

СОЗДАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА E2 КАПСИДА ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 1-ГО ТИПА В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *E. COLI*

С. С. Паршута

Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Беларусь, parshuta.z@gmail.com
Научный руководитель — Н. В. Сауткина

Вирусная диарея – болезнь слизистых крупного рогатого скота (КРС). Возбудитель болезни – вирус, относящийся к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*, заражение которым происходит аэрогенным, алиментарным и половым путем. Воздействие вируса приводит к некротическим изменениям тканей и образованию эрозий. В работе представлено клонирование гена, кодирующего белок E2 капсида вируса диареи КРС 1-го типа, в экспрессионный вектор pET-24b(+) в клетках бактерий *E. coli*.

Ключевые слова: вирусная диарея КРС, *Pestivirus*, BVDV-1, белок E2.

Вирусная диарея – болезнь слизистых крупного рогатого скота – контагиозная болезнь, характеризующаяся эрозийно-язвенным поражением слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Возбудитель болезни – вирус, относящийся к роду *Pestivirus*, семейству *Flaviviridae*. Во внешней среде возбудитель весьма устойчив. Заражение происходит аэрогенным, алиментарным, а также половым путем. Вирус, проникший в организм, начинает размножаться и распространяться по лимфатической и кровеносной системам. Накопившийся вирус разносится по всему организму, преодолевает плацентарный барьер и вызывает аборт [1]. Выделено два биотипа вируса: цитопатогенный (CP-BVDV) и нецитопатогенный (NCP-BVDV). С помощью полимеразной цепной реакции также выделено два генотипа вируса: BVDV-1 и BVDV-2 [3]. Белок E2 оболочки BVDV индуцирует иммунный ответ организма животного, что делает возможным его использование в качестве субъединичной вакцины против вируса [2].

Объектом исследования является ген *e2p1*, кодирующий белок E2 оболочки вируса диареи крупного рогатого скота 1-го типа (BVDV-1). Последовательность гена оптимизирована для экспрессии в клетках бактерий *E. coli* (индекс адаптации кодонов (CAI) составляет 0,67) и синтезирована в виде двухцепочечного фрагмента ДНК (gBlock). Целью данной работы является клонирование нуклеотидной последовательности, кодирующей белок E2 капсида вируса диареи КРС 1-го типа, в

экспрессионный вектор для последующего получения белка в клетках бактерий *E. coli*.

Последовательность гена *e2p1*, кодирующего структурный белок E2 BVDV-1, амплифицировали с помощью разработанных праймеров BVDV1e2-F, BVDV1e2-R (таблица) при расчетных параметрах ПЦР. Данные праймеры несут сайты узнавания для рестриктаз NdeI и EcoRI для последующего встраивания в вектор pET-24b(+) (Novagen).

Последовательности праймеров BVDV1e2-F и BVDV1e2-R

Праймер	Последовательность 5'-3'	T _m , °C
BVDV1e2-F	CAGCATATGGGCCTCGACTG	60
BVDV1e2-R	CGCGAATTCATTAGCCCAAAGCTTTC	

Примечания. CATATG – сайт рестриктазы NdeI со стартовым кодоном ATG; СТАТТА – стоп-кодон; GAATTC – сайт рестриктазы EcoRI, CGC, CAG – дополнительные нуклеотиды, T_m – расчетная температура плавления праймера.

Ампликоны размером около 1150 п.н. выделяли из геля, после чего подвергали рестрикции по концевым сайтам для рестриктаз NdeI, EcoRI I и очистке путём выделения из агарозного геля.

Плазмиду pET-24b(+) также подвергали рестрикции по сайтам для рестриктаз EcoRI, NdeI и очистке путём выделения из агарозного геля.

Полученные ген и плазмиду лигировали между собой, и данной рекомбинантной плазмидой, обозначенной как pBVDV1-E2, трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-Blue.

Отбор трансформантов вели по устойчивости к тетрациклину, канамицину и налидиксовой кислоте. Проверяли клонов методом ПЦР-анализа с праймерами BVDV1e2-F, BVDV1e2-R (Рис. 1) и рестрикционным анализом рекомбинантных плазмид, выделенных из клонов (Рис. 2). В обоих случаях обнаружили фрагменты ДНК около 1150 п.н., что соответствует размеру гена *e2p1*. Также правильность вставки проверена секвенированием плазмиды pBVDV1-E2 по методу Сэнгера на коммерческой основе.

Таким образом, в клетках бактерий штамма *E. coli* XL1-Blue в составе плазмиды pET24b(+) клонирован ген *e2p1*, кодирующий капсидный белок E2 вируса диареи крупного рогатого скота 1-го типа. Результаты клонирования подтверждены ПЦР-анализом клонов и рестрикционным анализом рекомбинантных плазмид pBVDV1-E2. Правильность вставки также подтверждена секвенированием плазмиды по методу Сэнгера.

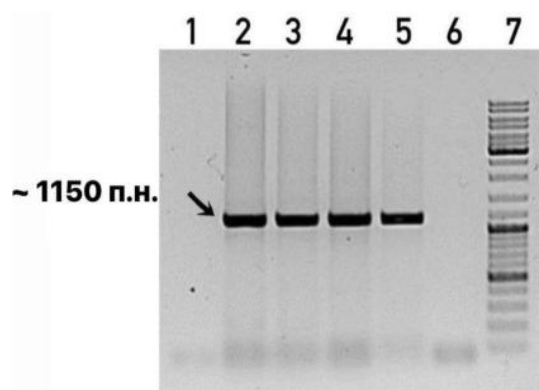


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа трансформированных клонов на наличие гена *e2p1* в составе плазмиды pBVDV1-E2:

1 – клон, не содержащий ген *e2p1*, 2–5 – клоны, содержащие ген *e2p1*, 6 – отрицательный контроль ПЦР (без ДНК-матрицы), 7– маркер Gene Ruller DNA Ladder Mix #SM0331 («Thermo Fisher Scientific Inc.»)

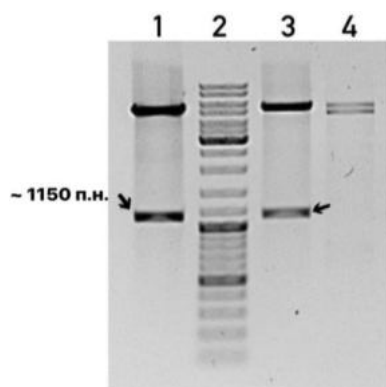


Рис. 2. Электрофореграмма результатов рестрикционного анализа рекомбинантных плазмид pBVDV1-E2, выделенных из положительных клонов:

1, 3 – плазмиды pBVDV1-E2, обработанные рестриктазами NdeI и EcoRI, 2 – маркер Gene Ruller DNA Ladder Mix #SM0331 («Thermo Fisher Scientific Inc.»), 4 – отрицательный контроль (плазмида pET-24b(+), обработанная рестриктазами NdeI и EcoRI)

Библиографические ссылки

1. Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus / Y. Li [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. Vol. 110, iss. 17. P. 6805–6810.
2. Recent Advances on the Bovine Viral Diarrhea Virus Molecular Pathogenesis, Immune Response, and Vaccines Development Round [Electronic resource] / A.A.G. Al-Kubati [et al.] // Front. Vet. Sci. 2021. Vol. 8. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.665128/full> (date of access: 12.10.2023).
3. The relationship between the viral RNA level and upregulation of innate immunity in spleen of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus / D. Yamane [et al.] // Vet. Microbiol. 2008. Vol. 129, iss. 1-2. P. 69–79.