

М.А. Чиндарева, асп.;
И.С. Казловский, магистр биологических наук;
А.И. Зинченко, чл.-корр., проф., д-р биол. наук
(Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск)

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА БЕЛКА-АНТИГЕНА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота (РСВ КРС) представляет собой РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Paramyxoviridae*. Основными белками-антигенами данного вируса являются гликопротеины F и G (трансмембранные белки, расположенные на поверхности вириона) [1]. Белок слияния F, или фьюжн-белок, играет роль в слиянии вирусной и клеточной мембран. Сначала он синтезируется в белок-предшественник F₀, который затем протеолитически расщепляется на две субъединицы F₁ и F₂, связанных между собой дисульфидными связями, и представляющими активный фьюжн-белок. Наибольшее количество антигенных детерминант расположено в субъединице F₁, что позволяет использовать ее в качестве основы для создания субъединичных вакцин против респираторно-синцитиального вируса КРС [2].

Целью работы являлось получение рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, продуцирующего субъединицу фьюжн-белка респираторно-синцитиального вируса КРС.

Основой для создания целевой плазмиды использовали вектор pET42a(+) (Invitrogen, США), несущий ген резистентности к канамицину, сильный T7-промотор, а также полилинкер с множественными сайтами клонирования. Для клонирования гена *F1*, кодирующего фьюжн-белок и с длиной 1345 п.о., использовали премикс ArtMix-RT (АртБиоТех, Беларусь), позволяющий проводить синтез кДНК с РНК и клонировать целевые гены в одной реакции. Затем проводили линейаризацию вектора pET42a(+) длиной 4976 п.о.. Объединение гена *F1* и линейаризованного вектора pET42a(+) осуществляли методом продолжительной перекрывающейся ПЦР [3]. Трансформацию клеток штамма *E. coli* BL21 (DE3) полученной плазмидой осуществляли методом электропорации. Для подтверждения наличия генетической конструкции, несущей ген *F1* в правильной ориентации, проводили скрининг полученных трансформантов методом ПЦР с использованием праймеров к T7-промотору и целевому гену.

Анализ биосинтеза целевого белка в клетках полученного

штамма *E. coli* BRSV-F1 осуществляли с добавлением в культуральную жидкость индуктора изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида до конечной концентрации 0,5 мМ. Полученную клеточную биомассу разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора и визуализировали при помощи 12 % акриламидного гель-электрофореза. Однако, обнаружить белок F1 не удалось (вероятно, из-за низкой концентрации и наличия фоновых белков). Поэтому было принято решение проанализировать аминокислотную последовательность целевого белка на наличие сигнальных пептидов и его возможную локализацию в клетке. Данный анализ проводили с использованием биоинформатического инструментария SignalP 5.0 («DTU Health Tech», Дания). Результаты указали на возможное наличие в исследуемом белке сигнального пептида, распознающегося системой Sec/SPI (отвечает за транспорт белков в периплазму).

Таким образом, было сделано предположение, что белок F1 может быть локализован в периплазматическом пространстве клеток *E. coli*. Клеточную биомассу рекомбинантного штамма ресуспендировали в лизис-буфере, после охлаждали на льду и центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость наносили на колонку с Ni-NTA агарозой, очищенный белок размером 49 кДа анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле.

В результате был создан штамм *E. coli* BRSV-F1 – продуцент рекомбинантной субъединицы фьюжн-белка респираторно-синцитиального вируса КРС, молекула которой содержит дополнительный октагистидиновый олигопептид на С-конце.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meyer, G. Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development / G. Meyer, M. Deplanche, F. Schelcher // *Compar. Immun., Microbiol. and Infect. Diseases.* – 2008. – Vol. 31, № 2–3. – P. 191–225.
2. Expression in *Escherichia coli* and Purification of Soluble Forms of the F Protein of Bovine Respiratory Syncytial Virus / J. Naval [et al.] // *Prot. Express. and Pur.* – 1997. – Vol. 9, № 2. – P. 288–294.
3. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways // *PloS ONE.* – 2009. – Vol. 4, № 7. – P. 6441–6442.