научный руководитель – Серeda Алексей Дмитриевич

Иматдинов А.Р.¹, Морозова Д.Ю.¹, Дубровская О.А.¹

1 - Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, Покров, Россия

Африканская чума свиней (АЧС) - вирусная, контагиозная, септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и смертностью до 100%. Контроль над заболеванием осложняет отсутствие вакцин от АЧС. Проблема отягощена недостаточной изученностью функциональных свойств белков вируса АЧС и механизмов формирования специфической защиты. Вероятно, формирование специфической защиты обеспечивается набором белков, которые индуцируют иммунитет, обусловленный как цитотоксическими Т-лимфоцитами, так и антителозависимой клеточной цитотоксичностью.

Исследования по изучению протективных свойств ДНК-конструкций, содержащих в своем составе гены структурных белков, свидетельствуют о критически важной роли р30, р54 и CD2v в формировании защиты от АЧС, что открывает перспективы создания защитных препаратов нового поколения. Цель работы - получение ДНК-конструкций, несущих фрагменты генов вируса АЧС CP204L (р30), E183L (р54), EP402R (CD2v), и подтверждение формирования антигенно активных продуктов трансляции.

Внеклеточные/вневирионные домены белков р30, р54, CD2v, несущие в аминокислотных последовательностях наибольшее количество прогнозируемых В- и Т-клеточных эпитопов были «бесповно» субклонированы с универсальными сигнальными элементами из гетерологических вирусов (вирус парагриппа человека-1 и вируса Сендай). Полученные химерные последовательности были клонированы в плазмидный вектор pCI-neo по сайтам рестрикции NheI/SmaI.

Для исследования созданных конструкций *in vitro* перевиваемую культуру НЕК293Т трансфицировали каждой из рекомбинантных плазмид pCI-neo/ASFV/р30, pCI-neo/ASFV/р54, pCI-neo/ASFV/CD2v. Антигенную активность продуктов трансляции оценивали в динамике в реакции прямой иммунофлуоресценции. Максимальная экспрессия рекомбинантных белков в трансфицированных клетках НЕК-293Т достигала на 3 сутки после трансфекции.

Полипептидную специфичность определяли методом иммуноблоттинга после SDS - PAGE электрофореза лизатов трансфицированных клеток НЕК-293Т. Расчетные молекулярные массы немодифицированных рекомбинантных белков составили: р30 - 21,6 кДа, р54 - 18,7 кДа, CD2v - 28,6 кДа. С использованием панели вирусспецифических (АЧС) и нормальных сывороток крови домашних свиней и дикого кабана было установлено, что молекулярная масса продуктов трансляции pCI-neo/ASFV/р30 составила 21,6 кДа; pCI-neo/ASFV/р54 - 20,9 кДа и 36,3 кДа; pCI-neo/ASFV/CD2v - 39,8 кДа и 63,1 кДа (мажорные), а также - 28,8 и 104,7 кДа (минорные).

Таким образом, получены рекомбинантные ДНК-конструкции, кодирующие фрагменты генов вируса АЧС: EP402R, CP204L, E183L. Определены и охарактеризованы по молекулярной массе продукты их трансляции. Среди полученных антигенноактивных полипептидов одни по размеру соответствовали теоретически рассчитанным, другие - продуктам посттрансляционной модификации рекомбинантных белков.

Работа выполнена в рамках проекта Российского фонда фундаментальных исследований «Создание и исследование иммунобиологических свойств рекомбинантного вируса

африканской чумы свиней, содержащего гены белка CD2v от аттенуированных штаммов, относящихся к двум сероиммунотипам» (18-316-00061).