

VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS VECTOR FOR THE RECOMBINANT EXPRESSION OF PROTEINS IN MAMMALIAN CELLS

Baltabekova A.Zh., Shagyrova Zh.S., Kim Y.G., Voikov M.S., Zhiyenbay E., Shustov A.V.

National Center for Biotechnology
13/5, Korgalzhyn Road, Astana, 010000, Kazakhstan
shustov@biocenter.kz

ABSTRACT

Venezuelan equine encephalomyelitis virus (VEE) is a well-studied member of the genus *Alphavirus* in the family *Togaviridae*. The VEE virus is a popular vector for gene delivery in cell culture as well as for heterologous expression of recombinant proteins in cultures of vertebrate and insect cells. All VEE RNA synthesis occurs in the cytoplasm and during the course of recombinant protein expression from a gene cloned into the VEE genome, a number of molecular processes are excluded, which may otherwise represent a bottleneck in the expression system. Complementary DNA (cDNA) representing the full-length VEE genome was assembled and cloned into an *Escherichia coli* plasmid under the control of the SP6 RNA polymerase promoter. The gene encoding GFP was engineered into the VEE genome under the control of a synthetic copy of a viral 26S subgenomic RNA promoter. The RNA transcript of the recombinant virus was transfected into BHK-21 cells and by 36 h post-transfection, almost all cells in the culture exhibited bright GFP fluorescence. Titres of the virus produced in the transfected culture were measured for 5 days and found to be $8.4 \cdot 10^5$ TCID₅₀ 24 h post-transfection and $2.9 \cdot 10^8$ TCID₅₀ by 3 days post-transfection.

This article illustrates the basic steps of constructing a VEE-based vector and furthermore, demonstrates the rescue of the recombinant VEE variant engineered to produce model recombinant protein GFP. The VEE vector may be applicable in biopharmaceutical production in Kazakhstan.

Keywords: alphavirus, eukaryotic expression, vector, transient expression, virus rescue, complementary DNA (cDNA)

УДК 537.6.086.83:577.21, 577.21

ВЕКТОР НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВИРУСА ВЕНЕСУЭЛЬСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА ЛОШАДЕЙ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Балтабекова А.Ж., Шагырова Ж.С., Ким Ю.Г., Войков М.С., Жиенбай Е., Шустов А.В.

Национальный центр биотехнологии
Кургальжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан
shustov@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Вирус венесуэльского энцефаломиелиита лошадей (VEE) – хорошо изученный представитель рода *Alphavirus* семейства *Togaviridae*. VEE – популярный вектор для доставки генов в культуры клеток *in vitro*, а также для экспрессии рекомбинантных белков в культурах клеток позвоночных. Синтез всех типов РНК VEE происходит в цитоплазме, поэтому в ходе продукции белка с гена, клонированного в геном VEE, исключается ряд молекулярных процессов, ограничивающих эффективность систем экспрессии с плазмид.

Из клонированных амплификатов собрана комплементарная ДНК (кДНК) полноразмерного генома VEE. Собранная кДНК клонирована в составе плазмиды *E. coli* и встроена за последовательностью промотора РНК-полимеразы фага SP6. Ген маркерного белка GFP встроен в геном VEE под контроль синтетической копии вирусного промотора 26S субгеномной РНК. РНК-транскрипт рекомбинантного вируса трансфицирован в культуру клеток ВНК-21. К 36 ч. после трансфекции почти все клетки в культуре демонстрировали яркую флуоресценцию GFP. Определяли титр вируса, продуцируемого трансфицированной культурой в течение 5 дней. Титр составил $8,4 \cdot 10^5$ ТЦПД₅₀ через 24 ч после трансфекции и вырос до $2,9 \cdot 10^8$ ТЦПД₅₀ на 3 сутки наблюдения культуры.

Данная статья иллюстрирует основные этапы создания вектора на основе генома VEE и оживления рекомбинантного варианта VEE, продуцирующего модельный белок. Описанный в статье вектор может найти применение для производства биофармацевтиков в Казахстане.

Ключевые слова: альфавирус, эукариотическая экспрессия, вектор, транзистентная экспрессия, оживление вируса, комплементарная ДНК (кДНК).

ВВЕДЕНИЕ

Технологии белковой экспрессии широко востребованы для проведения биомедицинских исследований и для промышленного производства биофармацевтических препаратов на основе рекомбинантных белков. В настоящее время большинство наименований рекомбинантных белков для медицинского применения производят в промышленности с использованием экспрессии в бактериях (в основном в *E.coli*), однако быстро увеличивается перечень продуктов, которые могут быть получены в форме фармсубстанций только в эукариотических системах экспрессии. В числе таких продуктов можно перечислить рекомбинантные человеческие: эритропоэтин (ЭПО), компоненты системы свёртываемости крови – факторы VIII, IX и тромбопластин, а также человеческие или хьюманизированные моноклональные антитела, предназначенные для введения в организм больного с лечебной целью. Перечисленные продукты промышленно производятся в культурах клеток млекопитающих [1,2]. Причинами, которые вызывают необходимость использования в промышленности культур клеток эукариот, обычно являются сложная пространственная укладка целевого белка (если правильный фолдинг данного протеина эффективно идёт только в эукариотической системе экспрессии), и необходимость обеспечить наличие в целевом белке природных посттрансляционных модификаций. Для разных терапевтических белков посттрансляционные модификации бывают критически важны, чтобы сохранить биологическую активность, увеличить время полужизни в организме, снизить иммуногенность и т.п. Некоторые посттрансляционные модификации, в особенности близкие к природному гликозилированию, могут быть получены только с использованием секреторной экспрессии в клетках млекопитающих [3].

В настоящее время в биофармацевтической промышленности существуют две традиционных стратегии для производства рекомбинантных белков. Одна стратегия предусматривает использование генетически стабильных трансформированных клеточных линий, которые производят целевой белок постоянно (конститутивная экспрессия). Вторая стратегия использует т.н. транзистентную (временную) экспрессию целевого белка [4]. В соответствии с первой стратегией ген рекомбинантного белка интегрируют в геном хозяина. Преимущество конститутивной экспрессии имеет место в случаях, когда удаётся отселектировать клеточную линию, демонстрирующую стабильную и высокую экспрессию целевого белка. Недостатком данной стратегии является то, что получение такой линии требует скрининга большего числа клонов, и само по себе является длительным и дорогим процессом [5]. Стратегия транзистентной экспрессии является более эффективной, когда целью является быстрое получение продукта или скрининг нескольких вариантов одного белка. Преимущество транзистентной экспрессии в том, что данный подход позволяет предельно сократить время создания продуцирующей культуры (до 1-14 дней) [5]. В данном подходе используют экспрессию генов, встроенных в молекулы ДНК или РНК, способных к ограниченной по времени персистенции в клетках. Это либо невирусные векторы – эукариотические плазмиды, либо неинтегрирующие (не изменяющие геном клетки-хозяина) вирусные векторы [1]. Эукариотические плазмиды популярны в качестве векторов для маломасштабной продукции в условиях лабораторных экспериментов. Для использования в промышленности плазмидная экспрессия имеет существенные недостатки, среди которых низкая пригодность метода трансфекции для больших количеств клеток и быстрое уменьшение количества белков, продуцируемых с генов, закодированных в плаزمиде [6].

Использование экспрессионных векторов на основе вирусов позволяет создавать очень эффективные системы экспрессии. Также применение инфекции вирусом вместо трансфекции ДНК или РНК позволяет чрезвычайно упростить и удешевить процесс получения продуцирующих культур и получать продуцирующие культуры в неограниченных объёмах. Важным преимуществом использования вирусов в качестве векторов является то, что с их помощью можно получить более высокие уровни экспрессии, чем описанные как для плазмидных векторов, так и для стабильных клеточных линий. Многие вирусы в ходе внутриклеточной репликации блокируют трансляцию клеточных белков и транскрипцию клеточных информационных РНК. В природе этот механизм увеличивает производство вирусных белков за счёт переключения белок-синтезирующего аппарата клетки на трансляцию только вирусных мРНК. Этот же механизм можно использовать для увеличения продукции целевого белка, который транслируется с гена, встроенного в вирусный геном.

Среди вирусов наиболее часто для экспрессии белков в культурах клеток млекопитающих используют вирус осповакцины [7], аденовирус [8], альфавирусы – представители рода *Alphavirus*, такие как вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей (*Venezuelan equine encephalomyelitis virus*, VEE), вирус Синдбис и вирус Леса Семлики [9]. Системы экспрессии на основе бакуловируса (вирус насекомых), обычно используемые для производства белков в клетках насекомых [10,11], также эффективно работают в клетках млекопитающих [12].

Привлекательность альфавирусов в качестве векторов вызвана следующими свойствами: 1) альфавирусы демонстрируют разнообразный хозяйский и тканевый тропизм, который проявляется в способности размножаться в широком спектре клеточных линий, в том числе линий, которые уже используются в биофармацевтической промышленности; 2) активная репликация альфавирусов сопровождается синтезом большого количества белков, закодированных в вирусных РНК; 3) небольшой геном альфавирусов позволяет создавать вирусы-продуценты с применением простых генно-инженерных методов (гидролиз рестриктазами и лигирование) и без необходимости в гомологической рекомбинации (последняя требуется при работе с векторами на основе вируса осповакцины или бакуловируса); 4)

геномные РНК альфа-вирусов являются инфекционными при трансфекции, что означает возможность оживления вируса с кДНК-копии генома путём трансфекции *in vitro* синтезированных РНК. Возможность оживления вируса-продуцента из кДНК-копии имеет значение для эффективного использования экспрессионной системы в промышленности. Легко в маломасштабном лабораторном эксперименте получить потомство альфа-вируса с высоким титром, и затем использовать полученный вирусный урожай для заражения клеточной культуры в большом объёме, в т.ч. в промышленном биореакторе.

В статье описаны сборка из фрагментов кДНК-копии полноразмерного генома VEE, получение рекомбинантного вируса, продуцирующего зелёный флуоресцентный белок в ходе внутриклеточной репликации, получение вирусного потомства из кДНК-копии генома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованная коллекция плазмид

Использованные в качестве источников фрагментов генома VEE плазмиды были получены в 2008-2010 гг. путём клонирования ПЦР-амплификатов, синтезированных с помощью ОТ-ПЦР на матрице вирусной РНК. В данной коллекции плазмид клонированы фрагменты генома VEE штамм TC-83 (последовательность полноразмерного генома имеется в базе GenBank, Accession# L01443). Амплификаты были клонированы в вектор для промежуточного клонирования pRS2 по тупым концам (по сайту EcoRV).

Генно-инженерные методы

Плазмидные ДНК выделяли методом щелочного лизиса. Для этого клетки *E.coli* штамма DH5a, трансформированные целевой плазмидой, засеивали в 200 мл среды LB и растили культуру в течение 10-12 ч. Биомассу бактерий осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин), осадок ресуспендировали в 10 мл буфера I (50 мМ глюкоза; 25 мМ Трис pH 8,0; 10 мМ ЭДТА; 5 мг/мл лизоцим). Добавляли 20 мл раствора II (0,2М NaOH; 1% SDS). Инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Добавляли 15 мл раствора III (3М ацетат калия pH5,5), инкубировали 15 минут на льду. Далее смесь центрифугировали (6000 об/мин, 10 минут). К супернатанту добавляли 1 объем изопропанола и после 15 минут инкубации при -20°C осаждали ДНК центрифугированием (6000 об/мин, 10 минут, 4°C). Осадок растворяли в 1 мл буфера TE (10 мМ Трис pH 7,2; 1 мМ ЭДТА). Плазмиду очищали методом ультрацентрифугирования в градиенте хлористого цезия (CsCl). В оттарированной пробирке смешивали 4,8 г сухого CsCl с 1 мл раствора плазмиды в буфере TE, добавляли 50 мкл раствора бромистого этидия (10 мг/мл) и добавляли TE до общего веса смеси 9,1 г. Смесь перемешивали до полного растворения CsCl и переносили в пробирки PAUltracrimptube (ThermoFisherScientific). Пробирки упаковывали в ротор T-890 и подвергали ультрацентрифугированию при 65000 об/мин, 20°C в течение 16-18 ч. Отбирали бендплазмидной ДНК и избавляли плазмиду от примесей CsCl и EtBr спиртовыми осаждениями и экстракцией смесью фенол-хлороформ.

Гидролиз плазмидрестриктазами проводили в объёме 50 мкл, содержащем 1X рестриктный буфер согласно рекомендациям производителя рестриктаз (ThermoFisherScientific), 5 мкг плазмидной ДНК, по 10 е.а. каждой из используемых рестриктаз. Реакцию гидролиза проводили в течение 3 ч. при температуре, рекомендованной для используемых ферментов. После гидролиза продукты реакции разделяли в 1% геле легкоплавкой агарозы. Электрофорез проводили в буфере TAE (0,04М Трис pH 8,1; 20 мМ ацетат натрия; 0,002 М ЭДТА) с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Для выделения фрагментов ДНК из геля использовали метод экстракции горячим фенолом. Полосу, содержащую нужный фрагмент, вырезали из геля и расплавляли при 65°C . К расплавленной агарозе добавляли равный объём фенола, насыщенного буфером TE pH8,0. Интенсивно перемешивали на встряхивателе и центрифугировали при 7000g, 10 мин. Водную фазу переносили в новую пробирку и экстрагировали хлороформом. ДНК осаждали из водного раствора этанолом. Осадок ДНК растворяли в высокочистой воде.

Для лигирования выделенных фрагментов ДНК использовали ДНК-лигазу фага T4 (ThermoFisherScientific). Реакцию лигирования проводили в буфере производителя в течение 10-12 ч. при $+16^{\circ}\text{C}$. Для трансформации клеток *E.coli* использовали хемокомпетентные клетки, которые готовили по протоколу с RbCl-CaCl₂. Эффективность трансформации составляла $\sim 10^8$ трансформантов на 1 мкг суперскрученной ДНК. Секвенирование проводили с использованием наборов BigDye 3.1 (AppliedBiosystems, США) на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100.

Синтез РНК *in vitro*

Плазмиду, несущую клонированную кДНК-копию генома рекомбинантного вируса, в количестве 5 мкг обрабатывали рестриктазой MluI, которая линеаризует плазмиду. ДНК экстрагировали смесью фенол-хлороформ и осаждали спиртом. Реакционная смесь для синтеза РНК состоит из 12,5 мкл воды; 10 мкл 5X буфера для SP6 РНК-полимеразы; 5 мкл 10 мМ раствора ДТТ; 2,5 мкл 10 мМ раствора синтетического аналога структуры кэпа (m7G(5')ppp(5')G), 10 мкл 10 мМ раствора рибонуклеозидтрифосфатов (rNTP), 10 мкл раствора линеаризованной ДНК в воде (200 нг/мкл). К смеси добавляли 1 мкл ингибитора РНКаз (RiboLock, ThermoFisherScientific) и 2,5 мкл SP6 РНК-полимеразы (ThermoFisherScientific). Смесь

инкубировали при 41°C в течение 1 ч. Для подтверждения эффективного синтеза аликвоту реакционной смеси исследовали гель-электрофорезом в 1% агарозе.

Трансфекция РНК и оживление вирусного потомства

Культуру клеток ВНК-21 выращивали в питательной среде MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 1% коммерческого р-раGlutamax (Invitrogen) и 1% коммерческой смеси антибиотиков пенициллин/стрептомицин (Invitrogen). Трансфекции РНК подвергали культуру, достигшую конфлюэнтности 70-90% (обычно 5×10^5 клеток в лунке 6-луночного планшета). Трансфекцию проводили с помощью катионных липосом (реагент Lipofectamine 2000, LifeTechnologies). Растворяли 25 мкл Lipofectamine 2000 в 100 мкл среды OriMEM. К 250 мкл среды OriMEM добавляли 5 мкл синтезированной РНК (60 нг/мкл). Смешивали раствор РНК с раствором липофектамина, перемешивали, инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Добавляли РНК-липидный комплекс к монослою клеток, промытому PBS. Трансфецированную культуру инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 5 суток, через каждые 24 ч. среду с трансфецированной культуры собирали и заменяли на свежую. Собранные пробы среды хранили при -80°C для исследования на содержание вируса.

Определение титра вируса по Риду-Менчу

Титрование вируса по Риду-Менчу проводили в 96-луночных культуральных планшетах. В каждую лунку вносили 10^5 клеток ВНК-21 и инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе, визуально контролируя плотность культуры – до тех пор, пока клетки не образуют монослой с конфлюэнтностью ~80%. В восьми пробирках готовили десятикратные разведения исходного препарата вируса (т.е. разведения $10^{-1} \dots 10^{-8}$). Разведения готовили в PBS, содержащем 1% FBS, присутствие сыворотки необходимо для предотвращения неспецифической адсорбции вируса на стенки носиков и культуральной посуды. С помощью 8-канального дозатора вносили раствор вируса в лунки планшета, по 25 мкл разведения на лунку. Одним и тем же разведением инфицировали 12 лунок в одном ряду. Таким образом, восемь десятикратных разведений использовали для инфицирования рядов планшета А-Н. Планшет после внесения инфицирующих доз инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 48 ч., периодически просматривая монослои в лунках на флуоресцентном микроскопе. Проводили подсчёт количества инфицированных и неинфицированных лунок в каждом ряду (А-Н). Титр вируса в единицах ТЦПД₅₀ (50% тканевая цитопатическая доза) вычисляли по формуле Рида-Менча.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сборка протяжённых фрагментов кДНК-копии генома VEE

В качестве источника исходных фрагментов генома VEE использованы семь плазмид, названия и характеристики которых приведены в таблице 1.

Таблица 1. Исходный генетический материал для сборки генома VEE

Table 1. The initial library of DNA fragments utilized to assemble the VEE genome

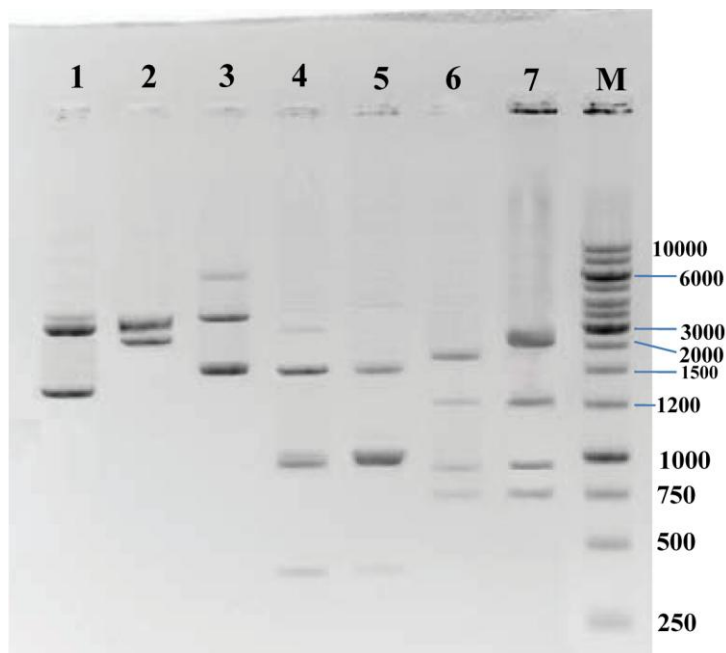
Название клона Clone name	Парарестриктаз (положение ¹) A pair of restriction enzymes ¹	Длина вставки ² Insert length ²
A.bs	BspEI(312) – SalI(1621)	1309 пн
B.sb	SalI(1621) – BlnI(3748)	2127 пн
C.bn	BlnI(3748) – NheI(5329)	1581 пн
D.na	NheI(5329) – AclI(6418)	1089 пн
E.ap	AclI(6418) – PspOMI(7502)	1084 пн
F.pa	PspOMI(7502) – ApaLI(9221)	1719 пн
G.as	ApaLI(9221) – SphI(11382)	2161 пн

Примечания: ¹ для каждого сайта рестрикции указано положение сайта на последовательности TC-83;
² указана длина вставки, вырезаемой соответствующей парой рестриктаз.

Notes: ¹ for each restriction site its position is indicated in the sequence of TC-83;
² length of fragment cut out with the indicated pair of restriction enzymes.

Праймеры для синтеза ПЦР-амплификатов, клонированных в исходных плаزمиде (таблица 1), были подобраны таким образом, чтобы на 5'-концах праймеров были сайты рестрикции, с небольшой частотой присутствующие в геноме VEE. Благодаря рациональному выбору праймеров, накрывающих сайты рестрикции, фрагменты VEE могут быть вырезаны путём обработки выбранными рестриктазами (рисунок 1). Имеющаяся клонотека позволяет осуществить сборку почти полноразмерного генома VEE: от сайта

BspEI (позиция в геноме: 312 нт) до сайта SphI (11382 нт), что соответствует 96,7% полной длины вирусного генома.



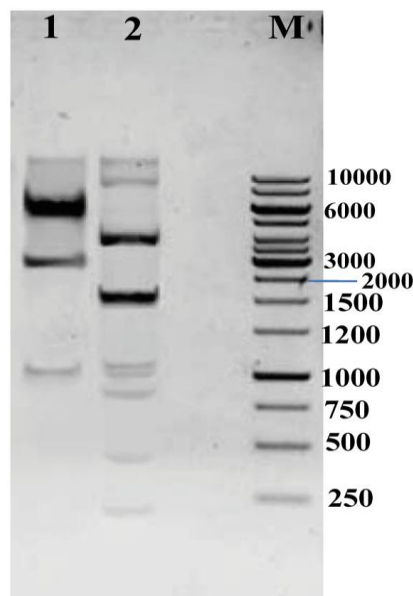
Дорожка 1– гидролиз плазмиды A.bs парой рестриктаз BspEI+SalI приводит к появлению трёх фрагментов: 2982 пн, 1309 пн и 34 пн; дорожка 2– гидролиз плазмиды B.sb парой SalI+BlnI (три фрагмента: 2982 пн, 2127 пн и 34 пн); дорожка 3– гидролиз C.bn парой BlnI+NheI (два фрагмента: 3017 пн и 1581 пн); дорожка 4– гидролиз D.na парой NheI+AclII (четыре фрагмента: 1579 пн, 1089 пн, 1063 пн и 373 пн); дорожка 5– гидролиз E.ap парой AclII+PspOMI (пять фрагментов: 1580 пн, 1084 пн, 1016 пн, 373 пн и 48 пн); дорожка 6– гидролиз F.pa парой PspOMI+ApaLI (пять фрагментов: 1719 пн, 1246 пн, 948 пн, 775 пн и 47 пн); дорожка 7– гидролиз G.as парой ApaLI+SphI (пять фрагментов: 2161 пн, 1246 пн, 964 пн, 771 пн и 31 пн). Дорожка M – маркер O'GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

Рис. 1. Рестриктный анализ плазмид из исходной клонотеки

Lane 1– hydrolysis of plasmid A.bs with a pair of restriction enzymes BspEI+SalI leads to appearance of three fragments: 2982 bp, 1309 bp and 34 bp; lane 2– hydrolysis of B.sb with SalI+BlnI (three fragments: 2982 bp, 2127 bp and 34 bp); lane 3– hydrolysis of C.bn with BlnI+NheI (two fragments: 3017 bp and 1581 bp); lane 4– hydrolysis of D.na with NheI+AclII (four fragments: 1579 bp, 1089 bp, 1063 bp and 373 bp); lane 5– hydrolysis of E.ap with AclII+PspOMI (five fragments: 1580 bp, 1084 bp, 1016 bp, 373 bp and 48 bp); lane 6– hydrolysis of F.pa with PspOMI+ApaLI (five fragments: 1719 bp, 1246 bp, 948 bp, 775 bp and 47 bp); lane 7– hydrolysis of G.as with ApaLI+SphI (five fragments: 2161 bp, 1246 bp, 964 bp, 771 bp and 31 bp). Lane M – O'GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

Fig. 1. Restriction analysis of plasmids from the initial library

На первом этапе генно-инженерных работ провели сборку центральной части генома. Для этого вырезали вставки из четырёх клонов: B.sb(SalI-BlnI), C.bn(BlnI-NheI), D.na(NheI-AclII) и E.ap(AclII-PspOMI) и лигировали их в одной реакционной смеси с вектором pRS2, обработанным рестриктазами SalI и PspOMI. В результате были получены клоны, обозначенные H.sp. Клоны H.sp содержат фрагмент SalI-PspOMI– это 5887 пн VEE-специфической последовательности. Правильность сборки проверяли рестриктным анализом (рисунок 2).



Дорожка 1– гидролиз плазмидной ДНК клона H.sp смесью рестриктазSalI+PspOMI приводит к появлению четырёх фрагментов: 5881 пн, 2935 пн, 1027 пн, и 46 пн; дорожка 2– гидролиз H.sp парой AclI+NheI (семь фрагментов: 4770 пн, 1578 пн, 1089 пн, 1029 пн, 817 пн, 373 пн и 233 пн). Дорожка М – маркер O'GeneRuler 1kb

Рис. 2.Рестриктный анализ плазмидыH.sp

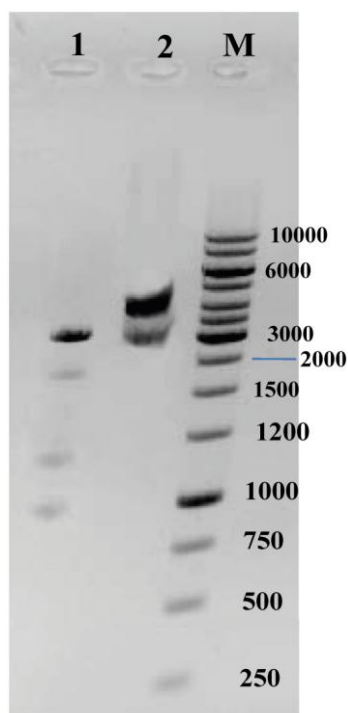
Lane 1– hydrolysis of plasmid H.sp with a pair of restrictasesSalI+PspOMI leads to appearance of four fragments: 5881 bp, 2935 bp, 1027 bp, and 46 bp; lane 2– hydrolysis of H.sp with AclI+NheI (seven fragments: 4770 bp, 1578 bp, 1089 bp, 1029 bp, 817 bp, 373 bp and 233 bp). Lane M – O'GeneRuler 1kb.

Fig. 2.Restriction analysis of plasmid H.sp

Был проведен синтез из олигонуклеотидов *denovo* фрагментов генома VEE, не представленных в лабораторной коллекции плазмид, а именно 5'- и 3'-концов генома. Фрагмент генома от первого нуклеотида 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) до первого сайта BspEI в геноме VEE длиной 416 пн был синтезирован методом конструктивной ПЦР. Начало вирусного генома встроено под контроль промотора РНК-полимеразы фага SP6 (ATTTAGGTGACACTATAG), в результате чего возможен синтез геномной РНК вируса *in vitro* с использованием РНК-полимеразы SP6. Рассчитанная последовательность включает также фрагмент плазмиды pRS2 от сайта AasI до начала полилинкера. Сайт AasI является уникальным для синтезированного фрагмента и необходим для сборки финальной генно-инженерной конструкции. Фрагмент 416 пн был клонирован в вектор pGEM-T, в результате чего были получены клоны, обозначенные U.ab. Секвенирование вставок подтвердило соответствие синтезированного фрагмента AasI-BspEI расчетной последовательности. Фрагмент AasI+BspEI был вырезан из клона U.ab. Одновременно был проведён гидролиз клона A.bs по сайтам BspEI+SalI. Вырезанные фрагменты ДНК лигировали в плазмиду pRS2 по сайтам AasI и SalI. В результате такого клонирования была получена плазмидарS-UTR, в которой имеется последовательность генома VEE от первого нуклеотида до уникального сайта SalI.

Фрагмент 3'-конца генома VEE от сайта SphI до начала сигнала полиаденилирования был собран путём достройки недостающей последовательности путём ПЦР-амплификации вставки из клона G.as с использованием протяжённых праймеров. Геномные РНК альфавирусов, включая VEE, полиаденилированы. В экспериментах по трансфекции репликонных РНК, синтезированных *in vitro*, такие РНК должны быть полиаденилированы для выживания в клетке. Для обеспечения эффективного полиаденилирования было решено синтезировать на 3'-конце вирусного генома олиго-А хвост. Для того чтобы с использованием синтеза *in vitro* получать вирусную РНК с правильным (пригодным для полиаденилирования) 3'-концом, после олиго-А тракта был встроены уникальный сайт для линейаризации MluI. В геноме штамма TC-83 нет сайтов MluI, поэтому генно-инженерные сборки, несущие полноразмерный вирусный геном, возможно лианеризовать по сайту MluI.

Фрагмент 3'-конца генома VEE клонирован в вектор pGEM-T, в результате получены клоны, обозначенные 3Uend.am. Фрагмент ApaLI-MluI был вырезан из плазмиды 3Uend.am и смешан в лигазной смеси с фрагментом PspOMI-ApaLI из ДНК клона F.pa(PspOMI-ApaLI) и вектором pRS2, обработанным рестриктазами PspOMI и MluI. В результате были получены клоны, обозначенные I.pm. Вставка в клон I.pm, вырезаемая по сайтам PspOMI-MluI, представляет собой конец генома VEE. Клоны I.pm содержат в общей сложности 3972 пн VEE-специфической последовательности. Правильность сборки проверяли рестриктным анализом с использованием рестриктаз PspOMI, ApaLI и MluI (рисунок 3).



Дорожка 1– гидролиз плазмидной ДНК клона I.pm смесью рестриктазApaLI и PspOMI приводит к появлению пяти фрагментов: 3027 пн, 1719 пн, 1246 пн, 948 пн и 42 пн; дорожка 2– гидролиз I.pm парой PspOMI+MluI (четыре фрагмента: 3972 пн, 2911 пн, 57 пн и 42 пн). Дорожка М – маркер O'GeneRuler 1kb

Рис. 3.Рестриктный анализ плазмиды I.pm

Lane 1– hydrolysis of plasmid DNA from clone I.pm with a pair of restrictasesApaLI and PspOMI leads to appearance of five fragments: 3027 bp, 1719 bp, 1246 bp, 948 bp and 42 bp; lane 2– hydrolysis of I.pm with PspOMI+MluI (four fragments: 3972 bp, 2911 bp, 57 bp and 42 bp). Lane M – O'GeneRuler 1kb

Fig. 3. Restriction analysis of plasmid I.pm

Сборка полноразмерного генома VEE

ДНК плазмиды RS-UTR гидролизовали по сайтам SalI и MluI в присутствии фосфатазы FastAP. Рестриктную смесь разделяли на геле легкоплавкой агарозы и выделяли фрагмент длиной 3447 пн. Полученный продукт использовали в качестве вектора для клонирования. Указанный вектор смешивали в лигазной смеси с фрагментами вставок из клонов H.sp(SalI-PspOMI) (5881 пн) и I.pm (PspOMI-MluI) (3972 пн). В результате трансформации были получены клоны, содержащие полноразмерный геном VEE. Клоны получили название pVEE-TC83. Генетическая карта плазмиды pVEE-TC83 показана на рисунке 4.

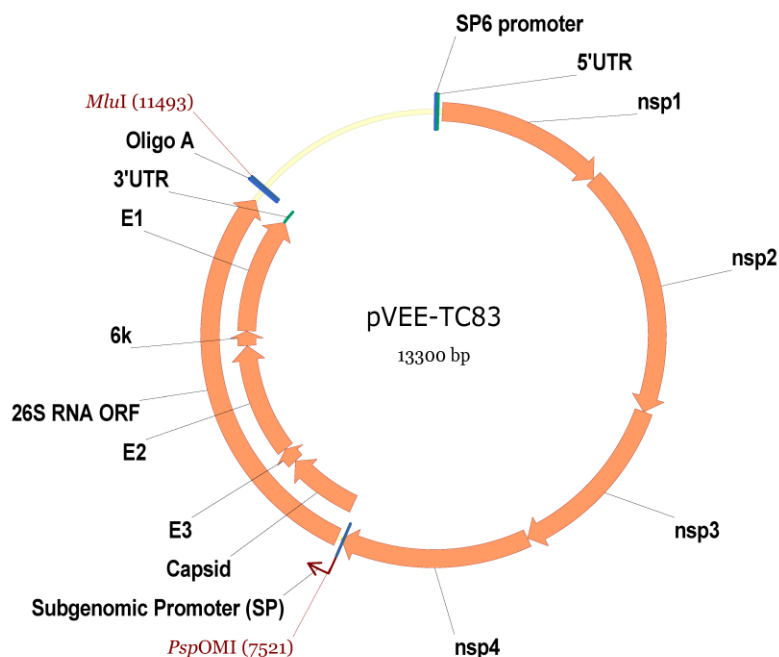
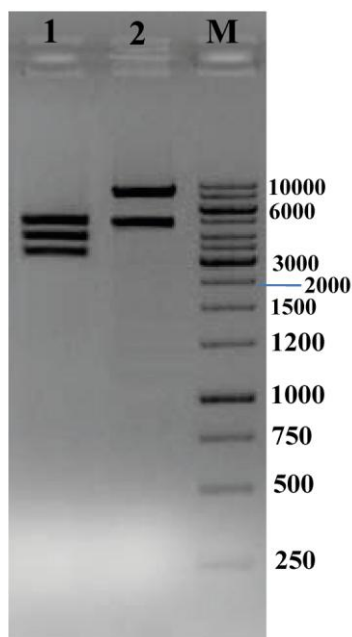


Рис. 4. Генетическая карта плазмиды pVEE-TC83, содержащей полноразмерный геном VEE

Fig. 4. Genetic map of plasmid VEE-TC83 which contains the full-length VEE genome

Результаты рестриктного анализа плазмиды pVEE-TC83 представлены на рисунке 5.



Дорожка 1– гидролиз плазмиды pVEE-TC83 смесью рестриктаз PspOMI+MluI+SalI, фрагменты имеют длины 5881 пн, 3972 пн и 3447 пн; дорожка 2– гидролиз рестриктазами PspOMI+MluI (фрагменты 9328 пн и 3972 пн). Дорожка М – маркёр O'GeneRuler 1kb

Рис. 5.Рестриктный анализ плазмиды pVEE-TC83, несущей полноразмерный геном VEE

Lane 1– hydrolysis of the plasmid pVEE-TC83 with a mixture of restriction endonucleases PspOMI+MluI+SalI, fragments are 5881 bp, 3972 bp and 3447 bp; lane 2– hydrolysis of the same plasmid with PspOMI+MluI (fragments 9328 bp and 3972 bp). Lane M – O'GeneRuler 1kb

Fig. 5.Restriction analysis of the plasmid pVEE-TC83 which contains the full-length VEE genome

Сборка генома VEE со вставкой гена зелёного флуоресцентного белка (GFP)

Для удобства слежения за репликацией вируса в культуре клеток в состав генома будущего экспрессионного вектора был встроен ген GFP. Появление флуоресценции GFP в трансфицированных клетках доказывает внутриклеточную репликацию вирусного генома, а увеличение доли флуоресцирующих клеток доказывает инфекционное распространение вируса. Для того чтобы в ходе репликации в трансфицированных или инфицированных клетках синтезировалась мРНК, направляющая трансляцию GFP, ген флуоресцентного маркера был встроен под контроль новой (дополнительной) копии промотора 26S субгеномной РНК. Ген GFP был амплифицирован из коммерческой плазмиды pIRES2-EGFP (Clontech). Для данного ПЦР использованы протяжённые праймеры, такие чтобы дополнить открытую рамку считывания GFP с 5'-конца последовательностью промотора 26S РНК и добавить на концах амплификата сайты рестрикции XbaI и Tth111I. Последовательность амплифицированного фрагмента ДНК показана на рисунке 6.

```

caagTCTAGAgcttgcgcgccaccATGgtgagcaaggcgaggagctgttcaccgggggtggtgccc
tcctggtcgagctggacggcgacgtgaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcg
atgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggc
ccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgctgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagc
agcacgacttcttcaagtccgcatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaagg
acgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcg
agctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactaca
acagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatcc
gccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcgggcg
acggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcggccctgagcaaaagacccca
acgagaagcgcgatcacatggctcctgctggagttcgtgaccgcccgggatcactctcggcattgg
acgagctgtacaagTAAagcggcccaatgatccgaccagcaaaactcgatgtacttccgaggaact
gatgtgcataagcccctataactctctacggctaacctgaatggactacGACataGTCtagt

```

Открытая рамка считывания гена GFP подчёркнута. Стартовый кодон ATG и терминирующий кодон TAA показаны прописными буквами. Сайты XbaI (TCTAGA) и Tth111I (GACNNNGTC) показаны жирным шрифтом и прописными буквами

Рис. 6. Ген GFP, подготовленный для встройки в геном VEE

Open reading frame of the GFP gene is underlined. The ATG start codon and the stop codon TAA are shown in capital letters. XbaI site (TCTAGA) and Tth111I site (GACNNNGTC) are shown in bold and capital letters.

Fig. 6. Gene encoding the GFP with additional sequences for incorporation into the VEE genome

Для встройки GFP в геном VEE были использованы сайты рестрикции XbaI и Tth111I (в гене GFP) и сайты XbaI, Tth111I и EcoRI (в плазмиде pVEE-TC83). В геноме VEE два сайта XbaI, но один из них (в гене структурных белков) неактивен в плаزمиде *E.coli*DAM+ из-за DAM-метилирования; второй сайт XbaI активен и находится в положении, удобном для проведения встроек генов под контролем новой копии промотора 26S РНК. В геноме VEE единственный сайт Tth111I находится по центру промотора субгеномной РНК, и не может быть использован для прямой вставки гена GFP в правильной ориентации. Сайт EcoRI уникальнй. Для того чтобы осуществить нужную встройку, было проведено двухфрагментное клонирование. Вектор, приготовленный из плазмиды pVEE-TC83 путём гидролиза рестриктазами Tth111I+EcoRI (7892 пн), был смешан в лигазной смеси с фрагментом EcoRI+XbaI (5426 пн) из плазмиды pVEE-TC83 и фрагментом XbaI+Tth111I (840 пн, ген GFP). В результате трансформации хемокомпетентных клеток и отбора клонов была получена плазида pVEE-TC83/GFP, генетическая карта которой представлена на рисунке 7.

Всего в геноме VEE-TC83/GFP две копии субгеномного промотора: первая копия направляет синтез субгеномной РНК, с которой транслируется ген GFP; вторая копия направляет синтез более короткой субгеномной РНК, с которой транслируются структурные белки, необходимые для формирования вирусных частиц.

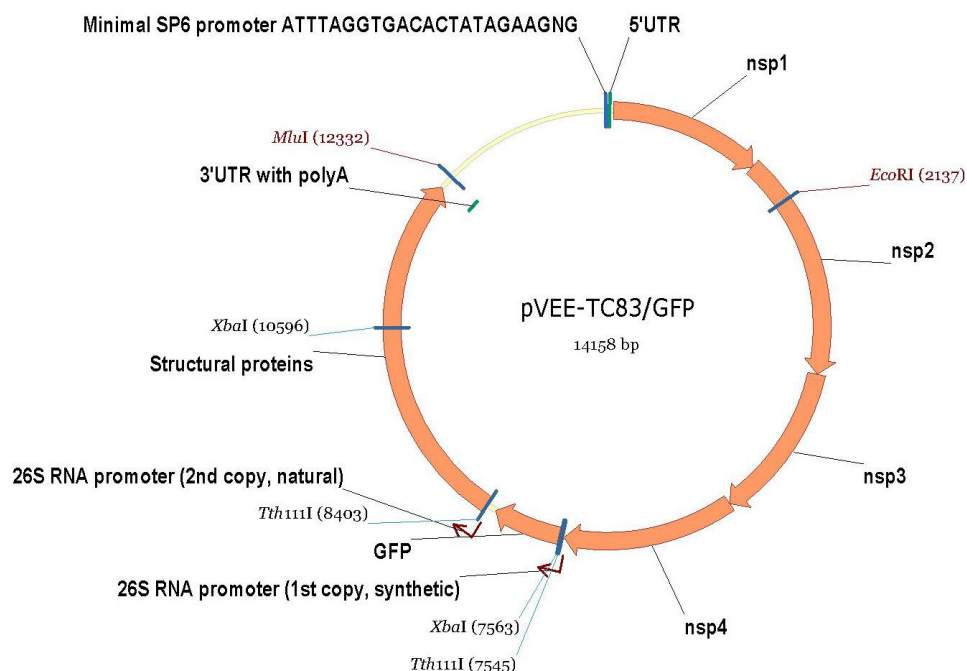
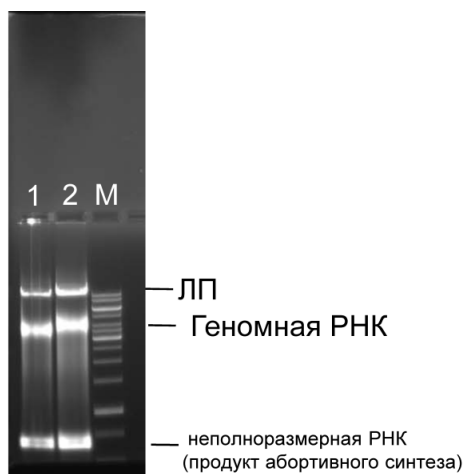


Рис. 7. В геноме VEE-TC83/GFP ген GFP встроен под контроль новой копии промотора 26S субгеномной РНК

Fig. 7. In the genome VEE-TC83/GFP the GFP gene is cloned under the control of a new copy of the 26S subgenomic RNA promoter

Получение жизнеспособного вируса из кДНК-копии генома

Плазмиду VEE-TC83/GFP гидролизовали рестриктазой MluI, и линейаризованную плазмиду использовали для синтеза *in vitro* геномной РНК вируса. Результаты синтеза РНК представлены на рисунке 8. В ходе гель-электрофореза в 1% агарозе бенд полноразмерной геномной РНК (длиной 12332 нт) имеет подвижность, примерно соответствующую подвижности бендов ДНК маркера 2,5-3 тыс. пн (рисунок 8). Высокая подвижность бенда РНК объясняется компактной пространственной укладкой молекулы РНК.



ЛП – линейаризованная плаزمида; М – маркёр O'GeneRuler 1kb. Указаны бенды линейаризованной плазмиды, полноразмерной геномной РНК и неполноразмерной РНК, которая представляет собой побочный продукт синтетической реакции

Рис. 8. Результаты синтеза *in vitro* РНК вирусов VEE-TC83 (дорожка 1) и VEE-TC83/GFP (дорожка 2)

LP – linearized plasmid; M – DNA ladder O'GeneRuler 1kb. Depicted are bends of the linearized plasmid, of the full-length genomic RNA, and of the additional short RNA species which is a by-product of the synthetic reaction

Fig. 8. Results of the *in vitro* synthesis of genomic RNAs of viruses VEE-TC83 (lane 1) and VEE-TC83/GFP (lane 2)

РНК вируса VEE-TC83/GFP (~300 нг) трансфецировали в культуру клеток ВНК-21 с использованием липофектамина. Уже через 18 ч после трансфекции при наблюдении в инвертированном флуоресцентном микроскопе наблюдали появление у большей части клеток в культуре флуоресценции GFP, что означает продукцию GFP с реплицирующегося генома. Через 36 ч. после трансфекции все клетки в культуре демонстрировали свечение GFP. Фотография культуры на 36 ч после трансфекции приведена на рисунке 9.

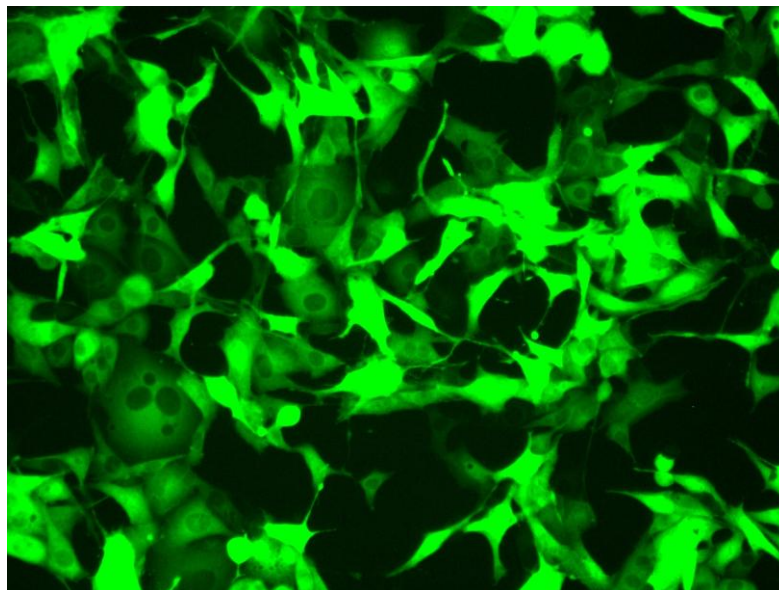


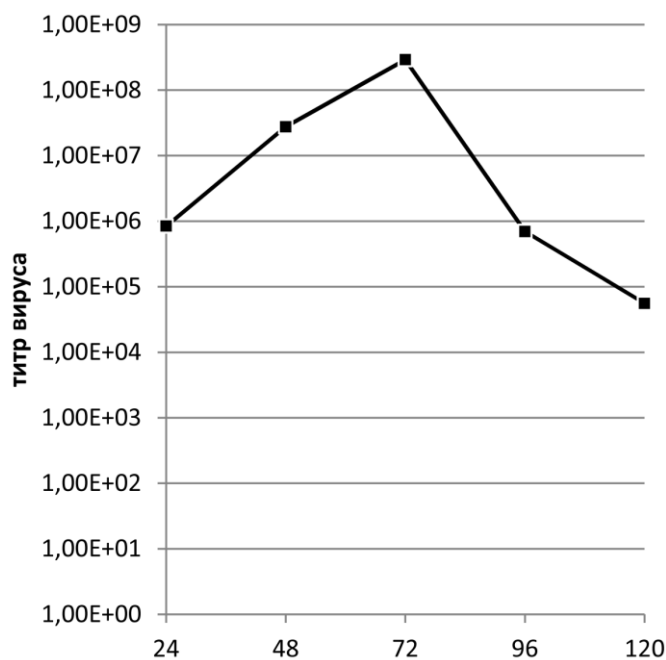
Рис. 9. Культура клеток ВНК-21, трансфецированная РНК вируса VEE-TC83/GFP

Fig. 9. Cell culture BHK-21 transfected with the VEE-TC83/GFP RNA

Вирусный вектор VEE-TC83/GFP достигает высоких титров

Пробы культуральной среды, содержащей вирус VEE-TC83/GFP, исследовали в эксперименте по титрованию вируса методом Рида-Менча. Метод титрования по Риду-Менчу использует серийные разведения исходного препарата жидкого вирусосодержащего материала и заражение каждым разведением определённого количества (серии) тестовых лунок (заражают монослои в лунках 96-луночного культурального планшета). В малых разведениях все лунки в одной серии оказываются инфицированы (клетки в инфицированных лунках демонстрируют флуоресценцию GFP). В разведениях существенно больше, чем лимит разведения (т.е. когда в инфицирующей дозе меньше одной инфекционной частицы), все лунки оказываются неинфицированными, потому что ни в одну из них не попадает инфекционный вирион. Также можно найти такое разведение исходного препарата вируса, при котором примерно половина лунок в одной серии оказываются инфицированными. Расчётный метод Рида-Менча использует такие разведения для определения титра вируса, который выражается в количестве 50%-ных тканевых цитопатических доз (ТЦПД₅₀). Одна единица ТЦПД₅₀—это доза инфекционного агента, инфицирующего 50% клеточной культуры. Для альфавирусов титр, выраженный в ТЦПД₅₀, примерно равен физическому титру, измеряемому в количестве вирусных частиц в 1 мл. Титр вируса VEE(L)/Cm-GFP определили в пробах среды, которые собирали через каждые 24 ч. в течение 5 дней. Титр составил $8,4 \cdot 10^5$ ТЦПД₅₀ через 24 ч. после трансфекции и вырос до $2,9 \cdot 10^8$ ТЦПД₅₀ на 3 сутки наблюдения культуры. В ходе дальнейшей инкубации продукция вируса снизилась, видимо, из-за ограниченного цитотоксического действия вируса.

Кривая роста вируса (зависимость титра от времени наблюдения) приведена на рисунке 10.



По оси абсцисс – время наблюдения культуры после трансфекции, в часах; по оси ординат – титр вируса в единицах ТЦПД₅₀

Рис. 10. Кривая роста вирусного вектора VEE-TC83/GFP

The x-axis represents time upon transfection, in hours; the y-axis is the viral titer, in TCID₅₀ units

Fig. 10. Growth curve of the virus VEE-TC83/GFP

Для генетической инженерии вирусы являются замечательными инструментами для доставки генов в клетки и для экспрессии рекомбинантных белков. Многие вирусы имеют небольшие и простые геномы, позволяющие создавать экспрессионные системы с использованием широкоизвестных и стандартных генно-инженерных методов. Альфавирусы могут инфицировать широкий спектр клеток позвоночных и беспозвоночных животных, что позволяет производить рекомбинантные белки в различных линиях эукариотических клеток. Молекулярные механизмы биологии альфавирусов хорошо изучены, что также способствует успеху в создании систем экспрессии. Синтез РНК альфавирусов, включая субгеномную РНК, происходит в цитоплазме, поэтому исключается ряд молекулярных процессов, ограничивающих эффективность систем экспрессии с ДНК, таких как сплайсинг, редактирование, полиаденилирование и транспорт мРНК из ядра.

Для ряда рекомбинантных белков разработаны эффективные системы экспрессии с использованием геномов альфавирусов в качестве векторов. Такие системы обеспечивают большие выходы рекомбинантного белка с единицы площади монослоя, чем достижимо для плазмидных векторов. Например, вставка гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (CAT) в геном вируса Синдбис привела к продукции 10^8 молекул CAT на клетку, в результате чего содержание CAT в цитоплазме достигло 3% от общего клеточного белка. Уровень продукции бета-галактозидазы в ходе экспрессии с использованием репортёрного гена LacZ, встроенного в геномы VEE или вируса Синдбис, составил 60-100 мкг на 10^6 клеток. Это очень высокий уровень экспрессии, и он может быть увеличен ещё в десять раз путем слияния гена целевого белка с т.н. трансляционным энхансером, который представляет собой шпилечную структуру, образованную первыми 102 нт гена белка капсида VEE. Трансляционный энхансер использован в альфавирусных векторах для экспрессии на высоком уровне гликопротеинов VEE, антигена ВИЧ (HIV) и различных цитокинов [13-16].

Выпускаются коммерчески доступные наборы для экспрессии белков с использованием альфавирусных векторов, например, система производства Invitrogen, использующая геном вируса Синдбис, и набор от Gibco, в котором используется геном вируса Леса Семлики. Обе системы предусматривают оживление рекомбинантных вирусов путём трансфекции РНК-транскриптов, синтезированных *in vitro* с использованием РНК-полимеразы SP6. В качестве клеточной культуры для оживления вируса обычно используется линия ВНК-21, которая хорошо трансфецируется и поддерживает репликацию альфавирусов с достижением высоких титров. Вирус начинает производиться в среду инкубации трансфецированной культуры уже через 4-8 ч. после трансфекции. Собранный вирусный урожай используют для заражения различных клеточных линий. Инфицирование вирусом-продуцентом клеточной культуры – процесс быстрый, эффективный и дешёвый, и он не имеет ограничений на количество инфицируемых клеток, в связи с чем привлекателен для

промышленности. Продукт экспрессии выделяют уже через 24-72 ч. после заражения продуцирующей культуры.

Данная статья иллюстрирует основные этапы создания вектора на основе генома VEE и оживления рекомбинантного варианта VEE, продуцирующего модельный белок GFP. VEE входит в тройку наиболее часто используемых в мире альфавирусов для создания систем экспрессии (вместе с вирусом Синдбис и вирусом Леса Семлики). В странах с развитой биотехнологией VEE уже нашёл применение в промышленности. Он используется в качестве вектора компаниями Alphavax (www.alphavax.com), Vicinivax (<http://www.vicinivax.com>) и Acambis (в настоящее время подразделение SanofiPasteur). Описанный в статье вектор может найти применение для производства биофармацевтиков в Казахстане.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта «Создание технологии производства рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в культурах клеток млекопитающих» бюджетной программы «Промышленные биотехнологии» на 2014-2016 гг., финансируемой Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baldi L., Hacker D.L., Adam M., Wurm F.M. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives // *Biotechnol.Lett.* – 2007. – №5. – P. 677-684.
2. Conceicao M.M., Tonso A., Freitas C.B., Pereira C.A. Viral antigen production in cell cultures on microcarriers Bovine parainfluenza 3 virus and MDBK cells // *Vaccine.* – 2007. – №45. –P. 7785-7795.
3. Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals // *Drug Discov. Today.* – 2010. – №17. – P. 773-780.
4. Kerrigan J.J., Xie Q., Ames R.S., Lu Q. Production of protein complexes via co-expression // *Protein Expr.Purif.* – 2011. – №1. – P.1-14.
5. De Jesus M., Wurm F.M. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2011. – №2. – P. 184-188.
6. Geisse S., Henke M. Large-scale transient transfection of mammalian cells: a newly emerging attractive option for recombinant protein production // *J. Struct. Funct.Genomics.* – 2005. – №3. – P. 165-170.
7. Pradeau-Aubret K., Ruff M., Garnier J.M., Schultz P., Drillien R. Vectors for recombinational cloning and gene expression in mammalian cells using modified vaccinia virus Ankara // *Anal. Biochem.* – 2010. – №1. – P. 103-105.
8. Pham P.L., Kamen A., Durocher Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein // *Mol. Biotechnol.* – 2006. – №2. – P. 225-237.
9. Quetglas J.I., Ruiz-Guillen M., Aranda A., Casales E., Bezunartea J., Smerdou C. Alphavirus vectors for cancer therapy // *Virus Res.* – 2010. – №2. – P. 179-196.
10. Trowitzsch S., Bieniossek C., Nie Y., Garzoni F., Berger I. New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production // *J. Struct. Biol.* – 2010. – №1. – P. 45-54.
11. Gomez-Casado E., Gomez-Sebastian S., Nunez M.C., Lasa-Covarrubias R., Martinez-Pulgarin S., Escribano J.M. Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production // *Protein Expr.Purif.* – 2011. – №1. – P. 35-43.
12. Kost T.A., Condreay J.P., Jarvis D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells // *Nat. Biotechnol.* – 2005. – №5. – P. 567-575.
13. Chikkanna-Gowda C.P., McNally S., Sheahan B.J., Fleeton M.N., Atkins G.J. Inhibition of murine K-BALB and CT26 tumour growth using a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-18 // *Oncol. Rep.* – 2006. – №4. – P. 713-719.
14. Chikkanna-Gowda C.P., Sheahan B.J., Fleeton M.N., Atkins G.J. Regression of mouse tumours and inhibition of metastases following administration of a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-12 // *Gene Ther.* – 2005. – №16. – P. 1253-1263.
15. Quetglas J.I., Fioravanti J., Ardaiz N. A Semliki forest virus vector engineered to express IFNalpha induces efficient elimination of established tumors // *Gene Ther.* – 2012. – №3. – P. 271-278.
16. Rodriguez-Madoz J.R., Prieto J., Smerdou C. Semliki forest virus vectors engineered to express higher IL-12 levels induce efficient elimination of murine colon adenocarcinomas // *Mol.Ther.* – 2005. – №1. – P. 153-163.

REFERENCES

1. Baldi L., Hacker D.L., Adam M., Wurm F.M. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol.Lett.*, 2007, no. 5, pp. 677-684.
2. Conceicao M.M., Tonso A., Freitas C.B., Pereira C.A. Viral antigen production in cell cultures on microcarriers Bovine parainfluenza 3 virus and MDBK cells. *Vaccine*, 2007, no. 45, pp. 7785-7795.

3. Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discov. Today*, 2010, no. 17, pp. 773-780.
4. Kerrigan J.J., Xie Q., Ames R.S., Lu Q. Production of protein complexes via co-expression. *Protein Expr. Purif.*, 2011, no. 1, pp.1-14.
5. De Jesus M., Wurm F.M. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2011, no. 2, pp. 184-188.
6. Geisse S., Henke M. Large-scale transient transfection of mammalian cells: a newly emerging attractive option for recombinant protein production. *J. Struct. Funct. Genomics.*, 2005, no. 3, pp. 165-170.
7. Pradeau-Aubretton K., Ruff M., Garnier J.M., Schultz P., Drillien R. Vectors for recombinational cloning and gene expression in mammalian cells using modified vaccinia virus Ankara. *Anal. Biochem.*, 2010, no. 1, pp. 103-105.
8. Pham P.L., Kamen A., Durocher Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Mol. Biotechnol.*, 2006, no. 2, pp. 225-237.
9. Quetglas J.I., Ruiz-Guillen M., Aranda A., Casales E., Bezunartea J., Smerdou C. Alphavirus vectors for cancer therapy. *Virus Res.*, 2010, no. 2, pp. 179-196.
10. Trowitzsch S., Bieniossek C., Nie Y., Garzoni F., Berger I. New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production. *J. Struct. Biol.*, 2010, no. 1, pp. 45-54.
11. Gomez-Casado E., Gomez-Sebastian S., Nunez M.C., Lasa-Covarrubias R., Martinez-Pulgarin S., Escribano J.M. Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production. *Protein Expr. Purif.*, 2011, no. 1, pp. 35-43.
12. Kost T.A., Condreay J.P., Jarvis D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, 2005, no. 5, pp. 567-575.
13. Chikkanna-Gowda C.P., McNally S., Sheahan B.J., Fleeton M.N., Atkins G.J. Inhibition of murine K-BALB and CT26 tumour growth using a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-18. *Oncol. Rep.*, 2006, no. 4, pp. 713-719.
14. Chikkanna-Gowda C.P., Sheahan B.J., Fleeton M.N., Atkins G.J. Regression of mouse tumours and inhibition of metastases following administration of a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-12. *Gene Ther.*, 2005, no. 16, pp. 1253-1263.
15. Quetglas J.I., Fioravanti J., Ardaiz N. A Semliki forest virus vector engineered to express IFN α induces efficient elimination of established tumors. *Gene Ther.*, 2012, no. 3, pp. 271-278.
16. Rodriguez-Madoz J.R., Prieto J., Smerdou C. Semliki forest virus vectors engineered to express higher IL-12 levels induce efficient elimination of murine colon adenocarcinomas. *Mol. Ther.*, 2005, no. 1, pp. 153-163.

РЕКОМБИНАНТТЫ АҚУЫЗДАРДЫ СҮТҚОРЕКТІЛЕР ЖАСУШАЛАРЫНДА ЭКСПРЕССИЯЛАУҒА АРНАЛҒАН ВЕНЕСУЭЛА ЖЫЛҚЫ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТИНІҢ ВИРУСЫ ГЕНОМЫНЫҢ НЕГІЗІНДЕГІ ВЕКТОР

Балтабекова А.Ж., Шағырова Ж.С., Ким Ю.Г., Войков М.С., Жиенбай Е., Шустов А.В.

*Ұлттық биотехнология орталығы
Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан
shustov@biocenter.kz*

ТҮЙІН

Венесуэла жылқы энцефаломиелитінің вирусы (VEE) – *Togaviridae* тұқымдасына жататын *Alphavirus* түрінің жақсы зерттелген өкілі. VEE – гендерді жасуша дақылдарына *in vitro* жеткізу үшін, сонымен қатар рекомбинантты ақуыздарды омыртқалылардың жасуша дақылдарында экспрессиялау үшін танымал вектор. VEE РНҚ-ның барлық типтерінің синтезі цитоплазмада өтеді, сондықтан VEE геномына клондалған геннен ақуыздың түзілуі барысында ДНҚ-мен экспрессиялау жүйелерінің тиімділігін шектейтін молекулалық үдерістердің қатары жойылады.

Клондалған ампликаттардан VEE толық мөлшерлі геномының комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) жиналды. Жиналған кДНҚ *E.coli* плазмидасының құрамында клондалды және SP6 фагы РНҚ-полимеразасының промоторы тізбегінен кейін енгізілді. Маркерлі GFP ақуызының гені 26 S субгеномды РНҚ-ның вирусты промоторының синтетикалық көшірмесінің бақылауында енгізілді. Жасушаішілік репликация барысында GFP түзуге қабілетті рекомбинантты вирустың РНҚ-транскрипті ВНК-21 жасуша дақылдарына трансфекцияланды. Трансфекциядан кейінгі 36 сағат дақылдағы түгелге жуық жасушалар GFP-дің айқын флуоресценциясын көрсетті. Трансфекцияланған дақыл түзген вирустың титрі 5 күн бойы анықталды. Титр трансфекциядан кейінгі 24 сағ 8,4*10⁸ 8,4*10⁵ ҰЦПМ50 құрады және дақылды бақылаудың 3-ші тәулігінде 2,9*10⁸

ҰЦПМ50 дейін өсті. Осылайша, геномның кДНҚ көшірмесінен тірілтілген вирустың тіршілікке қабілеттігі көрсетілді.

Берілген мақала VEE геномының негізінде векторды жасаудың және үлгілі GFP ақуызын түзетін VEE рекомбинантты нұсқасын тірілтудің негізгі кезеңдерін көрсетеді. Мақалада суреттелген вектор Қазақстанда биофармацевтердің өндірісінде қолданыс табуы мүмкін.

Негізгі сөздер: альфавирус, эукариотты экспрессия, вектор, транзистентті экспрессия, вирусты тірілту, комплементарлы ДНҚ (кДНҚ).