

# BACTERIAL GENE EXPRESSION OF SHEEP POX VIRUS ENCODING ANTIGENIC PROTEINS OF SPPV095 AND SPPV141 FOR THE DEVELOPMENT OF NEW GENERATION SPECIFIC PROPHYLAXIS

Taylakova E.T., Chervyakova O.V.

*The Research Institute for Biological Safety Problems  
Gvardeiskiy, Kordaiskiy rayon, Zhambylskaya oblast, 080409, Kazakhstan  
tailakova\_86@mail.ru*

## ABSTRACT

Vaccination is an effective means of preventing the dissemination of infectious diseases and therefore, improvement of existing prophylactic measures is urgent. Recombinant proteins with antigenic and immunogenic properties have been widely used in recently developed prophylactic preparations. The objective of this study was to generate recombinant proteins of the sheep pox virus for the development of a subunit SPV vaccine, since outbreaks of the infection have been more frequently reported in the republic and threaten the progress of animal husbandry. In this study, the conditions for the expression of the SPV genes *sppv-95* and *sppv-141* in a bacterial system were optimised. It was shown that recombinant protein expression levels were optimal after incubation at 37°C for 4 h, following induction with 0.5 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for gene *sppv-95*, and at 25°C and 0.25 mM IPTG for gene *sppv-141*. The expression of the target recombinant proteins was confirmed by immunoblotting using serum against polyhistidine. The recombinant proteins were shown to interact in serological tests with antibodies to SPV, thus confirming the retention of their specific antigenic activity following expression in a prokaryotic system. The resulting recombinant proteins will be used in the development of prophylactic preparations.

Keywords: recombinant protein, cloning, expression, induction, sheep pox virus

УДК 619:578.821.21:573.6.083:57.083.3

## БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ, КОДИРУЮЩИХ АНТИГЕННЫЕ БЕЛКИ SPPV095 И SPPV141, ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Тайлакова Э.Т., Червякова О.В.

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности  
п.г.т. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область, 080409, Казахстан  
tailakova\_86@mail.ru*

## АБСТРАКТ

Вакцинация является эффективным средством предупреждения распространения инфекционных заболеваний, что делает актуальным совершенствование существующих профилактических препаратов. В последнее время широко используются при разработке профилактических препаратов рекомбинантные белки, обладающие антигенными и иммуногенными свойствами. Целью данных исследований являлось получение рекомбинантных белков вируса оспы овец для разработки субъединичной вакцины против оспы овец, вспышки которой в последние годы все чаще регистрируются в республике и представляют угрозу для развития животноводства.

В результате проведенных исследований определены оптимальные условия экспрессии генов вируса оспы овец *sppv-095* и *sppv-141* в бактериальной системе. Установлено, что максимальное количество рекомбинантных белков нарабатывалось при инкубировании штаммов-продуцентов при 37°C в течение 4 часов после индукции 0,5 мМ изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) в конечной концентрации для гена *sppv-095* и при инкубировании при 25°C и 0,25 мМ ИПТГ для гена *sppv-141*.

Экспрессия рекомбинантных белков была подтверждена методом иммуноблоттинга с использованием сыворотки к полигистидину. Рекомбинантные белки взаимодействовали в серологических реакциях с антителами, полученными к вирусу оспы овец, что подтвердило сохранение их специфической антигенной активности при экспрессии в прокариотической системе.

Полученные рекомбинантные белки будут использованы для разработки профилактических препаратов.

Ключевые слова: рекомбинантный белок; клонирование; экспрессия; индукция; вирус оспы овец.

## ВВЕДЕНИЕ

Оспа овец – это тяжелое, высококонтагиозное заболевание, которое, согласно МЭБ (международное эпизоотическое бюро), относят к особо опасным болезням животных [1, 2]. Заболевание наносит овцеводству огромный экономический ущерб, слагающийся из гибели и вынужденного убоя больных животных, снижения продуктивности, затрат на проведение ветеринарно-санитарных и охранно-карантинных мероприятий.

Решающая роль в борьбе с инфекционными болезнями животных отводится специфической профилактике. В настоящее время для профилактики оспы овец в республиках Казахстан, Кыргызстан и Российской Федерации используют культуральную вакцину, полученную на основе аттенуированного вируса оспы овец (ВОО), штамм «НИСХИ» [3, 4]. Однако ограничения на использование живых аттенуированных вакцин в районах, благополучных по данному заболеванию, и их недостатки, такие как реактогенность [5], риск остаточной вирулентности, возможная генетическая нестабильность, приводящая к возвращению патогенных свойств, биологическая нестабильность при хранении, а также аллергенное воздействие на некоторых вакцинируемых [6-9], создают необходимость разработки профилактических препаратов нового поколения.

Последним достижением молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии стало создание вакцин нового поколения, содержащих высокоиммуногенные вирусные белки. Субъединичные вирусные вакцины представляют собой отдельный поверхностный протективный белок или набор белков. Обладая протективной активностью, эти антигены способны обеспечить развитие устойчивости иммунизируемого организма к последующему инфицированию. Достоинства данного типа вакцин состоят в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствует живой вирус, что исключает выделение вируса в окружающую среду, снижая биологическую опасность. Также в этом препарате отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могли бы вызывать нежелательные побочные эффекты в организме-хозяине. Последнее указывает на низкую реактогенность вакцин данного типа и обуславливает их применение в медицине и ветеринарии [6, 10].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы является получение рекомбинантных белков вируса оспы овец для разработки высокоэффективных средств специфической профилактики инфекции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### **Бактериальные штаммы и плазмиды**

Для экспрессии генов целевых белков использовали клетки *E. coli* штамма Т7 (New England Biolabs, Ipswich, MA USA), трансформированные рекомбинантными плазмидами pSPPV095 и pSPPV141ΔTM (N(6)-C(184), полученные на основе вектора pET26(b+) (Novagen, La Jolla, CA USA) [11]. Гены *sppv095* (GenBank ID: NP\_659667) и *sppv141* (GenBank ID: NP\_659711) были амплифицированы методом ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной вирусной ДНК. После обработки рестриктазами NdeI –NotI фрагменты ДНК были клонированы по соответствующим сайтам в вектор pET26(b+). Корректность нуклеотидных последовательностей была подтверждена секвенированием.

### **Оптимизация экспрессии рекомбинантных белков**

Для определения оптимальной посевной концентрации в колбу со средой LB-kan (50 мкг/мл) вносили ночную культуру в следующих соотношениях: 1:20, 1:50 и 1:100, после чего инкубировали на шейкере при 37°C до OD<sub>600</sub>=0,6-0,8 ОЕ. Экспрессию индуцировали ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) в конечной концентрации 1мМ. Каждые 30 мин отбирали пробы по 1 мл, клетки осаждали центрифугированием 16000g 5 мин. Далее осадок ресуспендировали в 2× буфере для образцов и анализировали в ДСН-ПААГ (додецилсульфат натрия-полиакриламидный гель) электрофорезе.

Для определения оптимальной температуры экспрессии и концентрации индуктора клетки выращивали в 50 мл среде LB-kan (50 μg/ml) при 37°C до OD<sub>600</sub>=0,6-1. Суспензию делили на равные по объему части, затем клетки индуцировали ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ, 0,5 мМ, 0,25 мМ и продолжали инкубировать при 37°C, 30°C, 25°C, 18°C в течение 4 часов. Клетки собирали центрифугированием и анализировали методом электрофореза в ДНС-ПААГ.

### **Очистка рекомбинантных белков**

Растворимость рекомбинантных белков определяли с использованием реагента BugBuster MasterMix (Novagen, San Diego, CA USA) по инструкции производителя [12].

Рекомбинантные белки в бактериальных клетках формировали тельца включения, которые очищали следующим образом: осадок клеток ресуспендировали в буфере (50мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10мМ ТрисHCl pH 8,0, 500мМ NaCl) из расчета 5мл на 1г сырого клеточного осадка. К полученной суспензии добавляли лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл, инкубировали во льду в течение 30 минут и обрабатывали ультразвуком. Далее центрифугировали при 10000 г, 4°C, в течение 30 минут. Осадок промывали исходным буфером, хранили при -20°C. Дополнительную очистку включений проводили в денатурирующих условиях с использованием Ni-NTAагарозы (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) по протоколу производителя [13]. Для солиubilизации клеточных включений использовали буфер В [50мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300мМ NaCl, 8М мочевины, pH 7,8]. Отмывку проводили буфером С [50мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300мМ NaCl, 8М мочевины, pH 6,0]. Белки элюировали буфером Е [50мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300мМ NaCl, 8М мочевины, pH 4,0].

### **Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и вестерн-блот**

Электрофоретическое разделение белков проводили в 15% ДСН-ПААГ в денатурирующих редуцирующих условиях по Laemmli [14]. Для визуализации белков использовали окрашивание Coomassie G-250 или иммунодетекцию. Для иммунодетекции белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали с помощью антител к anti-His (Cterm)/AP antibody (Invitrogen, Carlsbad, CAUSA) или сывороткой, полученной от овец, экспериментально инфицированных ВОО. Нитроцеллюлозную мембрану блокировали в течение 1 ч. при комнатной температуре с использованием буфера ББ [150 mM NaCl, 20 mM трис-HCl, pH 7,5, 5% обезжиренное сухое молоко]. Затем мембрану инкубировали с антителами к anti-His (Cterm)/AP antibody, меченными щелочной фосфатазой, в разведении 1:2000. Отмывали буфером TBST (150 mM NaCl, 20 mM трис-HCl, pH 7,5, 0,1% твин-20) трижды по 10 мин. После чего добавлением субстрата BCIP/NBT (Invitrogen, Camarillo, CAUSA) визуализировали белки.

В случае использования анти-ВООантител (1:10000) мембрану обрабатывали вторичными антителами Anti-SheepIgG/AP antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MOUSA) в разведении 1:20000.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

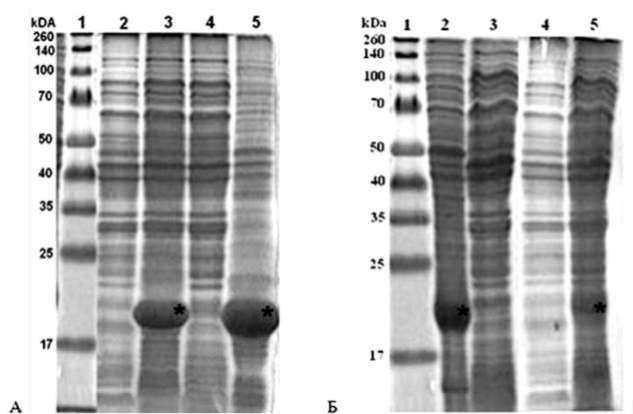
На сегодняшний день наиболее изученным представителем поксвирусов является вирус осповакцины штамм «Копенгаген». Установлено, что поксвирусы формируют несколько инфекционных форм вирионов, в число которых входит внеклеточный зрелый вирион (EEV-external enveloped virion) и внутриклеточный зрелый вирион (IMV-intracellular mature virion) [15]. EEV имеет двухслойную липидную оболочку, в которой, наряду с остальными белками, идентифицирован иммуногенный белок В5. Данный белок является мембранным гликопротеином I типа и имеет схожие характеристики с белками, регулирующими систему комплемента. Кроме того, белок В5 необходим при упаковке IMV для формирования внутриклеточного зрелого вириона (IEV-intracellular enveloped virion). Существуют данные, показывающие, что белок В5 имеет большое значение для правильного гликозилирования белков внеклеточного зрелого вириона EEV и зрелого вириона, ассоциированного с клеткой (CEV-cell-associated enveloped virion) [16].

Экспериментально установлено что мыши, иммунизированные белком В5 вируса осповакцины, приобретают невосприимчивость к поксвирусной инфекции [17]. Также показано, что антитела к белку В5 проявляют вируснейтрализующую активность по отношению к EEV осповакцины. Следует также отметить, что удаление гена В5R снижает потенциал рекомбинантных вирусов для их использования при разработке противооспепных вакцин [18].

Наряду с поверхностными белками, иммуногенной активностью обладают внутренние белки вируса оспы. Белок А4 локализован с шипами выступами на ядре IMV и функционирует в качестве линкерного протеина, подобного матрице между ядром и двумя внутренними мембранами, окружающих IMV [19]. Коровий белок А4, обладающий иммуногенной активностью, вызывает образование нейтрализующих вирус оспы антител в организме иммунизированных животных и может быть использован в качестве компонента вакцинных препаратов [20].

На основании анализа литературных данных по иммуногенным белкам вируса осповакцины были выбраны гены вируса оспы овец штамма «НИСХИ» *sppv095* и *sppv141*, являющиеся ортологами генов А4L и В5R, соответственно.

Для изучения антигенных и иммуногенных свойств выбранных белков необходимо было получить их в чистом виде. Для экспрессии генов, кодирующих целевые белки, мы использовали бактериальную систему *E.coli* штамм Т7. В результате индукции бактериальных клеток, содержащих рекомбинантные плазмиды pSPPV095 и pSPPV141ΔTM, установлена экспрессия белков, молекулярный вес которых соответствовал расчетному для SPPV095 и SPPV141 19 и 22 кДа, соответственно (рисунок 1). Рекомбинантные белки формировали в клетках тельца-включения (рисунок 1, дорожки А5 и Б2).



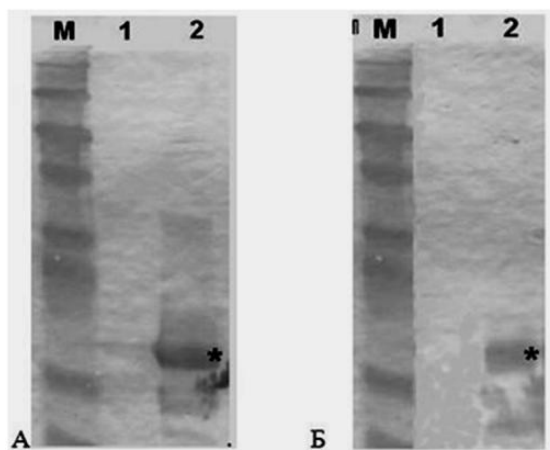
А. pSPPV095: 1 – маркер молекулярного веса (SpectraMulticolorBroadRangeProteinLadder, ThermoScientific, Waltham, MA); 2 – клеточный лизат до индукции; 3 – после индукции ИПТГ; 4 – фракция растворимых белков; 5 – включения; Б. pSPPV141ΔTM: 1 – маркер молекулярного веса; 2 – включения; 3 – фракция растворимого белка; 4 – клеточный лизат до индукции; 5 – после индукции ИПТГ

**Рис. 1.** Электрофоретический анализ белков клеточного лизата *E.coli*

А. pSPPV095: 1 – molecular weight marker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific, Waltham, MA); 2 – cell lysate before induction; 3 – after induction with IPTG; 4 – soluble proteins; 5 – inclusion bodies; Б. pSPPV141ΔTM: 1 – molecular weight marker; 2 – inclusion bodies; 3 – soluble proteins; 4 – cell lysate before induction; 5 – after induction with IPTG

**Fig.1.** Electrophoretic analysis of the *E.coli* cell lysate proteins

Для детекции очистки рекомбинантных белков аминокислотные последовательности были модифицированы путем добавления на С-конце шести остатков гистидина[11]. Анализ клеточных лизатов методом вестерн-блота с использованием анти-HIS мышинных иммуноглобулинов подтвердил наличие экспрессии генов, кодирующих рекомбинантные белки вируса овец (рисунок 2). Как видно из рисунка 2, антитела связывались с белками, молекулярный вес которых соответствовал расчетному, что подтверждает также наличие гексагистидиновой метки в молекуле белка.



А – SPPV095; Б – SPPV141; 1 – до индукции; 2 – после индукции ИПТГ

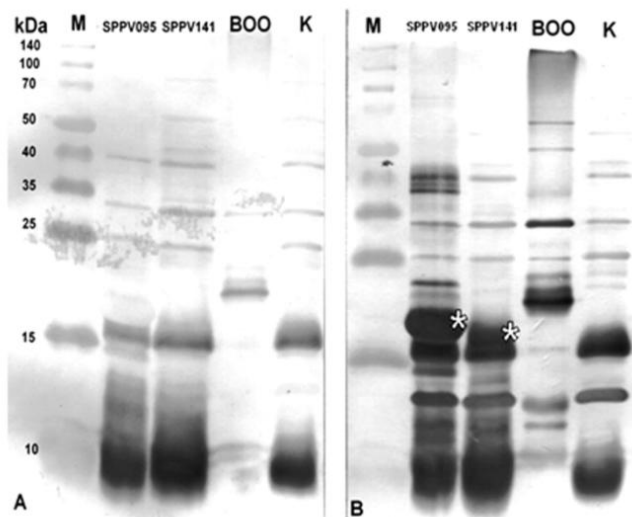
**Рис. 2.** Иммуноблоттинг рекомбинантных белков ВОО, экспрессированных в клетках *E.coli*, с использованием anti-His (Cterm)/AP антител

А – SPPV095; Б – SPPV141; 1 – before induction; 2 – after induction with IPTG

**Fig.2.** Immunoblotting of the SPPV recombinant proteins produced in *E.coli* using anti-His (Cterm)/AP antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA USA)

Экспрессия любого чужеродного гена зависит от его родства с организмом-хозяином. Многие представители как про- так и эукариотических организмов способны к экспрессии чужеродных генов. Для получения рекомбинантных белков с клонированной эукариотической ДНК обычно используют прокариотические системы экспрессии. Однако в некоторых случаях эукариотические белки, синтезированные в бактериях, оказываются нестабильными или биологически неактивными [21].

С целью определения антигенной активности полученных рекомбинантных белков следующим этапом было проведение исследования с использованием специфической сыворотки, полученной от овец, экспериментально инфицированных вирусом оспы овец (рисунок 3).



А – нормальная овечья сыворотка; В – сыворотка от овец, экспериментально инфицированных BOO; М – маркер молекулярного веса (ThermoScientific, США); BOO – вирус оспы овец; К – контроль, лизат клеток *E. coli*, трансформированных pET 26 (b+)

**Рис. 3.** Иммуноблоттинг рекомбинантных белков BOO, экспрессированных в клетках *E. coli*

A – sera from healthy sheep; B – sera from the sheep experimentally infected with SPPV; M – molecular weight marker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific, Waltham, MA); BOO – sheep pox virus; K – control, cell lysate *E. coli*, transformed by pET 26 (b+)

**Fig. 3.** Immunoblotting of the SPPV recombinant proteins produced in *E. coli*

В результате было установлено, что целевые белки связывались со специфической сывороткой, что подтверждает наличие антигенной активности рекомбинантных белков вируса оспы овец, экспрессированных в бактериальной системе.

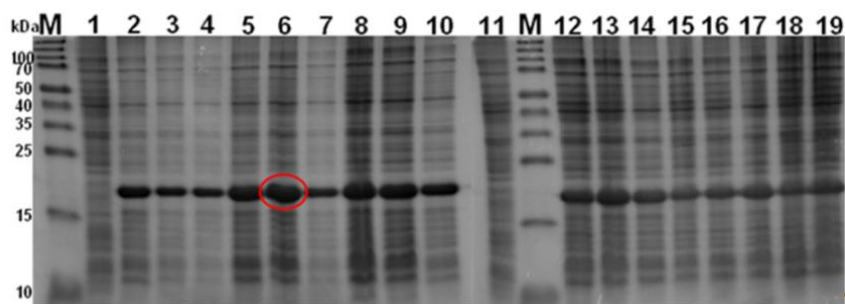
Несмотря на то, что гены экспрессировались в прокариотической системе, это никак не повлияло на антигенные свойства полученных рекомбинантных белков.

Основная цель экспериментов по клонированию генов, которые предполагается использовать в биотехнологии – подбор условий для эффективной экспрессии в нужном организме-хозяине. К сожалению, сам факт встраивания того или иного гена в клонирующий вектор еще не означает, что этот ген будет экспрессирован. В то же время, чтобы получение коммерческого продукта было экономически оправданным, уровень его синтеза должен быть достаточно высоким.

Никакой универсальной стратегии оптимизации экспрессии клонированных генов не существует. Большинство таких генов имеют уникальные молекулярные свойства, и оптимальные условия экспрессии для каждого из них приходится подбирать всякий раз заново.

С целью оптимизации условий процесса биосинтеза целевого белка было исследовано влияние посевной концентрации ночной культуры *E. coli*/pET, температуры выращивания и концентрации индуктора на уровень экспрессии рекомбинантных белков.

На первом этапе определяли оптимальную посевную концентрацию ночной культуры *E. coli* штамма T7 на примере гена *sppv095* (рисунок 4).



М – маркер молекулярного веса; 1, 11 – клеточный лизат до индукции; 30 минут после индукции ИПТГ: 2 – 1:20; 3 – 1:50; 4 – 1:100; 60 минут: 5 – 1:20; 6 – 1:50; 7 – 1:100; 90 минут: 8 – 1:20; 9 – 1:50; 10 – 1:100; 120 минут: 12 – 1:20; 13 – 1:50; 14 – 1:100; 150 минут: 15 – 1:20; 16 – 1:50; 17 – 1:100; 180 минут: 18 – 1:50; 19 – 1:100

**Рис. 4.** Электрофорез клеточных лизатов при определении оптимальной посевной концентрации и времени индукции

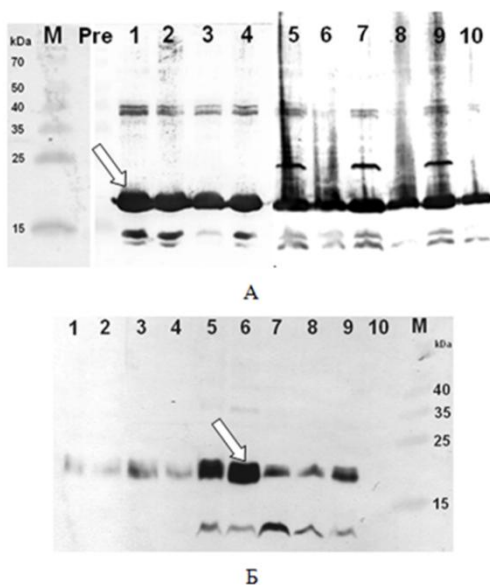
M – molecular weight marker; 1, 11 – cell lysate before induction; 30 min after IPTG-induction: 2 – 1:20; 3 – 1:50; 4 – 1:100; 60 min: 5 – 1:20; 6 – 1:50; 7 – 1:100; 90 min: 8 – 1:20; 9 – 1:50; 10 – 1:100; 120 min: 12 – 1:20; 13 – 1:50; 14 – 1:100; 150 min: 15 – 1:20; 16 – 1:50; 17 – 1:100; 180 min: 18 – 1:50; 19 – 1:100

**Fig.4.** Electrophoresis of cell lysates when determining the optimal concentration of seed and induction time

В результате проведенных исследований установлено, что при посевной концентрации ночной культуры в соотношении 1:50 и времени выращивания после добавления индуктора 60 минут было выявлено наибольшее накопление целевого белка (рисунок 4, дорожка 6).

Далее были определены оптимальные условия индукции экспрессии генов, обеспечивающие высокий выход рекомбинантного белка. Уровень экспрессии белков оптимизирован по концентрации индуктора и температуре. В качестве индуктора использовали ИПТГ в концентрации 1 мМ, 0,5 мМ, 0,25 мМ. Экспрессию проводили при температурах 37°C, 30°C, 25°C, 18°C в термостате, оснащенный шейкером роторного типа.

В результате было установлено, что максимальный уровень экспрессии гена *sppv-095* в клетках *E.coli* наблюдается при использовании ИПТГ в конечной концентрации 0,5 мМ после 4-часовой ферментации при 37°C (рисунок 5А). Тогда как для гена *sppv-141* высокий выход наблюдается при конечной концентрации ИПТГ 0,25 мМ после 4-часовой ферментации при 25°C (рисунок 5Б).



А. М – маркер молекулярного веса; Pre – клеточный лизат до индукции; 1 – 0,5 мМ ИПТГ, 37°C; 2 – 1 мМ ИПТГ, 37°C; 3 – 0,5 мМ ИПТГ, 30°C; 4 – 1 мМ ИПТГ, 30°C; 5 – 0,25 мМ ИПТГ, 25°C; 6 – 0,5 мМ ИПТГ, 18°C; 7 – 1 мМ ИПТГ, 25°C; 8 – 0,25 мМ ИПТГ, 18°C; 9 – 0,5 мМ ИПТГ, 25°C; 10 – 1 мМ ИПТГ, 18°C; Б. М – маркер молекулярного веса; 1 – 1 мМ ИПТГ, 37°C; 2 – 0,5 мМ ИПТГ, 37°C; 3 – 1 мМ ИПТГ, 30°C; 4 – 0,5 мМ ИПТГ, 30°C; 5 – 0,5 мМ ИПТГ, 25°C; 6 – 0,25 мМ ИПТГ, 25°C; 7 – 0,5 мМ ИПТГ, 18°C; 8 – 0,25 мМ ИПТГ, 18°C; 9 – 0,125 мМ ИПТГ, 18°C; 10 – клеточный лизат до индукции

**Рис. 5.** Иммуноблоттинг рекомбинантных белков ВОО: определение оптимальной концентрации ИПТГ и температуры индукции

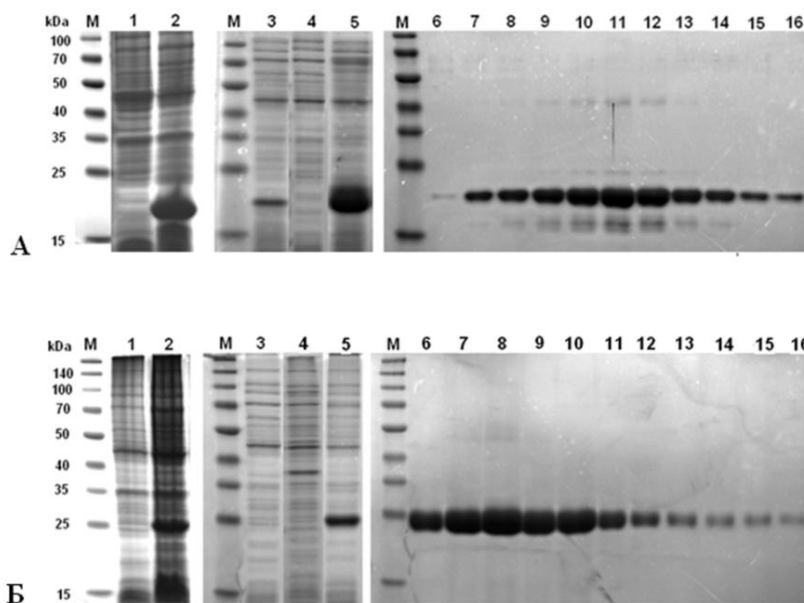
A. SPPV095: M – molecular weight marker; Pre– cell lysate before induction; 1 – 0,5 мМИПТГ, 37°С; 2 – 1 мМИПТГ, 37°С; 3 – 0,5 мМИПТГ, 30°С; 4 – 1 мМИПТГ, 30°С; 5 – 0,25 мМИПТГ, 25°С; 6 – 0,5 мМИПТГ, 18°С; 7– 1 мМИПТГ, 25°С; 8 – 0,25 мМИПТГ, 18°С; 9 – 0,5 мМИПТГ, 25°С; 10 – 1 мМИПТГ, 18°С;

Б. SPPV141: M – molecular weight marker; 1 – 1 мМИПТГ, 37°С; 2 – 0,5 мМИПТГ, 37°С; 3 – 1 мМИПТГ, 30°С; 4 – 0,5 мМИПТГ, 30°С; 5 – 0,5 мМИПТГ, 25°С; 6 – 0,25 мМИПТГ, 25°С; 7 – 0,5 мМИПТГ, 18°С; 8 – 0,25 мМИПТГ, 18°С; 9 – 0,125 мМИПТГ, 18°С; 10 – cell lysate before induction

**Fig.5.**Immunoblotting of recombinant proteins SPPV: determine the optimal concentration of IPTG and induction temperature

Следующим важным, как и сама экспрессия, этапом данной работы, является выделение и очистка полученных рекомбинантных белков.

На рисунке 6 представлены результаты очистки рекомбинантных белков SPPV095 (А) и SPPV141 (Б) вируса оспы овец.



M –маркер молекулярного веса; 1 – клеточный лизат до индукции; 2 – после индукции ИПТГ; 3 – надосадок клеточного лизата после обработки лизоцимом; 4 – фракция, прошедшая сквозь колонку сNi-NTAагарозой; 5 – осадок клеточного лизата после обработки лизоцимом; 6-16 – фракции очищенного белка

**Рис. 6.** Электрофоретический анализ рекомбинантных белков SPPV095 (А) и SPPV141 (Б) в процессе очистки

M– molecular weight marker; 1 – cell lysate before induction; 2 – after IPTG-induction; 3 – supernatant after adding lysozyme; 4 – fraction flow-through Ni-NTA-agarose column; 5 – pellet after adding lysozyme; 6-16 – purified protein fractions

**Fig.6.**Electrophoretic analysis of the SPPV095 (A) and SPPV141 (B) recombinant proteins purification

Рекомбинантные белки формировали в бактериальных клетках тельца включений, в связи с чем на первом этапе очистки проводили разрушение клеток для получения фракции нерастворимых белков, как минимум 50% которой составлял целевой белок. Дополнительную очистку рекомбинантных белков проводили металло-аффинной хроматографией с использованием Ni-NTA агарозы. Как видно из электрофореграммы, целевые белки хорошо сорбировались на ионах Ni<sup>2+</sup> и элюировались одним пиком 8М мочевиной. Во фракциях элюции были обнаружены целевые белки, свободные от примесей.

В данной работе целенаправленно из индуцированного клеточного лизата были получены тельца включения, что позволило выделить белки с очень высокой степенью очистки (примерно 98% по данным электрофоретического анализа в ДСН-ПААГ). Выход целевого продукта составил 7-10 мг из 1 л культуры клеток *E.coli*. Исследования в этом направлении продолжаются. В дальнейшем будут исследованы иммунологические свойства белков по способности стимулировать выработку вирус нейтрализующих антител на лабораторных и целевых животных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведена экспрессия целевых белков, оценка их подлинности методом вестерн-блота со специфическими сыворотками, а также оптимизация уровня экспрессии целевых белков вируса оспы овец.

В результате индукции бактериальных клеток, содержащих рекомбинантные плазмиды pSPPV095 и pSPPV141ΔTM, были получены белки SPPV095 и SPPV141 с молекулярными массами 19 и 22 кДа, соответственно.

Рекомбинантные белки взаимодействовали как с anti-His (Cterm)/AP антителами, так и с анти-ВОО сывороткой, что свидетельствует о специфичности и сохранении антигенной активности при экспрессии в прокариотической системе.

В процессе оптимизации были определены условия культивирования штаммов-продуцентов, обеспечивающие максимальный уровень экспрессии генов вируса оспы овец: *sppv-095* – 0,5 мМ ИПТГ при 37°C, *sppv-141* – 0,25 мМ ИПТГ при 25°C. Выход целевых белков составил 7-10 мг с 1 л бактериальной культуры.

Полученные рекомбинантные белки после определения их иммуногенных характеристик будут использованы для разработки средств специфической профилактики оспы овец.

### Финансирование

Исследования выполнены при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта 1292/ГФ4 «Рекомбинантная вакцина для профилактики оспы овец» на 2015-2017 гг. (№ГР0115РК01983).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.Ф. и др. Вирусные болезни животных. – М.: ВНИТИБП, 1998. – С.128-134.
2. Levefre P.C. Sheep and goats pox // *Ins. Elev.Med.Vet.: Pays trop. Prod.* – 1983. – P.171.
3. Бакулов И.А., Власова Т.А., Терновая С.Ф. и др. Особо опасные болезни животных // Справочник ВНИИВВиМ. – Покров, 2002. – С.159.
4. World Animal Health. Reports on the animal Health Status and Disease Control Methods and List a Disease Outbreaks. – Paris: Statistics O.I.E., 1996. – P. 4.
5. Иванющенко В.Н., Кекух В.Т., Кореба О.А. Реактогенные свойства вирусвакцины против оспы овец // *Ветеринария.* – 1990. – №7. – С.28-30.
6. Щелкунов С.Н. Вакцины на основе вирусных антигенов. Противовирусные вакцины: от дженнера до наших дней // *Соросовский образовательный журнал.* – 1998. – №8. – С. 43-50.
7. Moss B., Knipe D.M., etc. Poxviridae and their replication. *Fields virology*, 2<sup>nd</sup> ed. Raven press.–NY, 1990. – P.120.
8. Курченко Ф.П., Иванющенко В.Н., Уфимцев К.П. и др. Эффективность сухой культуральной вакцины из штамма НИСХИ против оспы овец // *Ветеринария.* – 1991. – №10. – С.21-23.
9. Jadhav K.M., Pandey A.K., Radadia N.S. Field observations on sheep pox tissue culture vaccine // *Indian Vet. J.* – 1989. – Vol.66. – P.908-912.
10. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир, 2002. – С.228-229.
11. Тайлакова Э.Т., Ажибаева Д.Т., Червякова О.В. и др. Создание генетических конструкции для экспрессии рекомбинантных белков A4L и B5R вируса оспы овец // *Актуальные проблемы и перспективы биологической безопасности: сб. статей науч.-практ. конф. – п.г.т. Гвардейский, 2012.* – С.174-179.
12. BugBuster® Protein Extraction Reagent // [http://search.cosmobio.co.jp/cosmo\\_search\\_p/search\\_gate2/docs/NVG\\_/714563.20051122.pdf](http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/NVG_/714563.20051122.pdf).
13. Ni-NTA Purification System for purification of polyhistidine-containing recombinant proteins // [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ninta\\_system\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ninta_system_man.pdf).
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P.680-685.
15. Ванновский Т.Я. Оспа коз и ее специфическая профилактика: автореф. ... докт.вет. наук. – Воронеж, 1966. – 342 с.
16. Breiman A., Smith G.L. The vaccinia virus B5 protein affects the glycosylation, localisation and stability of the A34 protein // *J. Gen Virol.* – 2010. – Vol. 91. – P.1823-27.
17. Berhanu A., Wilson R.L., Kirkwood D.L., Watts et al. Vaccination of BALB/c mice with *Escherichia coli*-expressed vaccinia virus proteins A27L, B5R, and D8L protects mice from lethal vaccinia virus challenge // *J. Virol.* – 2008. – Vol. 82. – P.3517-3529.
18. Bell E., Shamim A.M., Whitbeck J.C. et al. Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin // *Virology.* – 2004. – Vol. 325. – P.425-431.



19. Roos N., Cyrklaff M., Cudmore S. et al. The use of a novel immunogold cryoelectron microscopic method to investigate the structure of the intracellular and extracellular forms of vaccinia virus // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 151. – P. 2343-2355.

20. Yadav M.P., Pandey A.B., Negi B.S. et al. Studies on an inactivated goat pox vaccine // *Indian J. Virol.* – 1986. – Vol. 2. – P. 202-221.

21. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир, 2002. – С. 131.

## REFERENCES

1. Sjurin V.N., Samujlenko A.Ja., Solov'ev B.F. i dr. Вирусные болезни животных [Viral diseases of animals]. М., VNITIBP, 1998, pp.128-134.

2. Lefevre P.C. Sheep and goats pox. *Ins. Elev. Med. Vet.: Pays trop. Prod.*, 1983, p.171.

3. Bakulov I.A., Vlasova T.A., Ternovaja S.F. i dr. Особо опасные болезни животных: Справочник [Particularly dangerous animal diseases]. Pokrov, VNIIVViM, 2002, p. 159.

4. World Animal Health. Reports on the animal Health Status and Disease Control Methods and List a Disease Outbreaks. Paris, Statistics O.I.E., 1996, p. 4.

5. Ivanjushhenkov V.N., Kekuh V.T., Koreba O.A. Реактогенные свойства вирусвакцины против оспы овец [Reactogenicity properties virusvaksiny against sheep pox]. *Veterinary Journal*, 1990, no. 7, pp. 28-30.

6. Shhelkunov S.N. Вакцины на основе вирусных антигенов. Противовирусные вакцины: от дженнера до наших дней. Биология [Vaccines based on virus antigens. Antiviral vaccines from Jenner to the present day. Biology]. *Soros Educational Journal*, 1998, no. 8, pp. 43-50. CROSSREF.

7. Moss B., Knipe D.M., etc. Poxviridae and their replication. *Fields virology*, 2<sup>nd</sup> ed. Raven press. NY, 1990, p. 120.

8. Kurchenko F.P., Ivanjushhenkov V.N., Ufimcev K.P. i dr. Эффективность сухой культуральной вакцины из штамма НИСХИ против оспы овец [The effectiveness of a dry culture of a vaccine against a strain of sheep pox]. *Veterinary Journal*, 1991, no. 10, pp. 21-23.

9. Jadhav K.M., Pandey A.K., Radadia N.S. Field observations on sheep pox tissue culture vaccine. *Indian Vet. J.*, 1989, vol. 66, pp. 908-912.

10. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение [Molecular Biotechnology. Principles and Applications]. М., Мир, 2002, pp. 228-229.

11. Tajlakova Je.T., Azhibaeva D.T., Chervjakova O.V. i dr. Создание генетических конструкции для экспрессии рекомбинантных белков А4L и В5R вируса оспы овец [Creation of genetic constructs for the expression of recombinant proteins A4L and B5R sheep pox virus]. Recent biological safety problems and prospects: Coll. articles of scientific-practical conference. Gvardeiskiy, 2012, pp. 174-179.

12. BugBuster® Protein Extraction Reagent // [http://search.cosmobio.co.jp/cosmo\\_search\\_p/search\\_gate2/docs/NVG\\_/714563.20051122.pdf](http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/NVG_/714563.20051122.pdf).

13. Ni-NTA Purification System for purification of polyhistidine-containing recombinant proteins // [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ninta\\_system\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ninta_system_man.pdf).

14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680-685. PubMed.

15. Vannovskij T. Ja. Оспа коз и ее специфическая профилактика: автореф. ... докт. вет. наук [Smallpox goats and its specific prevention: the author's abstract of the dissert. of the doct. of veter. sciences]. Voronezh, 1966, p. 342.

16. Breiman A., Smith G.L. The vaccinia virus B5 protein affects the glycosylation, localisation and stability of the A34 protein. *J Gen Virol.*, 2010, vol. 91, pp. 1823-27. PubMed.

17. Berhanu A., Wilson R.L., Kirkwood D.L -Watts et. al. Vaccination of BALB/c mice with Escherichia coli-expressed vaccinia virus proteins A27L, B5R, and D8L protects mice from lethal vaccinia virus challenge. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, pp. 3517-3529. PubMed.

18. Bell E., Shamim A.M., Whitbeck J.C. et. al. Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. *Virology*, 2004, vol. 325, pp. 425-431. CROSSREF.

19. Roos N., Cyrklaff M., Cudmore S. et. al. The use of a novel immunogold cryoelectron microscopic method to investigate the structure of the intracellular and extracellular forms of vaccinia virus. *EMBO J.*, 1996, vol. 151, pp. 2343-2355. PubMed.

20. Yadav M.P., Pandey A.B., Negi B.S. et al. Studies on an inactivated goat pox vaccine. *Indian J. Virol.*, 1986, vol. 2, pp. 202-221. CROSSREF.

21. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение [Molecular Biotechnology. Principles and Applications]. М., Мир, 2002, p. 131.

## ЗАМАНАУИ ТЕЛІМДІ АЛДЫН АЛУ ҚҰРАЛЫН ЖАСАҚТАУ ҮШІН ҚОЛДАНУҒА БОЛАТЫН SPPV095 ЖӘНЕ SPPV141 БЕЛОКТАРДЫ КОДТАЙТЫН ҚОЙ ШЕШЕГІ ВИРУСЫ ГЕНДЕРІНІҢ БАКТЕРИАЛДЫ ЭКСПРЕССИЯСЫ

Тайлақова Э.Т., Червякова О.В.

*Биологиялық қауіпсіздік проблемаларынның ғылыми-зерттеу институты  
құқ. Гвардейский, Қордай ауданы, Жамбыл облысы, 080409, Қазақстан  
tailakova\_86@mail.ru*

Екпе егу жұқпалы аурулардың жан жақа тарауын ескертетін тиімді құралдардың бірі болып саналады. Сондықтан қазіргі таңда қолданыста бар ауруларды алдын алу препараттарын толық жетілдіру өзекті мәселелердің бірі. Соңғы кездері ауруларды алдын алу препараттарын жасақтау барысында антигенді және иммуногенді қасиеттерге ие рекомбинантты белоктар қолданылып жатыр. Соңғы жылдары республикада тарауы жиі тіркеліп жатқан және мал шаруашылығының дамуына қатер туғызып жатқан, қой шешегіне қарсы суббірлік вакцинаны жасақтау үшін қой шешегі вирусының рекомбинантты белоктарын жасау осы жұмыстың мақсаты болып табылады. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде қой шешегі вирусының *sppv-095* және *sppv-141* гендерінің экспрессияларын бактериалды жүйеде оңтайландыру жағдайлары анықталынды. Нәтижесінде рекомбинантты белоктардың жоғарғы шекті мөлшерлері *sppv-095* гені үшін штамм-продуцентті ИПТГ 0,5 мМ ақырғы концентрациясында индуцирлеп, 37°C температурасында ал, *sppv-141* гені үшін ИПТГ 0,25 мМ ақырғы концентрациясында индуцирлеп, 25°C температурасында 4 сағат бойы инкубациялау арқылы алынды.

Рекомбинантты белоктардың экспрессиясы полигистидинге арналған сыворотканы қолдана отырып иммуноблоттинг әдісі арқылы расталынды. Қой шешегі вирусына алынған антиденелермен рекомбинантты белоктар серологиялық реакцияларда өзара әрекеттесті. Бұл жағдай рекомбинантты белоктардың прокариот жүйесінде экспрессиясы кезінде телімді антигенді белсенділіктері сақталынып қалғанын айқындайды.

Жасап алынған рекомбинантты белоктарды ауруды алдын алуға арналған препараттарды жасақтау барысында қолданылатын болады.

Негізгі сөздер: рекомбинантты белок, клонирлеу, экспрессия, индукция, қой шешегі вирусы.