

УДК 578.224

РАЗРАБОТКА И ПРОВЕРКА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ ТИПА 2

Л. М. КРАВЧЕНКО¹⁾, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ¹⁾, К. В. КУДИН¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Разработан дизайн двух генетических конструкций, которые могут стать основой для создания ДНК-вакцины против цирковируса свиней типа 2. Эти конструкции получены на базе коммерческого плазмидного вектора pVAX1, одна из них содержит полноразмерную природную открытую рамку считывания капсидного белка цирковируса, а вторая – открытую рамку считывания, соответствующую белку без первых тридцати *N*-концевых аминокислот. Для амплификации необходимых фрагментов вирусного белка были разработаны соответствующие праймеры. Экспрессию целевых последовательностей выявляли по наличию капсидного белка вируса в культуре трансфицированных клеток млекопитающих. Предварительная оценка возможности кальций-фосфатной трансфекции перевиваемых клеток эпителия эмбриона свиньи позволила установить нецелесообразность ее использования для дальнейших исследований разработанных генетических конструкций. Результаты экспериментов показали, что белок капсида цирковируса свиней типа 2 присутствует в лизатах трансфицированных клеток в низких количествах, при этом содержание укороченного варианта белка выше, чем нативного.

Ключевые слова: цирковирус; ДНК-вакцина; цирковирус свиней типа 2; интерфероны; кальций-фосфатная трансфекция.

DEVELOPMENT AND VERIFICATION OF THE FUNCTIONING OF GENETIC CONSTRUCTS FOR DNA VACCINE AGAINST PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2

L. M. KRAVCHENKO^a, U. A. PRAKULEVICH^a, K. V. KUDZIN^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: L. M. Kravchenko (lidia_kravchenko@tut.by)

In this research a design of two genetic constructions which may be used for creation of DNA vaccine for porcine circovirus type 2 (PCV-2) was developed. This constructions were derived from commercial plasmid vector pVAX1, one of them contains full-size natural open reading frame of circovirus capsid protein and the second contains an open reading frame corresponding to a protein without the first thirty *N*-terminal amino acids. The appropriate primers for amplification

Образец цитирования:

Кравченко Л. М., Прокулевич В. А., Кудин К. В. Разработка и проверка функционирования генетических конструкций для ДНК-вакцины против цирковируса свиней типа 2 // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 28–37.

For citation:

Kravchenko L. M., Prakulevich U. A., Kudzin K. V. Development and verification of the functioning of genetic constructs for DNA vaccine against porcine circovirus type 2. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 28–37 (in Russ.).

Авторы:

Лидия Михайловна Кравченко – аспирантка кафедры микробиологии биологического факультета. Научный руководитель – В. А. Прокулевич.

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Кирилл Валерьевич Кудин – научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета.

Authors:

Lidia M. Kravchenko, postgraduate student at the department of microbiology, faculty of biology.

lidia_kravchenko@tut.by

Uladzimir A. Prakulevich, doctor of science (biology), full professor; head of the department of microbiology, faculty of biology.

prokulevich@mail.ru

Kiryl V. Kudzin, researcher at the department of microbiology, faculty of biology.

kiryl.kudin@gmail.com

of the necessary viral protein fragments were developed. Expression of the target sequences was detected by the presence of the virus capsid protein in the culture of transfected mammalian cells. Preliminary possibility of calcium-phosphate transfection of the porcine cell line SPEV was assessed. The obtained results showed that this approach is inexpedient for further studies of target genetic constructs. The results of the experiments showed that the circovirus capsid protein is present in the lysates of transfected cells in low amounts, while the content of the truncated variant of the protein is higher than the native one.

Key words: circovirus; DNA vaccine; porcine circovirus type 2; interferons; calcium phosphate transfection.

Введение

Цирковирус свиней типа 2 (ЦВС-2) и ассоциированные с ним синдромы являются причиной огромных экономических потерь свиноводческих хозяйств по всему миру. Данный икосаэдрический безоболочечный вирус диаметром 17–22 нм – представитель семейства *Circoviridae* рода *Circovirus*. Вирусный геном размером 1767 нуклеотидов представлен кольцевой одноцепочечной ДНК, содержащей три открытые рамки считывания (ОРС), которые кодируют белок, обеспечивающий формирование капсидной оболочки вируса, белок, вовлеченный в патогенез вируса, и две формы репликазы [1; 2]. Единственный белок капсида ЦВС-2 состоит из 233 аминокислот и имеет массу 27,8 кДа. Первые 30 аминокислот *N*-концевого домена капсидного белка содержат три tandemных повтора (по 3–4 аргининовых остатка в каждом), причем два из них, ближайших к *N*-концу, кодируют исключительно редкие аргининовые кодоны AGG/AGA/CGG. Белок капсида содержит сигнал ядерной локализации, а благодаря наличию большого количества положительно заряженных остатков аргинина выполняет функцию связывания ДНК-вируса в области начала репликации [3].

Цирковирус свиней типа 2 является серьезной экономической проблемой, наносящей огромные убытки свиноводству по всему миру. Данный патоген обуславливает развитие ряда синдромов и болезней животных, объединенных одним термином – «цирковиральные болезни свиней», которые характеризуются мультисистемным истощением отъемышей, отставанием в росте и развитии, репродуктивной дисфункцией, поражением кожи, развитием респираторного и нефропатического синдромов. Используемые превентивные меры и профилактические препараты не решают проблемы распространения вируса. В настоящее время возбудитель обнаруживается практически в каждом свиноводческом хозяйстве, но степень проявления инфекции сильно зависит от ряда факторов: технологии содержания, микроклимата, наличия других возбудителей бактериальных и вирусных инфекций и т. д. [1; 4].

Несмотря на активные попытки предотвратить распространение ЦВС-2, эффективных профилактических и терапевтических мер против вируса до сих пор не разработано. В связи с этим приоритетным направлением исследований в области фармацевтической ветеринарии выступает создание инновационных иммунобиологических препаратов, в частности ДНК-вакцин. Использование таких вакцин для иммунизации животных является потенциально эффективной мерой в борьбе с ЦВС-2.

Преимущество ДНК-вакцин, по сравнению с вакцинами других типов, состоит в том, что они стимулируют запуск как конститутивных, так и индуцибельных защитных механизмов с участием Т-киллеров, антител и интерферонов, способствуя формированию длительного напряженного иммунитета [5]. В классическом варианте ДНК-вакцины состоят из плазмидных или вирусных векторов, содержащих гены возбудителей инфекционных заболеваний, продукты которых обладают иммуногенными свойствами. После введения ДНК-вакцины в организм животного белок патогена синтезируется в цитоплазме клеток и стимулирует развитие иммунного ответа. С разработкой таких вакцин связывают большие надежды на повышение эффективности профилактики не только инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии, но и аллергических, аутоиммунных и даже онкологических болезней. Конструирование и биотехнологическое производство ДНК-вакцин являются относительно простыми, кроме того, для иммунизации достаточно небольшого количества препарата, в результате все это позволяет снизить затраты на их создание [6].

Настоящее исследование посвящено созданию генетических конструкций для ДНК-вакцины против ЦВС-2 и выявлению антигенной активности в культуре клеток млекопитающих.

Материалы и методы исследований

Плазмиду pET-ORIP, полученную ранее в лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ, использовали в качестве матрицы, содержащей целевую ОРС капсидного белка цирковируса [7]. Данная плаزمид сконструирована на основе вектора экспрессии pET-24b (*Novagen*, Австралия), в который введена амплифицированная природная рамка трансляции, кодирующая белок капсида ЦВС-2.

Плазмида pVAX1 (*Invitrogen*, США) выступала в качестве вектора для клонирования области генома ЦВС-2, содержащей полноценный ген белка капсида для экспрессии в клетках млекопитающих.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась на аппарате Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Model 9902) (*Applied Biosystems*, Великобритания) в смеси стандартного состава с использованием Pfu-полимеразы [8]. Дизайн праймеров PCVF-long, PCVF-trunk и PCVrev (синтезированы фирмой «Праймтех», Беларусь) для ПЦР осуществляли с помощью программы *Primer3* [9]. Были подобраны оптимальные временные и температурные параметры циклов амплификации. Первичная денатурация проводилась в течение 5 мин при 94 °С, затем следовали 30 циклов: денатурация – при 94 °С в течение 15 с, отжиг праймеров – при 44 °С в течение 15 с, элонгация – при 72 °С в течение 1,5 мин, заключительная полимеризация – при 72 °С в течение 5 мин.

В работе использовали ферменты рестрикции *Nhe*I, *Hind*III, *Xho*I (*Thermo Fisher Scientific*, США). Рестриктию осуществляли в условиях, рекомендованных фирмой-изготовителем.

Лигирование производили посредством T4 DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

Для клонирования рекомбинантных плазмид использовали бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue F':Tn10(TcR) proA⁺B⁺ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1, gyrA96(NalR) thi hsdR17 (rk⁻mk⁺) glnV44 relA1 lac из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ.

Ca²⁺-зависимую трансформацию клеток *E. coli* XL-1 Blue осуществляли в соответствии со стандартным экспериментальным протоколом [10].

Получение рекомбинантной векторной ДНК из клеток *E. coli*, а также выделение и очистку фрагментов ДНК после реакций амплификации, лигирования, рестрикции и электрофореза осуществляли с помощью наборов GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit и GenJET™ (*Thermo Fisher Scientific*, США), придерживаясь указаний в методике фирмы-производителя.

Исследование экспрессии целевых генов изучали на культурах клеток СПЭВ (перевиваемые клетки эпителия эмбриона свиньи) и НЕК 293Т (перевиваемые клетки почки эмбриона человека). Клетки культивировали в матрицах на ростовой среде DMEM (*Lonza*, Бельгия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (*HyClone*, США), в инкубаторе в течение 24–72 ч при температуре (37 ± 1) °С в атмосфере с объемной долей углекислого газа (5,0 ± 0,5) % и относительной влажностью (75 ± 5) %.

Трансфекцию используемых клеточных линий осуществляли кальций-фосфатным методом по стандартной методике [11]. Клетки засеивали в 21 мл полноценной ростовой среды (концентрация – 2–3 · 10⁵ клеток/мл), затем вносили в лунки стерильного 6-луночного планшета для тканевых культур и инкубировали при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂ на протяжении 24 ч (исходя из расчета, что на момент трансфекции конfluence культуры должна быть 25–35 %), после чего проводили трансфекцию. Предварительно нагревали буфер HEPES в концентрации 1 моль/л (pH 7,3), раствор CaCl₂ в концентрации 0,5 моль/л и буфер NEBS 2x до комнатной температуры, затем готовили растворы для трансфекции. Для приготовления реакционной смеси на одну лунку планшета в стерильную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл добавляли 10 мкг плазмидного вектора и доводили объем до 100 мкл водой, буфером HEPES в концентрации 1 моль/л, затем добавляли 100 мкл раствора CaCl₂ в концентрации 0,5 моль/л. Тщательно перемешивали полученную смесь. Медленно, по каплям, выливали содержимое первой пробирки в другую стерильную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл буфера NEBS 2x, параллельно тщательно перемешивая раствор азрацией. Выдерживали раствор на протяжении 30 мин при комнатной температуре, после чего медленно, по каплям, добавляли преципитат на поверхность растущей культуры клеток, перемешивая содержимое планшета круговым движением.

В эксперименте с измененными условиями вместо буферного раствора NEBS использовали NEBS с декстрозой (табл. 1).

Трансфекция клеток коммерческой плазмидой pVAX1/lacZ (*Invitrogen*, США) являлась положительным контролем эксперимента. Контролем роста клеток служили лунки, куда не вносили растворы для трансфекции ДНК. На следующий день заменяли среду, в которой культивируются клетки. При необходимости перед заменой среды проводили глицириновый шок: инкубировали клетки с раствором глицерина в концентрации 15 % в течение 3 мин. Затем продолжали инкубацию культуры на протяжении следующих 72 ч при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂. Потом удаляли клетки с поверхности планшета, отмывали в фосфатном буфере. Клетки разрушали трехкратным циклом замораживания (на льду в присутствии этанола) и оттаивания (при 37 °С).

Эффективность трансфекции оценивали при помощи β-галактозидазного теста. Данный тест проводили стандартным способом, используя в качестве субстрата ферментативной реакции *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (ОНФГ) [12]. Измеряли оптическую плотность (ОП) с применением спектрофотометра SpectraMax M2 (*Molecular Devices*, США) при длине волны 420 нм.

Таблица 1

Состав буферов

Table 1

Composition of buffers

Состав	Количество	Состав	Количество
Буфер HEBS 2x		Буфер HEBS 2x с декстрозой	
HEPES	1,19 г	HEPES	1,192 г
NaCl	1,636 г	KCl	74,6 мг
Na ₂ HPO ₄	0,0213 г	Декстроза	0,216 г
Дистиллированная вода	100 мл	NaCl	1,636 г
pH	7,0	Na ₂ PO ₄ · 7H ₂ O	4,02 г
		Дистиллированная вода	100 мл
		pH	7,05

Наличие целевого белка определяли с помощью реакции иммуноферментного анализа (ИФА), осуществляемой по стандартной методике [13]. Перед проведением ИФА все пробы доводили до концентрации белка 20 мкг/мл. Предварительно концентрацию белка в используемых образцах измеряли при помощи набора BCA Protein Assay Kit (*Thermo Fisher Scientific*, США) в соответствии с протоколом производителя. При постановке ИФА использовали сыворотку с антителами к капсидному белку цирковируса свиней Anti-PCV-2 polyclonal antiserum (*Accurate Chemical & Scientific Co.*, США) и вторичные антитела с ферментативной меткой – Goat polyclonal secondary antibody to pig IgG-H & L (HRP) (*Abcam*, Великобритания). Для проявления реакции добавляли субстратную смесь 1-Step TMB-ELISA (*Thermo Fisher Scientific*, США). Оценивали интенсивность окрашивания при помощи спектрофотометра при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля выступали лизаты клеток, которые не подвергались трансфекции. Положительным контролем специфичности используемых антител являлся рекомбинантный очищенный белок капсида ЦВС-2. Реакционную смесь без исследуемых проб использовали для обнуления показателей спектрофотометра.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы *Excel*.

Результаты исследований и их обсуждение

Известно, что ДНК-вакцинная конструкция содержит гены возбудителя заболевания, продукты которых впоследствии будут активировать иммунный ответ. ЦВС-2 имеет единственный структурный белок, формирующий капсидную оболочку и обладающий иммуногенностью при попадании в организм животного-хозяина. В связи с этим на первом этапе разработки ДНК-вакцинной конструкции против ЦВС-2 необходимо было получить нуклеотидную последовательность, кодирующую вирусный белок капсида. Для этого амплифицировали фрагмент ранее созданной конструкции рЕТ-ORIP, который соответствует последовательности белка капсида вируса. Цель амплификации – получение двух вариантов ОРС капсидного белка: кодирующей полноразмерный продукт и укороченной, которая соответствует белку капсида без *N*-концевой последовательности, содержащей сигнал ядерной локализации (т. е. без первых 30 аминокислотных остатков). Для амплификации указанных ОРС были написаны соответствующие нуклеотидные последовательности двух прямых праймеров и одного обратного (табл. 2).

Полноразмерная ОРС белка капсида ЦВС-2 была амплифицирована с помощью праймеров PCVF-long и PCVrev. Рамка считывания, соответствующая укороченному варианту капсидного белка, амплифицирована прямым праймером PCVF-trunk, сайт отжига для которого находится на 112 нуклеотидов дальше от стартового кодона полноразмерной последовательности, и обратным – PCVrev. При дизайне используемых праймеров в их состав включили навески нуклеотидов, соответствующие дополнительным сайтам рестрикции Nhe I, Hind III, Xho I и последовательности Козак.

Основные характеристики разработанных праймеров

Table 2

Basic properties of the designed primers

Праймер	Сиквенс 5' → 3'	Количество нуклеотидов, ед.	Температура плавления, °C	GC, %	Ампликон, п. о.	Сайт рестрикции
PCVF-long	АГТАГТ ГС ТАГ С АССАТ ГГ СГАСГТАТ АССАГГАГ	35	50	40	707	Nhe I
PCVF-trunk	АТТАТАА АГ С Т ТАА С АТ Г ГГГАГАААГ ГАААААТГГ	35	49	34	597	Hind III
PCVrev	АТТТТ Г С Т С Г АГ Т ТАА Г ГГГАТААГТГГ	27	55	41	–	Xho I

Примечание. Жирным шрифтом выделены последовательности сайтов рестрикции, подчеркиванием – последовательность Козак.

При помощи полимеразной цепной реакции к 5'-концам каждого из двух вариантов ОРС белка ЦВС-2 присоединена последовательность Козак (АССАТГГ), окружающая стартовый кодон и важная для инициации трансляции в клетках эукариот, а к 3'-концам добавлен терминирующий кодон (ТАА) [14]. Также в результате амплификации к 5'-концу последовательности, кодирующей полноразмерный капсидный белок, добавлен сайт рестрикции для фермента NheI, а к 5'-концу укороченного варианта ОРС – Hind III. На 3'-концах данных нуклеотидных последовательностей расположен сайт рестрикции для фермента Xho I. Полученные ампликоны очищали от посторонних примесей, обрабатывали рестриктазами NheI либо Hind III (в зависимости от типа ОРС) и Xho I, а затем по отдельности лигировали с аналогично разрезанным вектором pVAX1 (рис. 1).

Коммерческий плазмидный вектор pVAX1 обеспечивает проникновение, сохранение рекомбинантной ДНК в клетках млекопитающих и содержит регуляторные элементы для эукариотической системы экспрессии генов. Формирование функциональной мРНК продукта возможно благодаря наличию

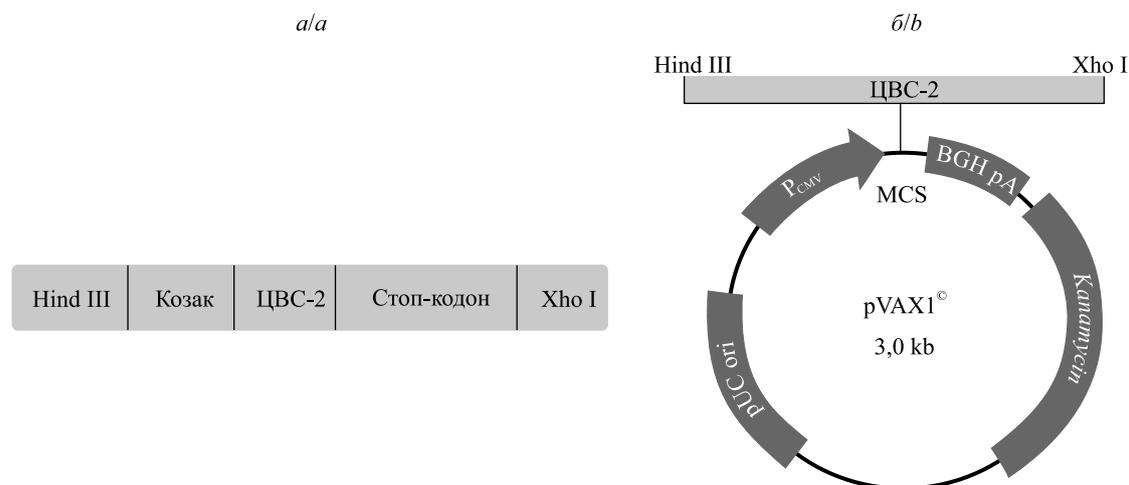


Рис. 1. Схематическое изображение разработанной ДНК-вакциной конструкции:
а – структура целевой последовательности: Hind III, Xho I – сайты для рестриктаз, последовательность Козак (АССАТГГ), ЦВС-2 – ОРС укороченного капсидного белка цирковируса, стоп-кодон;
б – вектор pVAX1 с клонированной целевой последовательностью:
ЦВС-2 – ОРС укороченного белка капсида цирковируса, Hind III, Xho I – сайты рестрикции, использованные для клонирования, P_{CMV} – цитомегаловирусный промотор, MCS – множественный сайт для клонирования генов, BGH pA – последовательность сигнала полиаденилирования гормона роста быка, Kanamycin – ген устойчивости к канамицину, pUC ori – точка начала репликации плазмиды pUC

Fig. 1. Schematic depiction of the developed DNA-vaccine construct:
а – structure of the target sequence: Hind III, Xho I – sites for restriction enzymes, Kozak sequence (АССАТГГ), PCV-2 – ORF of the truncated capsid protein of circovirus, stop codon (TAA);
б – vector pVAX1 with the cloned sequence: PCV-2 – ORF of the trunked capsid protein of PCV-2, Hind III, Xho I – sites for restriction enzymes, P_{CMV} – cytomegalovirus promoter, MCS – multiple cloning site, BGH pA – bovine growth hormone polyadenylation signal, Kanamycin resistance gene, pUC ori – origin of pUC

в векторе цитомегаловирусного промотора и последовательности сигнала полиаденилирования гена гормона роста быка.

Каждой полученной конструкцией по отдельности проводили Ca^{2+} -зависимую трансформацию клеток *E. coli* XL-1 Blue, а клоны трансформантов проверяли на наличие обоих вариантов целевых ОРС ПЦР-анализом с использованием соответствующих праймеров. На электрофореграмме идентифицированы фрагменты ДНК размером около 700 и 600 п. о., что соответствует размерам областей генома, кодирующих полную и укороченную ОРС капсидного белка ЦВС-2 (рис. 2).

Таким образом, подтверждено получение двух генетических конструкций с ОРС капсидного белка цирковируса свиней на основе вектора pVAX1.

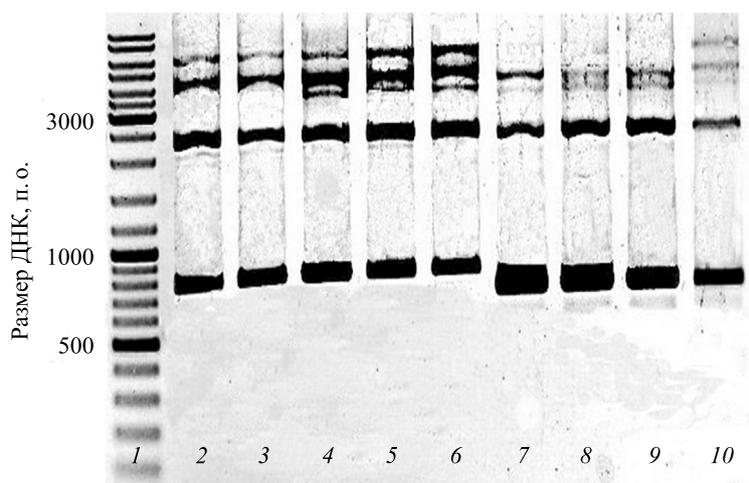


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК после ПЦР-анализа образцов трансформированных клеток: 1 – маркеры молекулярного веса GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (*Thermo Fisher Scientific*, США); 2–6 – фрагменты полноразмерных ОРС капсидного белка ЦВС-2; 7–10 – фрагменты укороченных ОРС капсидного белка ЦВС-2

Fig. 2. DNA electrophoresis after PCR of transformants: 1 – markers of molecular weight of DNA GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (*Thermo Fisher Scientific*, США); 2–6 – fragments of full-length ORFs of the circovirus capsid protein; 7–10 – fragments of truncated ORFs of circovirus capsid protein

Для проверки функционирования полученных генетических конструкций определяли экспрессию целевых ОРС по наличию капсидного белка вируса ЦВС-2 в культуре клеток млекопитающих. С этой целью вводили плазмидную ДНК в культивируемые клетки млекопитающих методом кальций-фосфатной трансфекции из-за относительной простоты, дешевизны и доступности данного метода. Фосфат кальция облегчает связывание ДНК с поверхностью клетки, благодаря чему возможно проникновение молекулы внутрь [15].

Изначально в исследовании использовали свиную клеточную линию СПЭВ, так как клонированные ОРС должны впоследствии экспрессироваться в организме свиньи. В специальной литературе мало сведений об эффективном способе трансфекции клеток СПЭВ, хотя в некоторых работах указано, что кальций-фосфатный метод является наиболее предпочтительным по сравнению с электропорацией и ДЕАЕ-декстрановым [16].

В связи с этим определяли, подходит ли такая трансфекция для СПЭВ. Пробную трансфекцию проводили с использованием коммерческой плазмиды pVAX1/lacZ с геном β -галактозидазы на двух клеточных линиях: СПЭВ и НЕК 293Т. Человеческая клеточная линия НЕК 293Т выбрана в качестве контроля соблюдения методики кальций-фосфатной трансфекции, которая успешно применяется для данного типа клеток [11]. Эффективность трансфекции проверяли путем спектрофотометрического анализа цветной ферментативной реакции: если β -галактозидаза синтезируется в клетках, то при взаимодействии с соответствующим субстратом наблюдается желтое окрашивание раствора.

Кальций-фосфатную трансфекцию проводили с использованием буферного раствора HEBS, а реакционную смесь перед добавлением к клеткам инкубировали на протяжении 30 мин. Результаты оценки эффективности трансфекции показали, что клетки СПЭВ практически не содержат плазмид, так как показатель ОП в образцах близок к нулевому значению (среднее значение ОП составляет $0,041 \pm 0,01$ ед., $n = 4$). Визуально наблюдалось очень бледно-желтое окрашивание раствора, что указывает на возможную трансфекцию только незначительного количества клеток. В то же время лизаты клеток НЕК 293Т давали в реакции с субстратом ярко-желтое окрашивание, а показатель ОП составил $3,7 \pm 0,425$ ед. ($n = 4$).

Затем в целях улучшения уровня трансфекции клеточной линии СПЭВ кальций-фосфатным методом изменили условия эксперимента. Для этого использовали буферный раствор HEBS, содержащий декстрозу, который применяется для трансфекции клеток животных [17]. Также изменили время, отведенное на образование комплекса ДНК – фосфат кальция, и применили глицериновый шок для клеток, способствующий повышению эффективности поглощения плазмидной ДНК [11]. Результаты проведения трансфекции с измененными условиями представлены в табл. 3 и 4, где указаны средние значения ОП исследуемых образцов (также рассчитано стандартное отклонение).

Таблица 3

Результаты трансфекции клеточной линии СПЭВ с разными условиями эксперимента, ед.

Table 3

Results of the SPEV cell line transfection with different experimental conditions, units

Раствор	Время инкубирования реакционной смеси, мин			
	20	30	40	50
HEBS	0,0103 ± 0,0082	0,0127 ± 0,0009	0,0120 ± 0,0071	0,0084 ± 0,0011
HEBS + глицериновый шок	0,0149 ± 0,0012	0,0154 ± 0,0010	0,0153 ± 0,0084	0,0110 ± 0,0052
HEBS с декстрозой	0,0060 ± 0,0036	0,0110 ± 0,0009	0,0069 ± 0,0012	0,0045 ± 0,0015
HEBS с декстрозой + глицериновый шок	0,0072 ± 0,0014	0,0087 ± 0,0001	0,0190 ± 0,0076	0,0088 ± 0,0029
Клетки без плазмид	0,0088 ± 0,0009			

Экспериментальные данные, приведенные в табл. 3, свидетельствуют об очень низкой эффективности трансфекции клеточной линии СПЭВ. Значения оптической плотности для образцов трансфицированных клеток практически не отличаются от таких же показателей для клеток контроля, куда плазмиды pVAX1/lacZ не вносились.

Таблица 4

Результаты трансфекции клеточной линии HEK 293T с разными условиями эксперимента, ед.

Table 4

Results of the HEK 293T cell line transfection with different experimental conditions, units

Раствор	Время инкубирования реакционной смеси, мин			
	20	30	40	50
HEBS	3,633 ± 0,179	3,828 ± 0,233	3,670 ± 0,230	2,988 ± 0,108
HEBS + глицериновый шок	3,746 ± 0,246	3,890 ± 0,110	3,750 ± 0,165	3,190 ± 0,273
HEBS с декстрозой	0,285 ± 0,018	0,723 ± 0,022	0,618 ± 0,070	0,130 ± 0,090
HEBS с декстрозой + глицериновый шок	0,300 ± 0,088	0,730 ± 0,105	0,720 ± 0,032	0,184 ± 0,050
Клетки без плазмид	0,045 ± 0,016			

Исследование показало, что применение буферного раствора с декстрозой приводит к значительному снижению эффективности трансфекции. При использовании этого раствора также наблюдалось формирование осадка из фосфата кальция на дне лунок планшета. Токсическое воздействие данного раствора исключается, так как в лунках, в которые его вносили, рост клеток не отличался от роста клеток контроля (к которым реакционная смесь не добавлялась). Возможно, такие результаты связаны с наличием примеси неизвестного происхождения или декстроза препятствует взаимодействию преципитата с клетками.

Данные, полученные в ходе проведенных экспериментов, показали, что время инкубирования кальций-фосфатной смеси с ДНК перед добавлением к культуре клеток и действие глицеринового шока не дают значимой для нашей работы разницы в эффективности трансфекции, хотя для инкубирования смеси в течение 50 мин показатель ОП отчетливо ниже. Кроме того, при выдерживании реакционной смеси более 30 мин формируются видимые частицы преципитата, что приводит к снижению эффективности трансфекции.

Таким образом, полученные результаты показали, что для дальнейших исследований с применением методики кальций-фосфатной трансфекции нецелесообразно использовать свиную клеточную линию СПЭВ. Отличие полученных нами данных от приведенных в работе [16], где кальций-фосфатная трансфекция клеток СПЭВ указывалась как предпочтительная (по сравнению с электропорацией и ДЕАЕ-декстрановым методом), может быть связано с использованием в нашей работе другой сублинии СПЭВ. Возможны также изменения некоторых свойств клеточной линии в процессе многократного пассирования.

После проведенных экспериментов можно выделить наиболее оптимальные условия кальций-фосфатной трансфекции клеточной линии НЕК 293Т: использование буферного раствора HEBS, выдерживание реакционной смеси в течение 30 мин перед добавлением к клеткам, применение глицеринового шока. Клетки НЕК 293Т и указанные условия трансфекции применяли при проведении дальнейших исследований.

Клетки НЕК 293Т трансфицировали целевыми генетическими конструкциями с ОРС капсидного белка ЦВС-2. Параллельно проводили контроль трансфекции, используя плазмиду pVAX1/lacZ. Лизаты трансфицированных клеток исследовали на наличие капсидного белка цирковируса свиней с помощью иммуноферментного анализа, при этом использовали сыворотку с антителами к капсидному белку цирковируса свиней и вторичные антитела с ферментативной меткой. После завершения реакции ИФА результаты оценивали по спектрофотометрическому измерению образцов лизированных клеток. Полученные средние значения (по нескольким лункам планшета) оптической плотности образцов представлены на рис. 3.

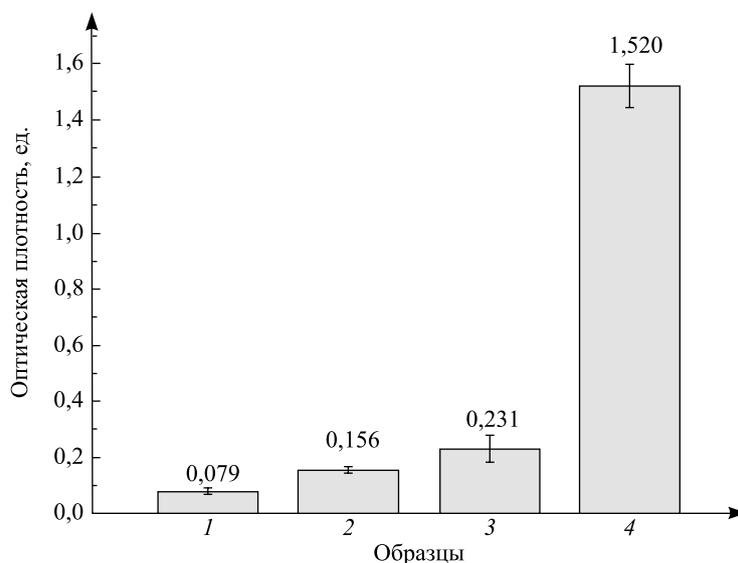


Рис. 3. Уровень сигнала капсидного белка цирковируса свиней в лизатах клеток НЕК 293Т:

- 1 – лизат клеток, не подвергавшихся трансфекции; 2 – лизат клеток, в которые вводились плазмиды с ОРС полноразмерного капсидного белка ЦВС-2; 3 – лизат клеток, в которые вводились плазмиды с ОРС укороченного капсидного белка ЦВС-2; 4 – образец очищенного рекомбинантного белка капсида цирковируса ЦВС-2 (положительный контроль)

Fig. 3. The signal level of the circovirus capsid protein in the lysates of HEK 293T cells:

- 1 – lysate of HEK 293T cells without transfection; 2 – lysate of cells transfected with plasmids carrying full-length PCV-2 capsid protein ORF; 3 – lysate of cells transfected with plasmids carrying truncated PCV-2 capsid protein ORF; 4 – purified recombinant capsid protein of PCV-2 (positive control)

Результаты ИФА показали, что белок капсида ЦВС-2 в лизатах клеток присутствует, хотя его содержание низкое. Поскольку эффективность трансфекции клеток контрольной плазмидой высокая, то на результаты ИФА она не влияет. Возможными причинами низкого уровня сигнала может быть малая концентрация рекомбинантного белка в лизатах, обусловленная слабой экспрессией целевого гена в клетках НЕК 293Т. Однако четко просматривается, что укороченная ОРС экспрессируется с большей эффективностью, нежели нативная.

Заклучение

Таким образом, в результате проведенной работы получены две генетические конструкции на основе плазмидного вектора рVAX1: с полноразмерной и с укороченной ОРС капсидного белка ЦВС-2. Экспрессию целевых ОРС, содержащихся в полученных конструкциях, исследовали по наличию белковых продуктов в трансфицированных клетках млекопитающих. Уровень экспрессии укороченного варианта ОРС оказался выше, чем полноразмерного. В целом можно отметить функциональность данных генетических конструкций, так как оба варианта цирковирального белка детектируются в клетках после трансфекции. Полученные конструкции могут стать основой для создания ДНК-вакцины против ЦВС-2.

Библиографические ссылки

1. Modrow S., Falke D., Truyen U., et al. *Molecular Virology*. Berlin : Springer, 2013.
2. Knipe D. M., Howley P. M., Meng X.-J. *Fields Virology* : in 2 vol. Philadelphia : LWW, 2013. Vol. 2 : Specific virus families.
3. Liu Q., Tikoo S. K., Babiuk L. A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2 // *Virology*. 2001. Vol. 285, № 1. P. 91–99.
4. Донник И. М., Петрова О. Г., Исаева А. Г. и др. Клинические признаки заболеваний, ассоциированных с цирковиральной инфекцией свиней и сопутствующие инфекции // *Аграр. вестн. Урала*. 2013. № 3. С. 20–23.
5. Coban C., Koyama S., Takeshita F., et al. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines // *Human Vaccines*. 2008. № 4. P. 453–456.
6. Попов Ю. А., Микшиц Н. И. Генетические (ДНК) вакцины // *Пробл. особо опасных инфекций*. 2010. № 10. С. 20–25.
7. Прокулевич В. А., Кудин К. В. Экспрессия открытой рамки трансляции белка капсида ЦВС-2 в клетках *E. coli* // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты* : сб. науч. тр. : в 5 т. / редкол.: Э. И. Коломиец (гл. ред.) [и др.]. Минск : Беларус. навука, 2013. Т. 5. С. 131–141.
8. McPherson M. J., Moller S. G. *PCR*. Oxford : BIOS Scientific Publisher, 2000.
9. Primer 3plus [Electronic resource]. 2006. URL: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> (date of access: 20.01.2015).
10. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E. *Current protocols in molecular biology*. 2nd ed. New York : John Wiley & Sons, 1993. Vol. 1.
11. Martin J. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation // *Nucleic acids research*. 1996. Vol. 24, № 4. P. 596–601.
12. Enzymatic assay of β -galactosidase [Electronic resource]. 2011. URL: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/bgactosidase73.pdf (date of access: 15.05.2016).
13. *Immunoassay and other bioanalytical techniques* / ed. by J. M. van Emon. USA : CRC Press, 2007.
14. Pereira V. B., Zurita-Turk M., Saraiva T. D., et al. DNA vaccines approach: from concepts to applications // *World J. of Vaccines*. 2014. Vol. 4. P. 50–71.
15. Transfection [Electronic resource]. 2013. URL: <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection> (date of access: 03.05.2016).
16. Тугизов Ш. М. Структурно-функциональный анализ мембранных белков вирусов в генетически трансформированных клетках : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.06. М., 1996.
17. Protocol for calcium phosphate transfection of 293T cells [Electronic resource]. 2004. URL: <http://delangelab.rockefeller.edu/protocols.html> (date of access: 03.05.2016).

References

1. Modrow S., Falke D., Truyen U., et al. *Molecular Virology*. Berlin : Springer, 2013.
2. Knipe D. M., Howley P. M., Meng X.-J. *Fields Virology* : in 2 vol. Philadelphia : LWW, 2013. Vol. 2 : Specific virus families.
3. Liu Q., Tikoo S. K., Babiuk L. A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*. 2001. Vol. 285, No. 1. P. 91–99.
4. Donnik I. M., Petrova O. G., Isayeva A. G., et al. Klinicheskiye priznaki zabolevaniy assotsirovannykh s tsirkovirusnoy infektsiyey sviney i soputstvuyushchiye infektsii. *Agrarnyy vestnik Urala*. 2013. No. 3. С. 20–23 (in Russ.).
5. Coban C., Koyama S., Takeshita F., et al. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. *Human Vaccines*. 2008. No. 4. P. 453–456.
6. Popov Yu. A., Mikshis N. I. Genetic (DNA) Vaccines. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2010. No. 10. С. 20–25 (in Russ.).
7. Prakulevich U. A., Kudzin K. V. Expression of the open reading frame of PCV2 capsid protein in *E. coli* cells. *Mikrobnyye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty* : sb. nauchn. tr. : in 5 vol. Minsk : Belaruskaya navuka, 2013. Vol. 5. P. 131–141 (in Russ.).
8. McPherson M. J., Moller S. G. *PCR*. Oxford : BIOS Scientific Publisher, 2000.
9. Primer 3plus. 2006. URL: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> (date of access: 20.01.2015).
10. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E. *Current protocols in molecular biology*. 2nd ed. New York : John Wiley & Sons, 1993. Vol. 1.
11. Martin J. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic acids research*. 1996. Vol. 24, No. 4. P. 596–601.

12. Enzymatic assay of β -galactosidase. 2011. URL: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/bgactosidase73.pdf (date of access: 15.05.2016).
13. Van Emon J. M. (ed.). Immunoassay and other bioanalytical techniques. USA : CRC Press, 2007.
14. Pereira V. B., Zurita-Turk M., Saraiva T. D., et al. DNA vaccines approach: from concepts to applications. *World J. of Vaccines*. 2014. Vol. 4. P. 50–71.
15. Transfection. 2013. URL: <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection> (date of access: 03.05.2016).
16. Tugizov Sh. M. Strukturno-funktsionalnyy analiz membrannykh belkov virusov v geneticheski transformirovannykh kletkakh : dissertatsiya... doktora biol. nauk : 03.00.06. Moscow, 1996 (in Russ.).
17. Protocol for calcium phosphate transfection of 293T cells. 2004. URL: <http://delangelab.rockefeller.edu/protocols.html> (date of access: 03.05.2016).

*Статья поступила в редколлегию 15.09.2017.
Received by editorial board 15.09.2017.*