

5. Капустин, М.А. Получение и свойства наноструктур куркуминоидов с нативными и модифицированными циклическими олигосахаридами/ М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.П. Курченко, В.Г. Цыганков // Инновации в пищевой технологии, биотехнологии, и химии: сб. статей Междунар. науч.практ. конф., г. Саратов, 13–15 июня 2017 г. – Саратов: Изд. Центр «Наука», 2017. – С. 240–246.
6. Капустин, М.А. Выделение куркуминоидов из коневидца *Curcuma longa* L и исследование состава полученного препарата с использованием хроматографических методов анализа / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.Г. Цыганков, В.П. Курченко// Труды Белорусского государственного университета. – 2016. – Т. 11, ч. 2. – С. 248–262.
7. Северюхина, А.Н. Композитные нетканые материалы с включением микрочастиц для нужд регенеративной медицины/ А. Н. Северюхина, Ю. И. Свенская, Д. А. Горин // Известия Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. –2013. –Т. 13, № 2. – С. 69–79.

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ

Кравченко Л.М., Кудин К.В., Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, г. Минск,

lidia_kravchenko@tut.by

Данное исследование посвящено разработке генетических конструкций, которые могут стать основой для создания ДНК-вакцины против цирковируса свиней типа 2. В результате проведенной работы на основе коммерческого плазмидного вектора pVAX1 (Invitrogen) получены две генетические конструкции, одна из которых содержит полноразмерную природную открытую рамку трансляции капсидного белка цирковируса свиней типа 2 (ЦВС-2), а вторая – укороченную без 112 первых нуклеотидов.

Одной из важнейших отраслей животноводства Беларуси является свиноводство. На сегодняшний день наблюдается рост поголовья и количества свиноводческих комплексов. Для максимально эффективного и прибыльного свиноводства необходим строгий контроль состояния здоровья животных. Наиболее распространенным агентом, вызывающим заболевания вирусной этиологии среди свиней, является цирковирус свиней типа 2 (ЦВС-2). Данный патоген – это икосаэдрический безоболочечный вирус диаметром 17-22 нм из семейства *Circoviridae* рода *Circovirus*. Геном ЦВС-2 представлен кольцевой ДНК размером 1800 пар нуклеотидов, что соответствует минимальному размеру полноценного вирусного генома. В нем выявлены три открытые рамки трансляции (ОРТ): ОРТ1, ОРТ2, ОРТ3, которые кодируют белок капсида, Рер-белок и белок, вызывающий апоптоз клеток, соответственно. Белок капсида цирковируса состоит из 233 аминокислот,

первые тридцать аминокислот N-концевого домена содержат сигнал ядерной локализации [3, 4]. Инфицирование животных цирковирусом свиней типа 2 наносит огромный экономический ущерб свиноводческим хозяйствам по всему миру. Размножение цирковируса в организме животного приводит к развитию ряда патологических состояний, которые обобщенно называют цирковирус-ассоциированные заболевания. В вышеуказанную группу болезней свиней входят синдром послеотъемного мультисистемного истощения поросят (СПМИ), дерматит и нефропатия, заболевания пищеварительной, репродуктивной системы, респираторный синдром и некоторые другие [1].

Вакцинация является одной из основных превентивных мер защиты от массового заражения поголовья ЦВС-2. Иммунизация свиней осуществляется инаktivированными либо субъединичными вирус-вакцинами, степень эффективности которых сильно варьирует. Даже после введения таких вакцин у животных могут развиваться цирковирус-ассоциированные болезни. В связи с этим большие надежды на увеличение эффективности профилактики таких заболеваний связывают с разработкой новых препаратов, в частности ДНК-вакцин. Такие вакцины содержат плазмидную либо вирусную ДНК со встроенным в нее геном возбудителя инфекционного заболевания, который экспрессируется в эукариотических клетках. При введении ДНК-вакцины в организм, в клетках синтезируется белок патогена, который выступает в качестве антигена, стимулирующего развитие клеточного и гуморального иммунного ответа, активирующего систему интерферонов [2].

Представленная работа посвящена созданию генетических конструкций для ДНК-вакцины против цирковируса свиней типа 2. На основе плазмидного вектора pVAX1(Invitrogen) разработан дизайн двух разных генетических конструкций, содержащих полноразмерную природную ОРТ капсидного белка ЦВС-2 и укороченную ОРТ без нуклеотидов, соответствующих тридцати N-концевым аминокислотам. С целью амплификации вирусных ОРТ и присоединения к ним необходимых регуляторных элементов для экспрессии в эукариотической системе клеток составлены нуклеотидные последовательности прямых праймеров: для полноразмерной ОРТ – PCVF-long, для укороченной – PCVF-trunk и одного обратного – PCVrev. Праймеры синтезированы фирмой «Праймтех» (Беларусь), а их последовательности представлены в таблице.

При помощи ПЦР к 5'-концу целевых ОРТ присоединена последовательность Козак, которая окружает стартовый кодон и необходима для инициации трансляции в клетках эукариот, также установлена область, соответствующая сайту рестрикции NheI, а к 3'-концу добавлен терминирующий кодон и сайт рестрикции для фермента XhoI [5].

Таблица – Характеристика праймеров, использованных в исследовании

Праймер	Сиквенс 5'→3'	Размер, нт	Т плавления, °С	GC, %	Ампликон, п.о.	Сайт рестрикции
PCVF-long	ATTATTGCTAGCACCATGG CGACGTATACAAGGAG	35	39	40	707	NheI
PCVF-trunk	ATTATAGCTAGAACATGGG GAGAAGGAAAAATGG	35	41	34	597	NheI
PCVrev	ATTTTGCTCGAGTTAAGGG ATAAGTGG	27	55	41	-	XhoI

Примечание. Жирным шрифтом выделены последовательности сайтов рестрикции; подчеркиванием выделена последовательность Козак.

Полученные после амплификации последовательности и вектор pVAX1 подвергали рестрикции ферментами *NheI* и *XhoI*. Затем в pVAX1 по отдельности клонировали полноразмерную и укороченную ОПТ капсидного белка цирковируса свиней. После чего полученными плазмидами с двумя вариантами вирусной ОПТ трансфецировали клетки *E.coli* XL-1 Blue. С помощью ПЦР-анализа с праймерами PCVF-long, PCVF-trunk PCVrev отбирали положительные клоны трансформантов. На электрофореграмме образцов после ПЦР идентифицированы фрагменты ДНК размером около 700 и 600 пар оснований, что соответствует размерам области генома, кодирующей полноразмерную и укороченную ОПТ капсидного белка ЦВС-2 (рисунок).

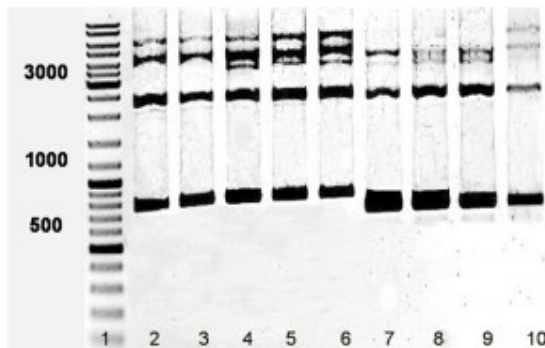


Рисунок – Электрофореграмма ДНК после ПЦР-анализа образцов, трансформированных клеток

1 – маркеры молекулярного веса GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 2-6 – полноразмерные ОПТ капсидного белка ЦВС-2; 7-10 – укороченные ОПТ капсидного белка ЦВС-2.

Дополнительно соответствие вставок ожидаемым последовательностям проверяли методом рестрикционного анализа плазмид, выделенных из положительных клонов трансформантов *E.coli* XL-1 Blue. Данный анализ также подтвердил наличие целевых ОПТ в векторе pVAX1.

Таким образом, итогом проведенной работы является получение следующих генетических конструкций: pVAX1 с ОПТ, соответствующей

природному полноразмерному белку капсида ЦВС-2, и рVAX1 с укороченной ОРТ капсидного белка без первых 112 нуклеотидов.

Список литературы:

1. Донник, И.М. Клинические признаки заболеваний, ассоциированных с цирковиральной инфекцией свиней и сопутствующие инфекции / И.М. Донник [и др.] // Аграрный вестник Урала. – 2013. – № 3. – С. 20–23.
2. Петров, Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – С. 527–531.
3. Пиневиц, А.В. Вирусология: учебник / А.В. Пиневиц [и др.] – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2012. – С. 335–337
4. Meng, X.-J. Circoviridae / X.-J. Meng // Fields Virology / X.-J. Meng, D.M. Knipe, P.M. Howley. – USA: LWW, 2013. – Chap. 58. – P. 1792–1801.
5. Pereira, V.B. DNA vaccines approach: from concepts to applications / V.B. Pereira [et al.] // World Journal of Vaccines. – 2014. – Vol. 4. – P. 50-71.

СОЗДАНИЕ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО НАПИТКА НА ОСНОВЕ ПЕРМЕАТА ОБЕЗЖИРЕННОГО МОЛОКА

Крохмаль М.В., Евдокимов И.А.

Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь,
mvkrohmal@yandex.ru

В статье представлены результаты исследования изменений углеводного состава ультрафильтрационного (УФ) пермеата обезжиренного молока в ходе технологических этапов производства ферментированного напитка, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

УФ пермеат обезжиренного молока относится к новым видам вторичного молочного сырья, получаемого при обработке обезжиренного молока на установке ультрафильтрации. Одновременно пермеат представляет собой серьезный источник загрязнения, если его сбрасывать в окружающую среду, так как его биологическая потребность в кислороде, в зависимости от его состава, колеблется в диапазоне от 30000 - 450000 г/л [6]. По данным зарубежных исследователей УФ пермеат обезжиренного молока является источником таких минеральных веществ, как кальций, калий, натрий, магний и фосфор, поэтому напитки на его основе прекрасно подходят для восстановления солевого баланса организма в процессе и после физических нагрузок различной интенсивности [7]. В тоже время он содержит значительное количество лактозы, поэтому люди с лактазной недостаточностью [5] ограничены в употреблении подобных напитков. Обзор литературы не выявил технологий переработки УФ пермеата с использованием какой-либо заквасочной микрофлоры с целью снижения