

УДК 619:616.98.578.828.11Л

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКОВОГО ФРАГМЕНТА GP51 АНТИГЕНА ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ЭКСПРЕССИРОВАННОГО В *E.COLI* БЕЗ ТИОРЕДОКСИНОВОЙ ВСТАВКИ

Мукантаев К.Н., Шустов А.В., Сыдыкнаби Ы., Бегалиева А., Райымбек Г., Муканов К.К.

*Национальный центр биотехнологии, ул. Ш. Уалиханова, 13/1, г. Астана, 010000, Казахстан*

*lii@biocenter.kz*

### АБСТРАКТ

Гликопротеин gp51 и основной структурный белок p24 вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) являются основными диагностическими антигенами. Традиционным источником gp51 и p24 антигена является вирус, персистирующий линию культуры клеток почек эмбриона овцы (FLK). Однако выход вирусного антигена из культуры клеток FLK очень низкий.

В ранее опубликованных нами работах описан рекомбинантный gp51 антиген, полученный на основе экспрессионного вектора pET32, несущий ген тиоредоксина. Следует отметить, что использование полученного антигена gp51+тиоредоксин в диагностических тест-системах давало перекрестные реакции на тиоредоксин.

В связи с этим целью настоящей работы явилось получение рекомбинантного gp51 белка вируса лейкоза крупного рогатого скота, экспрессированного в *E. coli* без тиоредоксина.

В рамках данных исследований с 3' конца гена gp51 белка вируса лейкоза крупного рогатого скота добавлен ген гексагистидинового метки, после этого ген клонирован в экспрессионный вектор E3.pET22. Проведена трансформация вектора, несущего ген gp51 вируса лейкоза. Определены параметры экспрессии gp51 белка трансформированными штаммами микроорганизмов. Молекулярно-генетическими и иммунохимическими методами доказана экспрессия gp51 белка.

Ключевые слова: вирус, лейкоз, gp51, рекомбинантный антиген, иммуноферментный анализ, реакция диффузионной преципитации.

## OBTAINING OF RECOMBINANT PROTEIN FRAGMENT OF THE GP51 ANTIGEN VIRUS OF BOVINE LEUKEMIA EXPRESSED IN *E.COLI* WITHOUT INSERT THIOREDOXIN

Mukantayev K.N., Shustov A.B., Sydyknabi I., Bigalyeva A., Raiymbek G., Mukanov K.K.

*National Center for Biotechnology, Sh.Valikhanov str., 13/1, Astana, 010000, Kazakhstan*

*lii@biocenter.kz*

### ABSTRACT

Glycoprotein gp51 and the main structural protein p24 leucosis virus of livestock animals are the main diagnostic antigens. In this case, the most significant part of the research is devoted to obtaining recombinant antigens. As a source of gp51 and p24 antigen is a virus which the cell lines derived from fetal lamb kidney (FLK) that, chronically infected with the virus. The current method is inefficient and time-consuming, also, very low yield of the final product. In the last decades, many studies have been done on the expression of Env glycoprotein gene in heterologous systems such as *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, as well as in the system of the recombinant vaccinia virus and more recently, in the baculovirus system.

In previously published work we had described recombinant gp51 antigen based on the expression vector pET32 that gene-carrying thioredoxin. However, the use of the resulting antigen gp51 + thioredoxin in diagnostic test systems proved undesirable due to significant cross-reactions to thioredoxin, which is unacceptable in the development of high-

performance test systems, such as immunochromatographic or enzyme immunoassays.

In this case, the purpose of the work was to produce recombinant gp51 protein of livestock leucosis in *E. coli* without thioredoxin expression.

In the process used immunological, biochemical, serological and biotechnology research.

As a result of this study, the gene of hexahistidine tags was added on the 3' end of the viral protein gp51 gene of livestock leucosis, after then, the gene was cloned into an expression vector E3.pET22. The transformation of the vector which carrying the gene of leucosis virus gp51. Identified the parameters of the gp51 protein expression strains that transformed by microorganisms and proved various analytical and immunochemical methods for expression of the desired protein.

**Keywords:** virus, leukemia, gp51, recombinant antigen ELISA, the reaction diffusion precipitation.

---

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) является возбудителем энзоотического лейкоза, злокачественной болезни лимфатической системы [1]. Вирус относится к семейству *Retroviridae*, подсемейству *Oncoviridae* типа С. По своей морфологии вирус сходен с возбудителями лейкоза других видов животных. Представителями данного семейства вирусов являются вирусы саркомы и лейкоза кошек, павианов, гиббонов и шерстистых обезьян, Т-лимфоцитарные вирусы человека. Вирионы ретровирусов содержат липидную оболочку, окружающую икосаэдрический капсид, которая в свою очередь окружает спиральный нуклеокапсид. Вирусы имеют семь полипептидов, при этом поверхностные гликопротеины (*env*) содержат типоспецифические эпитопы, а внутренние белки (*gag*) несут перекрестно-реактивные эпитопы.

Также как и прочие ретровирусы, геном вирус лейкоза крупного рогатого скота содержит *gag*, *pol* и *env* структурные и регуляторные гены [2]. Большинство структурных белков ВЛКРС являются иммуногенными, однако установлено, что инфицированные животные преимущественно вырабатывают антитела к гликопротеинам gp51, gp30 и к *gag* белкам p24 и p15 [3], [4]. Трансляция гена *env* осуществляется с мРНК в эндоплазматическом ретикулуме, где сразу начинается процесс гликозилирования. Белки, экспрессируемые геном *env*, транспортируются в комплекс Гольджи, где под действием протеаз хозяина расщепляются на SU и TM молекулы. Эти два продукта расщепления остаются в тесной связи, и для дальнейшего гликозилирования они транспортируются к мембране эндоплазматического ретикулума. Гликопротеин (*Env*) вируса лейкоза крупного рогатого скота, состоящий из gp51 гликопротеина внешней мембраны и трансмембранного gp30 гликопротеина, непосредственно участвует в инфицировании клетки и вызывают сильный иммунный ответ у инфицированных животных [5].

Во время вирусной инфекции, гликопротеин gp51 и основной структурный белок вируса p24 являются основными мишенями для иммунной системы. В связи с этим значительная часть исследований посвящена получению рекомбинантных аналогов этих антигенов. Традиционным источником gp51 и p24 антигена является вирус, получаемый из линии клеток почек эмбриона овцы (FLK), хронически инфицированных вирусом. Данный метод является малоэффективным и трудоемким, с очень низким выходом конечного продукта. В последние десятилетия различные исследователи описали экспрессию гликопротеинов гена *Env* в гетерологичных системах, таких как кишечная палочка [6-8], *Saccharomyces cerevisiae* [9], а также в системе рекомбинантного вируса коровьей оспы [10], [11] и, в последнее время, в системе бакуловируса [12], [13].

G. Gutierrez с соавторами (2009) амплифицировали полную нуклеотидную последовательность p24 антигена из провируса, выделенного в Бельгии. В качестве экспрессирующей системы использовалась кишечная палочка. При этом нуклеотидная последовательность амплифицированного гена была полностью гомологична генам p24 антигена вируса, изолированного в Бельгии, Аргентине, Австралии и Японии. Более того, полная нуклеотидная и аминокислотная характеристика p24 антигена полевых штаммов

вируса полностью подтвердила предположение, что антиген у циркулирующих штаммов не вариабелен и может использоваться в серологической диагностике лейкоза [14].

Alejandra Larsen с соавторами (2012) для экспрессии рекомбинантного р24 антигена, выделенного из вируса, выращенного в клеточной линии FLK, использовала бакуловирус как вектор. Анализ нуклеотидной последовательности показал 99,7% гомологию со штаммом вируса, изолированного в Японии и США, и 98% гомологию со штаммами, выделенными в Аргентине и Австралии. Клеточная линия Sf21, инфицированная р24-бакуловирусами, экспрессировала рекомбинантный белок р24. Молекулярный вес рекомбинантного белка составлял 24 кДа. Однако, при использовании авторами рекомбинантного р24 белка в качестве антигена в иммунодиагностических тестах, наблюдались неспецифические реакции [15].

De Giuseppe с соавторами экспрессировал белок gp51 вируса в клетках насекомых с использованием рекомбинантного бакуловируса и оценил его диагностические возможности в иммуоферментном анализе. С этой целью автором был использован АТГ кодон в положении 4826 нуклеотидной последовательности. Выбор был связан с тем, что данная сигнальная последовательность кодирует 33 аминокислоту в N-терминальной последовательности, предшествующая аминокислотной последовательности gp51 антигена [16]. Эта гипотеза подтверждается другими исследователями, показавшими, что при экспрессии Env гликопротеинов вируса выделение gp51 антигена не происходит без сигнальной последовательности [9], [13]. Более того, экспрессионные системы, в которых Env гликопротеины вируса или gp51 антиген экспрессированы с сигнальной последовательностью, производят необходимые белки [17], [18].

По мнению De Giuseppe, секретируемый gp51 имеет несколько преимуществ по сравнению с внутриклеточными gp51 или gp51 антигеном, продуцируемым вирусом в клетках млекопитающих. Во-первых, очистка рекомбинантного gp51 антигена проста и позволяет преодолеть проблемы загрязнения дебрисными белками клеток насекомых или эмбриональной телячьей сыворотки [16].

Полученная аминокислотная последовательность обладала высокой степенью гомологии с gp51 антигеном нативного вируса. Анализ рекомбинантного gp51 антигена методом Вестерн-блоттинга показал наличие нескольких рекомбинантных белковых фракций от 32 до 50 кДа. По мнению других авторов, полученные результаты могли быть причиной неполного и неправильного гликозилирования молекул, часто наблюдаемые в клетках насекомых [13], [19] и различных клеточных линиях млекопитающих [20]. Однако, несмотря на неполное или неправильное гликозилирование, в иммуоферментном анализе антигенные характеристики рекомбинантного gp51 антигена были идентичны нативным белкам.

По данным De Giuseppe, применение рекомбинантного gp51 антигена привело к улучшению диагностических характеристик ИФА, продемонстрировав 100% специфичность при исследовании 1230 образцов сыворотки [16].

Тем не менее, уровень диагностических технологий и достижения прикладной науки в области диагностики инфекционных болезней требуют более глубокого понимания антигенных свойств патогенов и их иммуногенности. По мнению ряда исследователей, решением данной проблемы могут быть синтетические пептиды, некоторые из которых использовались для картирования антигенных сайтов у вирусов [21], [22]. Синтетические пептиды, как миметики антигенных и иммуногенных сайтов, имеют широкий потенциал использования их в качестве антигенов в диагностических системах и как эффективные компоненты вакцин [23-26]. Данные технологии позволяют избежать проблем, связанных с применением антигенов, полученных на культуре клеток [27-29].

Elizangela Maira dos Santos с соавторами (2012) использовала пептиды, полученные технологией фагового дисплея, в разработке методов иммуноанализа энзоотического лейкоза крупного рогатого скота. Эти пептиды были расценены как антигенные миметики иммуногенных эпитопов белков вируса лейкоза крупного рогатого скота, обладающих

потенциалом при разработке диагностических тест-систем [30].

Клоны фагов, несущие пептиды, мимикрирующие антигены вируса, отбирались с помощью иммуноглобулинов, очищенных из сывороток крупного рогатого скота больных лейкозом. Многократное клонирование с отбором наиболее активных клонов в иммуноанализе позволило получить клоны, продуцирующие пептиды с высоким сродством к IgG от больных животных. В результате автором получены 44 пептида с высокой частотой встречаемости таких аминокислот как аланин, гистидин, пролин и триптофан. Из этих 44 пептидов, методами иммуноферментного анализа, Дот-блота и Вестерн-блота были отобраны только 23 пептида, 9 из которых различали положительные и отрицательные сыворотки во всех трех вариантах анализов.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей полученных пептидов показал их гомологию с p24 антигеном, gp51 и gp30 гликопротеинами. Пептиды из клонов D10, G5 и A9 гомологичны с белком p24, который рассматривается как основной капсидный белок вируса лейкоза крупного рогатого скота, а пептид клона D4 имеет высокую степень гомологии с gp51 гликопротеином вирусной оболочки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, USA), плазмидный вектор E3.pET22. Клетки *E. coli* выращивали на жидкой и плотной питательных средах LB.

### Клонирование гена gp51 антигена в E3.pET22 вектор

Плазмидную ДНК выделяли из штамма *E. coli*, используя наборы PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit и PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen, Великобритания).

Гидролиз плазмидной ДНК проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции NcoI и XhoI в соответствующих буферных и температурных условиях согласно рекомендациям производителей.

Фракционирование фрагментов ДНК проводили методом электрофореза в агарозном геле. Разделение фрагментов ДНК проводили согласно Маниатису и др. [31] методом электрофореза в горизонтальных агарозных гелях с концентрацией агарозы от 1 до 3%. Электрофорез проводили при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере (0,04М трис-ацетат pH 8,1, 0,002М ЭДТА) с содержанием 0,5 мкг/мл бромистого этидия, при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30-60 мин. Полученную фракцию ДНК экстрагировали смесью фенол-хлороформ и хлороформом, после чего преципитировали этанолом.

Для лигирования фрагментов ДНК использовали ДНК-лигазу фага T4. Состав буфера: 250 мМ трис-HCl pH 7,2, 25 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ ДТТ, 1 мМ трихлорида гексааминокобальта. Реакцию лигирования проводили в течение 12 часов при 4°C.

Определение нуклеотидной последовательности ДНК определяли по методу Sanger [32] с использованием наборов BigDye на автоматических анализаторах ДНК ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США).

### Гетерологичная экспрессия клонированных генов

Компетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали полученными экспрессионными плазмидами, трансформанты высевали на селективную среду с ампициллином (100 мкг/мл). Выросшими колониями инокулировали 100 мл среды LB (Amp 100 мкг/мл), культивировали до OD<sub>600</sub> ~ 0,8 при 37°C. Затем запускали экспрессию рекомбинантного белка добавлением химического индуктора IPTG до концентрации 0,2 мМ. После добавления индуктора температуру культивирования снижали до 24°C и продолжали инкубацию в течение 16 часов. Биомассу бактерий собирали центрифугированием (3000 g, 15'), осадок бактерий ресуспендировали в охлажденном буфере TNE (20 мМ Tris pH 7,5; 1 мМ EDTA; 100 мМ NaCl) и при охлаждении разрушали ультразвуком (20 пульсов по 1 мин с паузами по 1 мин.). Полученный лизат клеток анализировали денатурирующим

электрофорезом в 15% ПААГ.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу *Laemmli U.K.* [33]. Определение концентрации очищенного рекомбинантного антигена проводили по методу *Bradford M.M.* [34].

#### **Постановка иммуноблотинга**

Электрофоретический перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили с использованием прибора для иммуноблотинга (Hofer Scientific, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Для иммунохимической детекции полос рекомбинантного антигена мембрану окрашивали первыми антителами, в качестве которых использовали либо антитела из сыворотки крови коров с подтверждённым диагнозом лейкоза КРС, либо мышинные моноклональные антитела против гексагистидиновой метки (*anti-His mAb*). Далее мембраны обрабатывали соответствующим антивидовым конъюгатом с ферментом пероксидазой хрена. Проявление осуществляли реакцией с субстратом хлорнафтолом в присутствии перекиси водорода.

#### **Иммуноферментный анализ**

Для проведения ИФА 96-луночный иммунологический планшет иммобилизовывали лизатом клеток *E3.pET22/gr51* в концентрации 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6 и 0,3 по белку. Планшет с разведениями инкубировали при +4°C в течение 12 часов. После этого планшеты отмывали 4 раза фосфатно-солевым буфером с 0,05% Tween-20 (PBS-T). Для блокирования мест неспецифической адсорбции в лунки вносили 100 мкл 1% раствора лошадиной сыворотки в PBS-T. Планшет инкубировали при 37°C в течение 1 часа и повторяли процедуру отмывки.

Исследование сывороток от коров проводили следующим образом. На каждое разведение лизата клеток *E3.pET22/gr51* вносили разведения сыворотки от больного и здорового животного. Разведения сыворотки начинали с 1:100 до 1:12800. В две лунки (D12, E12) вносили по 5 мкл положительной контрольной сыворотки (K+); в две лунки (F12, G12) - по 5 мкл отрицательной контрольной сыворотки (K-); в лунку H12 – сыворотки не вносятся (контроль конъюгата).

Планшет с исследуемыми сыворотками инкубировали при температуре 37°C в течение 60 минут. После инкубирования лунки планшета отмывали от несвязавшихся компонентов и инкубировали с антивидовым конъюгатом. Для этого во все лунки планшеты вносили по 100 мкл рабочего разведения антивидового конъюгата. Рабочее разведение конъюгата готовили на PBS-T. После инкубирования повторяли процедуру отмывки. В лунки вносили по 100 мкл раствора тетраметилбензида. Планшет инкубировали при 18-22°C в тёмном месте в течение 30 минут. Реакцию останавливали внесением 100 мкл 2М серной кислоты. После остановки реакции определяли оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм. Бланк фотометра выставляли по контрольной лунке H12 (контроль конъюгата).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В ранее опубликованных нами работах описан рекомбинантный *gr51* антиген, полученный на основе экспрессионного вектора *pET32*, несущий ген тиоредоксина. Тиоредоксин - полифункциональный белок с молекулярной массой 12 кДа, присутствующий во всех прокариотических и эукариотических организмах. Одним из важных свойств тиоредоксина в том, что он способен облегчить образование нативных дисульфидных связей при свертывании рибонуклеазы с неправильным расположением дисульфидных связей. Это свойство открыло большие перспективы использования тиоредоксина в генетической инженерии для предотвращения образования нерастворимых белковых агрегатов при экспрессии гетерологичных генов в кишечной палочке. Однако использование полученного антигена *gr51*+тиоредоксин в диагностических тест-системах оказалось нежелательным из-за перекрестных реакций на тиоредоксин, что неприемлемо при разработке диагностических тест-систем.

С целью решения данного вопроса ген *gp51* антигена из экспрессионной плазмиды pET32/*gp51* был переклонирован в экспрессионную плазмиду E3.pET-22 по сайтам рестрикции *Nco*I и *Xho*I (рисунок 1). Для решения проблем очистки рекомбинантного антигена в дальнейшем к гену *gp51* белка, с 3'конца, между геном белка и сайтом рестрикции *Xho*I, был добавлен ген гексагистидиновой метки. Определение нуклеотидной последовательности показало правильность вставки гена и отсутствие ошибок.

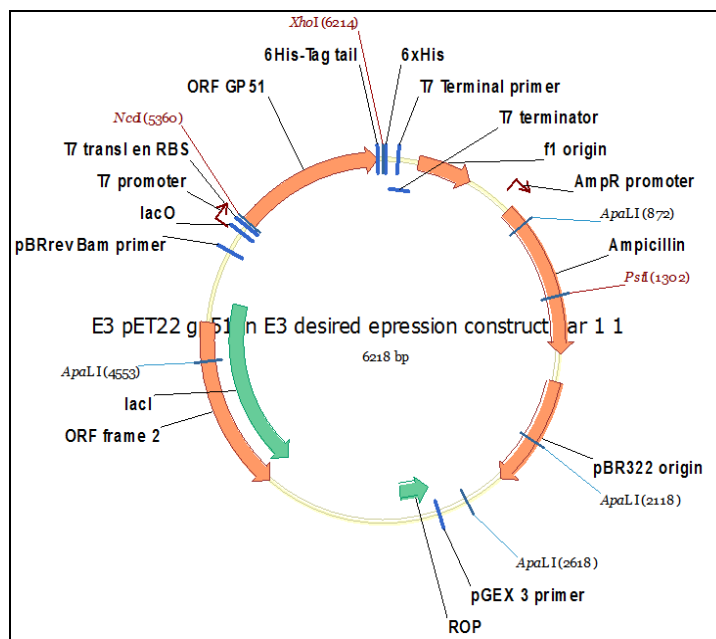
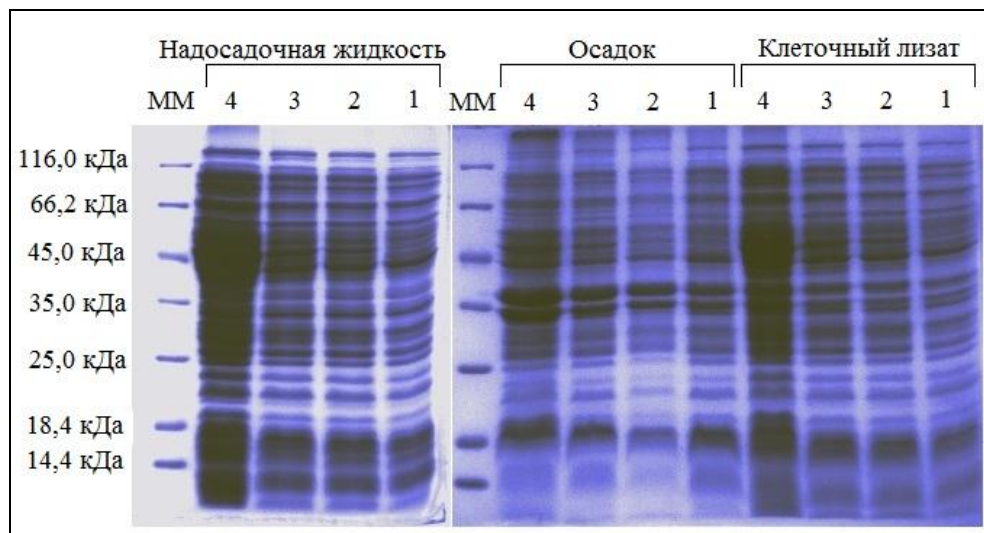


Рисунок 1 – Плазмидная карта вектора E3.pET22/*gp51*

Figure 1 - The plasmid vector map E3.pET22/*gp51*

Полученными экспрессионными плазмидами были трансформированы компетентные клетки *E. coli* штамма BL21. После культивирования трансформантов на селективной агаризованной среде не менее 5 различных клонов отбирались для последующей работы. В результате такого исследования было показано, что все клоны, содержащие полученные рекомбинантные конструкции, демонстрировали примерно одинаковый уровень продукции потенциальных антигенов. Таким образом, было показано отсутствие клоновой зависимости в экспрессии клонированных генов кандидатных белков. Исходя из этого, в дальнейшей работе использовали произвольно выбранные клоны штаммов-производителей.

Следующим шагом исследования являлось определение экспрессии гена *gp51* антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота. В качестве индуктора использовали IPTG в концентрации 0,2 мМ, индукцию проводили при температуре 24°C. Для определения времени оптимальной экспрессии антигена клеточная суспензия отбиралась через 2, 4 и 16 часов. Клетки в отобранных клеточных суспензиях после концентрирования разрушались ультразвуком и разделялись центрифугированием на растворимую и нерастворимую фракцию. Клеточный лизат, растворимую и нерастворимую фракции анализировали денатурирующим электрофорезом в 12% ПААГ (рисунок 2).



1 – без индуктора; 2 – 2 часа с индуктором; 3 – 4 часа с индуктором; 4 – 20 часов с индуктором;  
ММ – молекулярные маркеры

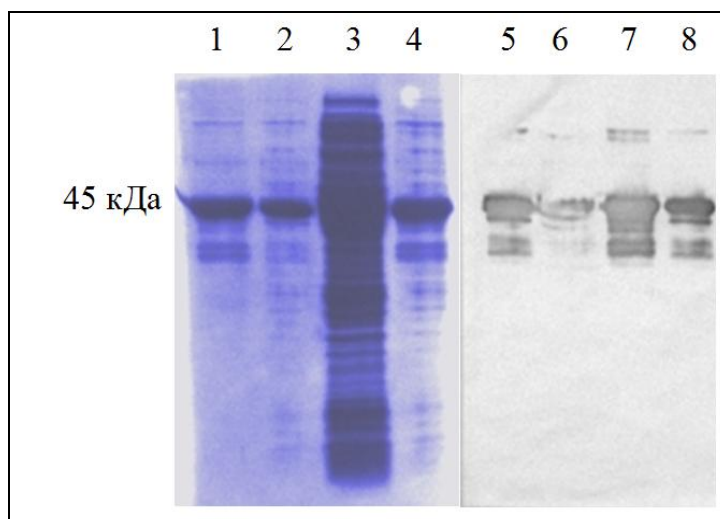
Рисунок 2 – Электрофорез клеточного лизата при определении экспрессии рекомбинантного gp51 антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота

1 - without inducator; 2 - 2 hours with the inducator; 3 - 4 hours with the inducator; 4 - 20 hours with the inducer;  
MW - molecular markers

Figure 2 - Electrophoresis of cell lysate in determining the expression of recombinant gp51 antigen bovine leukemia

В результате проведенного исследования выявлено, что наиболее высокие концентрации антигена образуются при культивировании клеток в течение 16 часов. Молекулярная масса прогнозируемого антигена составляет 45 кДа. Необходимо отметить, что после центрифугирования клеточного лизата при 18000 об/мин. в течение 30 минут прогнозируемый антиген остается в растворимой фракции.

Одним из характерных показателей экспрессий рекомбинантного белка является наличие в анализируемом материале гексагистидиновой метки. Экспрессия рекомбинантных белков в *E.coli* в виде белка с гексагистидиновой меткой является одним из наиболее распространенных способов обеспечения качественной очистки конечного продукта методом металло-хелатной хроматографии. Для определения наличия экспрессии рекомбинантного белка использованы коммерческие моноклональные антитела против гексагистидиновой метки (рисунок 3). По технической характеристике моноклональные антитела предназначены для определения локализации рекомбинантных белков в различных типах клеток, изучения топологии белков и белковых комплексов, определения связанных и характеристики вновь выявленных белков, определения белков с низким содержанием или слабо иммуногенных белков. Из рисунка 3 видно, что моноклональные антитела против гексагистидиновой метки взаимодействуют со всеми предполагаемыми рекомбинантными антигенами, в том числе с gp51 белком вируса лейкоза крупного рогатого скота.



1, 4 – электрофорез рекомбинантного VP1 антигена типа O; 2 – электрофорез рекомбинантного VP1 антигена типа Азия; 3 – электрофорез клеточного лизата gp51 антигена; 5, 8 - иммуноблот рекомбинантного VP1 антигена типа O; 6 – иммуноблот рекомбинантного VP1 антигена типа Азия; 7 – иммуноблот клеточного лизата gp51 антигена

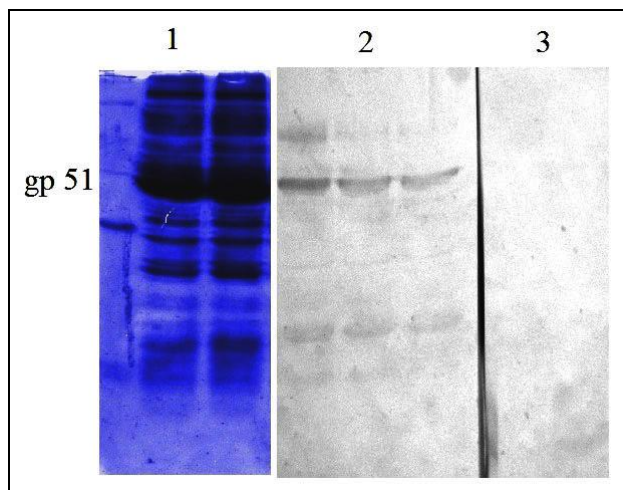
Рисунок 3 – Иммуноблот клеточного лизата gp51 антигена с моноклональными антителами против гексагистидиновой метки

1, 4 - electrophoresis of recombinant VP1 antigen type O; 2 - electrophoresis of recombinant VP1 antigen type Asia; 3 - electrophoresis of cell lysate antigen gp51; 5, 8 - immunoblot of recombinant VP1 antigen type O; 6 - immunoblot of recombinant VP1 antigen type Asia; 7 - immunoblot of cell lysate of antigen gp51

Figure 3 - The immunoblot of gp51 antigen from cell lysate with monoclonal antibodies against hexahistidine tag

Для проведения дальнейших исследований по очистке антигена необходимо было определить специфичность прогнозируемого антигена. С этой целью были проведены иммуноблот, дот-иммуноферментный анализ и иммуноферментный анализ. Для определения специфичности экспрессируемого белка использовались сыворотки от больных и здоровых животных. В результате проведенного иммуноблота выявлено, что экспрессируемый gp51 белок реагировал с антителами сыворотки от животного больного лейкозом крупного рогатого скота (рисунок 4). Реакция с антителами сыворотки от здорового животного отсутствовала.





1 – электрофорез клеточного лизата gp51 антигена; 2 – иммуноблот gp51 антигена с сывороткой от животного больного лейкозом; 3 – иммуноблот gp51 антигена с сывороткой от здорового животного

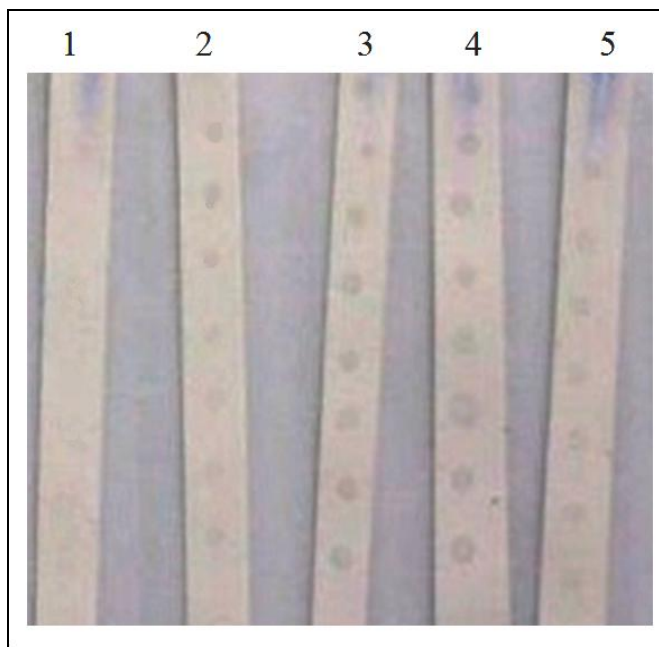
Рисунок 4 – Иммуноблот клеточного лизата gp51 антигена с сыворотками от больного и здорового животного

1 - electrophoresis of cell lysate antigen gp51; 2 - immunoblot gp51 antigen with serum from an animal suffering from leukemia; 3 - immunoblot gp51 antigen with serum from a healthy animal

Figure 4 - Immunoblot of cell lysate gp51 antigen with sera from infected animals and healthy animal

Для подтверждения результатов иммуноблота были использованы дот-иммуноферментный анализ (рисунок 5) и непрямой вариант иммуноферментный анализ (рисунки 6 и 7) с сыворотками от животных, предварительно исследованных на лейкоз коммерческой иммуноферментной тест-системой. Тест-система предназначена для определения антител против р24 антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота. Для исследования были отобраны сыворотки, показавшие отрицательный результат, слабоположительный результат и три сыворотки, показавшие явно положительный результат.

Принцип метода дот-ИФА заключался в обработке нитроцеллюлозных полосок, с нанесенными в объеме 1 мкл двукратным разведением клеточного лизата gp51 антигена с отобранными сыворотками в разведении 1:100. При подготовке разведения клеточного лизата стоковый раствор первоначально разводился до концентрации 10 мкг/мл по общему белку (рисунок 5). В результате проведенных исследований выявлено, что сыворотки, положительно реагировавшие с р24 антигеном, реагируют с клеточным лизатом, содержащим рекомбинантный gp51 антиген.



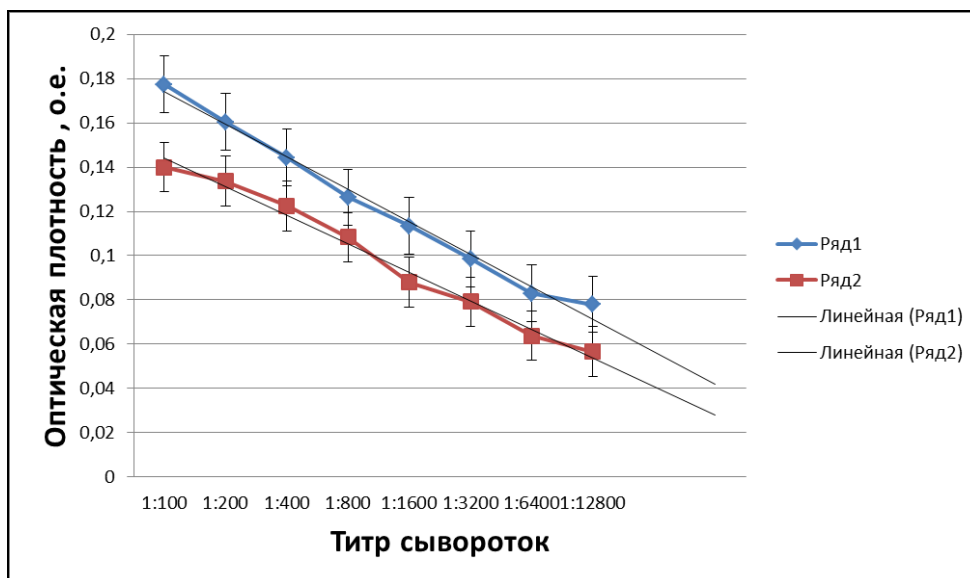
1 – отрицательная сыворотка; 2 – слабоположительная сыворотка; 3-5 – положительные сыворотки

Рисунок 5 – Дот-иммуферментный анализ gp51 антигена с сыворотками от больных животных

1 - negative serum; 2 - weakly positive sera; 3-5 - positive sera

Figure 5 - Dot - EISA gp51 antigen with sera from infected animals

Принцип иммуноферментного анализа заключался в иммобилизации иммунологического планшета клеточным лизатом, содержащим рекомбинантный gp51 белок вируса лейкоза в концентрации 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6 и 0,3 мкг/мл по белку. На данные разведения клеточного лизата вносились разведения сывороток, начиная с 1:100 до 1:12800. Полученные показатели оптической плотности использовались для расчета среднего значения, как по титрации сыворотки, так и по концентрациям антигена. Из рисунка б видно, что наличие gp51 антигена в клеточном лизате четко дифференцирует положительные и отрицательные сыворотки на всех разведениях. Средние значения оптической плотности положительной сыворотки в разведении 1:100 составили 0,18, тогда как показатели отрицательной сыворотки в этом же разведении составили 0,14. Довольно высокие показатели отрицательной сыворотки можно объяснить наличием значительной концентрации примесных белков в клеточном лизате. Тем не менее, использование линейного прогнозирования показывает, что даже на более высоких разведениях сывороток будет наблюдаться значительное различие между ними. Более того, прогностический анализ показателей иммуноферментного анализа при разведении клеточного лизата выявил, что снижение концентрации клеточного лизата ниже 0,15 мкг/мл по белку приведет к исчезновению различия между положительными и отрицательными сыворотками на любых разведениях (рисунок 7).

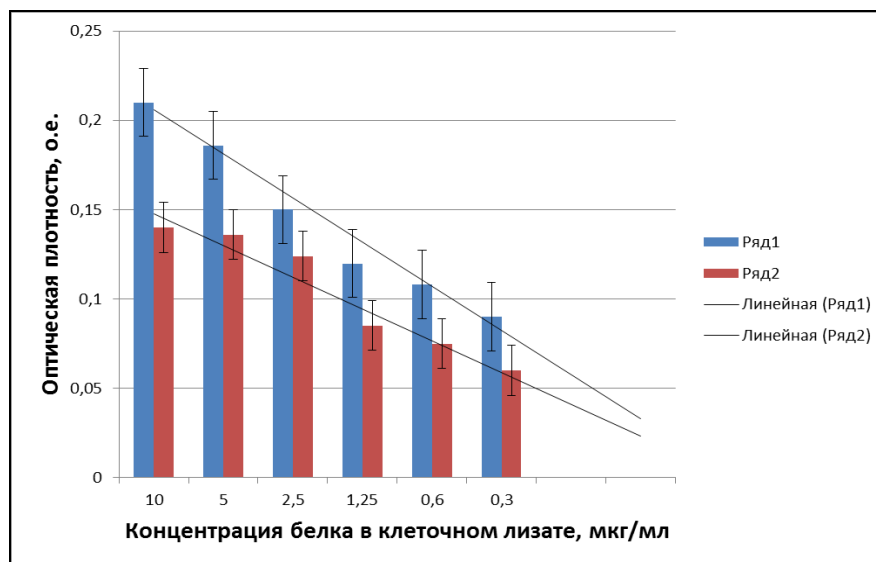


ряд 1 – сыворотка от животного больного лейкозом; ряд 2 – сыворотка здорового животного

Рисунок 6 – Показатели иммуноферментного анализа клеточного лизата, содержащего рекомбинантный gp51 белок вируса лейкоза в зависимости от разведения сывороток

a number of 1 - serum from infected animals; a number of 2 - healthy animal serum

Figure 6 - Results ELISA of cell lysate containing a recombinant protein of leukemia virus gp51 depending on dilution of sera



ряд 1 – сыворотка от животного больного лейкозом; ряд 2 – сыворотка здорового животного

Рисунок 7 – Показатели иммуноферментного анализа в зависимости от концентрации клеточного лизата, содержащего рекомбинантный gp51 белок вируса лейкоза

a number of 1 - serum from infected animals; a number of 2 - healthy animal serum

Figure 7 - Results ELISA depending on the concentration of cell lysate containing a recombinant protein of leukemia virus gp51

Полученные результаты иммуноблота, дот-ИФА и иммуноферментного анализа демонстрируют наличие в лизате клеток кишечной палочки, трансформированных вектором E3.pET22/gp51, белка специфически реагирующих с антителами сывороток от больных

лейкозом животных. Аналогичные результаты описаны Siakkou H. с соавторами (1990), которые получили гибридные белки, состоящие из бета-галактозидазы и полипептидов вируса лейкоза крупного рогатого скота, это р24, gp51 и трансмембранный gp30 белок, экспрессированные в кишечной палочке, и изучили их иммунологические характеристики. Все полученные гибридные белки обладали иммунологической активностью с сыворотками от крупного рогатого скота, больных лейкозом крупного рогатого скота, демонстрируя возможности использования их в диагностике лейкоза. При этом наиболее чувствительными тестами были тесты на основе р24 антигена [7].

Jozef Van с соавторами (1992), используя вектор pEV-vrf1, экспрессировали различные фрагменты гликопротеина 51 вируса лейкоза крупного рогатого скота в клетках *E.coli* штамма N-4830-1 и изучили их диагностические характеристики. Для получения библиотеки фрагментов гена gp51 авторами использована технология фагового дисплея. Рекомбинантные фаги скринировались моноклональными антителами против gp51 антигена вируса лейкоза. Далее, гены фрагментов gp51 антигена отобранных клонов переклонировались в экспрессионный вектор и трансформировались в компетентные штаммы кишечной палочки. Данные, полученные автором, подтверждают наличие у gp51 антигена двух различных участков, хорошо структурированной N-концевой части, биологическая активность конформационных эпитопов которого зависит от точного гликозилирования и C-концевой части, конформационные эпитопы которого лишены посттрансляционного гликозилирования. По мнению авторов, все исследованные эпитопы являются важными в диагностическом плане [6].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований получен рекомбинантный gp51 протеин, экспрессированный в *E.coli* без тиоредоксиновой вставки. Для этого с 3'конца гена gp51 белка вируса лейкоза крупного рогатого скота добавлен ген гексагистидиновой метки, после чего ген клонирован в экспрессионный вектор E3.pET22. Проведена трансформация вектора, несущего ген gp51 вируса лейкоза. Определены параметры экспрессии gp51 белка трансформированными штаммами микроорганизма. Молекулярно-генетическими и иммунохимическими методами доказана экспрессия gp51 белка вируса лейкоза крупного рогатого скота.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проводилось при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (шифр №04.01 в рамках Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» на 2012-2014 гг).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Johnson R., Kaneene J.B. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis // Vet. Bull. – 1992. – Vol. 62. – P. 287-312.
2. Sagata N., Yasuaga T., Tsuzuku-Kawamura J., Ohish K., Ogawa Y., Ikawa Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1985. – Vol. 82. - P. 677-681.
3. Deshayes L, Levy D, Parodi AL, Levy JP. Spontaneous immune response of bovine leukemia virus infected cattle against five different viral proteins // Int. J. Can. – 1980. – Vol. 25. - P. 503-508.
4. Sota Kobayashi, Toshiyuki Tsutsui, Takehisa Yamamoto, Yoko Hayama, Ken-ichiro Kameyama, Misako Konishi, Kenji Murakami. Risk factors associated with within-herd

transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan // *Veterinary Research*. – 2010. – Vol. 6 // <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/1>

5. Van der Maaten M., Miller J. M. Bovine leukosis virus // *In* Z. Dinter and B. Morein (ed.), *Virus infections of ruminants*. Elsevier Science Publishers B.V. – Amsterdam, Netherlands. – 1990. – P. 419–429.

6. Ban J., Czene S., Altaner C., Callebaut I., Krchnak V., Merza M., Burny A., Kettmann R., Portetelle D. Mapping of sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukemia virus external glycoprotein expressed in *Escherichia coli* by means of anti-peptide antibodies // *J. Gen. Virol.* – 1992. – Vol. 73. – P. 2457–2461.

7. Siakkou H., Ulrich R., Uelze A., Mohring R., Rosenthal S. Immunological characterization of BLV proteins synthesized in *Escherichia coli* // *Acta Virol.* – 1990. – Vol. 34. – P. 256–262.

8. Ulrich R., Siakkou H., Platzer C., Bossmann H., Mohring R., Wiedmann M., Bahrng S., Rosenthal S. Synthesis of bovine leukemia virus antigen in *Escherichia coli* // *Arch. Exp. Vet. Med. Leipzig*. – 1990. – Vol. 44. – P. 909–916.

9. Legrain M., Portetelle D., Dumont J., Burny A., Hilger F. Biochemical and immunological characterization of the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene*. – 1989. – Vol. 79. – P. 227–237.

10. Kumar S., Andrew M.E., Boyle D.B., Brandon R.B., Lavin M.F., Daniel R.C.W. Expression of bovine leukemia virus envelope gene by recombinant vaccinia virus // *Virus Res.* – 1990. – Vol. 17. – P. 131–142.

11. Portetelle D., Limbach K., Burny A., Mammerickx M., Desmetre P., Riviere M., Zavada J., Paoletti E. Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leukemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection // *Vaccine*. – 1991. – Vol. 9. – P. 194–200.

12. Kabeya H., Ohashi K., Ohishi K., Sugimoto C., Amanuma H., Onuma M. An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep // *Vaccine*. – 1996. – Vol. 14. – P. 1118–1122.

13. Russo S., Montermini L., Berkovitz-Siman-Tov R., Ponti W., Poli G. Expression of bovine leukemia virus Env glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol. 436. – P. 11–16.

14. Gutierrez G., Alvarez I., Fondevila N., Politzki R., Lomornaco M., Rodriguez S., Dus Santos M.J., Trono Veterinary K. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA // *Microbiology*. – 2009. – Vol. 137. – P. 224–234.

15. Alejandra Larsen, Ester Teresa Gonzalez, Mari'a Soledad Serena, Mari'a Gabriela Echeverri'a, Eduardo Mortola. Expression of p24 gag Protein of Bovine Leukemia Virus in Insect Cells and Its Use in Immunodetection of the Disease // *Mol Biotechnol.* – 2012.

16. De Giuseppe A., Feliziani F., Rutili D., De Mia G.M. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme linked immuno sorbent assay // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2004. – Vol. 11. – P. 147–151.

17. Merza M., Sundquist B., So'ber J., Morein B. Immunoaffinity purification of two major proteins of bovine leukemia virus (gp51 and p24) and their use for discrimination between vaccinated and infected animals // *J. Virol. Methods*. – 1991. – Vol. 33. – P. 345–353.

18. Voneche V., Portetelle D., Kettmann R., Willems L., Limbach K., Paoletti E., Ruyschaert J. M., Burny A., Brasseur R. Fusogenic segment of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – Vol. 89. – P. 3810–3814.

19. Noteborn M.H.M., de Boer G.F., Kant A., Koch G., Bos J.L., Zantema A., Van der Eb A.J. Expression of avian leukemia virus *env*-gp85 in *Spodoptera frugiperda* cells by use of baculovirus expression vector // *J. Gen. Virol.* – 1990. – Vol. 71. – P. 2641–2648.

20. Zajac V., Slavikova K., Babusikova O. Expression of env gene of bovine leukemia virus in rodent cells // *Arch. Virol.* – 1994. – Vol. 135. – P. 201–207.

21. Neurath A.R., Strick N., Lee E.S.Y. B cell epitope mapping of human immunodeficiency virus envelope glycoproteins with long (19- to 36-residue) synthetic peptides // *J. Gen. Virol.* – 1990. – Vol. 71. – P. 85-95.
22. Callebaut I., Burny A., Krchnák V., Gras-Masse H., Wathelet B., Portetelle D. Use of Synthetic Peptides to Map Sequential Epitopes Recognized by Monoclonal Antibodies on the Bovine Leukemia Virus External Glycoprotein // *Virol.* – 1991. – Vol. 185. – P. 48-55.
23. Ball J.M., Rushlow K.E., Issel C.J., Montelaro R.C. Detailed Mapping of the Surface Unit Glycoprotein of Equine Infectious Anemia Virus by Using Synthetic Peptide Strategies // *J. Virol.* – 1992. – Vol. 66. – P. 732-742.
24. Kabeya H., Ohashi K., Ohishi K., Sugimoto C., Amanuma H., Onuma M. An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (VLB) infected cells in carrier sheep // *Vaccine.* – 1996. – Vol. 14. – P. 1118-1122.
25. Soutullo A., Verwimp V., Riveros M., Pauli R., Tonarelli G. Desing and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides // *Vet. Microbiol.* – 2001. – Vol. 79. – P. 111-121.
26. Soutullo A., García M.I., Bailat A., Racca A., Tonarelli G., Borel I.M. Antibodies and PBMC from EIAV infected carrier horses recognize gp45 and p26 synthetic peptides // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2005. – Vol. 108. – P. 335-343.
27. Folgori A., Tafi R., Meola A., Felici F., Galfre G., Cortese R., Monaci P., Nicosia A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera // *EMBO J.* – 1994. – Vol. 13. – P. 2236-2243.
28. Pasqualini R., Koivunen E., Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins // *J. Cell Biol.* – 1995. – Vol. 130. – P. 1189-1196.
29. Sioud M., Forre O., Dybwad A. Selection of ligands for polyclonal antibodies from random peptide libraries: potential identification of (auto) antigens that may trigger B and T cell responses in autoimmune diseases // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1996. – Vol. 79. – P. 105-114.
30. Elizangela Maira dos Santos, Rone Cardoso, Luiz Ricardo Goulart Filho, Marcos Bryan Heinemann, Rômulo Cerqueira Leite, Jenner Karlisson Pimenta dos Reis. Selection of ligand peptides with the ability to detect antibodies in enzootic bovine leukosis // *African Journal of Biotechnology.* – 2012. – Vol. 11. – P. 7302-7312.
31. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1982.
32. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – Vol. 74. – P. 5463-5467.
33. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
34. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.

## REFERENCES

1. Johnson R., Kaneene J.B. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.* 1992, vol. 62, pp. 287-312.
2. Sagata N., Yasuaga T., Tsuzuku-Kawamura J., Ohish K., Ogawa Y., Ikawa Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, vol. 82, pp. 677-681.
3. Deshayes L., Levy D., Parodi A.L., Levy J.P. Spontaneous immune response of bovine leukemia virus infected cattle against five different viral proteins. *Int. J. Can.*, 1980, vol. 25, pp. 503-508.

4. Sota Kobayashi, Toshiyuki Tsutsui, Takehisa Yamamoto, Yoko Hayama, Ken-ichiro Kameyama, Misako Konishi, Kenji Murakami. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *Veterinary Research*, 2010, vol. 6: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/1>

5. Van der Maaten M., Miller J.M. Bovine leukosis virus. In Z. Dinter and B. Morein (ed.), *Virus infections of ruminants. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. Netherlands*, 1990, pp. 419–429.

6. Ban J., Czene S., Altaner C., Callebaut I., Krchnak V., Merza M., Burny A., Kettmann R., Portetelle D. Mapping of sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukemia virus external glycoprotein expressed in *Escherichia coli* by means of anti-peptide antibodies. *J. Gen. Virol.*, 1992, vol. 73, pp. 2457–2461.

7. Siakkou H., Ulrich R., Uelze A., Mohring R., Rosenthal S. Immunological characterization of BLV proteins synthesized in *Escherichia coli*. *Acta Virol*, 1990, vol. 34, pp. 256–262.

8. Ulrich R., Siakkou H., Platzer C., Bossmann H., Mohring R., Wiedmann M., Bahring S., Rosenthal S. Synthesis of bovine leukemia virus antigen in *Escherichia coli*. *Arch. Exp. Vet. Med.* Leipzig, 1990, vol. 44, pp. 909–916.

9. Legrain M., Portetelle D., Dumont J., Burny A., Hilger F. Biochemical and immunological characterization of the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1989, vol. 79, pp. 227–237.

10. Kumar S., Andrew M.E., Boyle D.B., Brandon R.B., Lavin M.F., Daniel R.C.W. Expression of bovine leukemia virus envelope gene by recombinant vaccinia virus. *Virus Res*, 1990, vol. 17, pp. 131–142.

11. Portetelle D., Limbach K., Burny A., Mammerickx M., Desmettre P., Riviere M., Zavada J., Paoletti E. Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leukemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection. *Vaccine*, 1991, vol. 9, pp. 194–200.

12. Kabeya H., Ohashi K., Ohishi K., Sugimoto C., Amanuma H., Onuma M. An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. *Vaccine*, 1996, vol. 14, pp. 1118–1122.

13. Russo S., Montermini L., Berkovitz-Siman-Tov R., Ponti W., Poli G. Expression of bovine leukemia virus Env glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus. *FEBS Lett*, 1998, vol. 436, pp. 11–16.

14. Gutierrez G., Alvarez I., Fondevila N., Politzki R., Lomornaco M., Rodriguez S., Dos Santos M.J., Trono Veterinary K. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Microbiology*, 2009, vol. 137, pp. 224–234.

15. Alejandra Larsen, Ester Teresa Gonzalez, Mari'a Soledad Serena, Mari'a Gabriela Echeverri'a, Eduardo Mortola. Expression of p24 gag Protein of Bovine Leukemia Virus in Insect Cells and Its Use in Immunodetection of the Disease. *Mol Biotechnol*, 2012. doi 10.1007/s12033-012-9587-7.

16. De Giuseppe A, Feliziani F, Rutili D, De Mia GM. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme linked immuno sorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*, 2004, vol. 11, pp. 147–151.

17. Merza M., Sundquist B., So'ber J., Morein B. Immunoaffinity purification of two major proteins of bovine leukemia virus (gp51 and p24) and their use for discrimination between vaccinated and infected animals. *J. Virol. Methods*, 1991, vol. 33, pp. 345–353.

18. Voneche V., Portetelle D., Kettmann R., Willems L., Limbach K., Paoletti E., Ruyschaert J. M., Burny A., Brasseur R. Fusogenic segment of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, pp. 3810–3814.

19. Noteborn M.H.M., de Boer G.F., Kant A., Koch G., Bos J.L., Zantema A., Van der Eb A.J. Expression of avian leukemia virus env-gp85 in *Spodoptera frugiperda* cells by use of baculovirus expression vector. *J. Gen. Virol*, 1990, vol. 71, pp. 2641–2648.

20. Zajac V., Slavikova K., Babusikova O. Expression of env gene of bovine leukemia virus in rodent cells. *Arch. Virol*, 1994, vol. 135, pp. 201–207.
21. Neurath A.R., Strick N., Lee E.S.Y. B cell epitope mapping of human immunodeficiency virus envelope glycoproteins with long (19- to 36-residue) synthetic peptides. *J. Gen. Virol*, 1990, vol. 71, pp. 85-95.
22. Callebaut I., Burny A., Krchnák V., Gras-Masse H., Wathelet B., Portetelle D. Use of Synthetic Peptides to Map Sequential Epitopes Recognized by Monoclonal Antibodies on the Bovine Leukemia Virus External Glycoprotein. *Virol*, 1991, vol. 185, pp. 48-55.
23. Ball J.M., Rushlow K.E., Issel C.J., Montelaro R.C. Detailed Mapping of the Surface Unit Glycoprotein of Equine Infectious Anemia Virus by Using Synthetic Peptide Strategies. *J. Virol*, 1992, vol. 66, pp. 732-742.
24. Kabeya H., Ohashi K., Ohishi K., Sugimoto C., Amanuma H., Onuma M. An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (VLB) infected cells in carrier sheep. *Vaccine*, 1996, vol. 14, pp. 1118-1122.
25. Soutullo A., Verwimp V., Riveros M., Pauli R., Tonarelli G. Desing and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Vet. Microbiol*, 2001, vol. 79, pp. 111-121.
26. Soutullo A., García M.I., Bailat A., Racca A., Tonarelli G., Borel I.M. Antibodies and PBMC from EIAV infected carrier horses recognize gp45 and p26 synthetic peptides. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 2005, vol. 108, pp. 335-343.
27. Folgori A., Tafi R., Meola A., Felici F., Galfre G., Cortese R., Monaci P., Nicosia A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.*, 1994, vol. 13, pp. 2236-2243.
28. Pasqualini R., Koivunen E., Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.*, 1995, vol. 130, pp. 1189-1196.
29. Sioud M., Forre O., Dybwad A. Selection of ligants for polyclonal antibodies from random peptide libraries: potential identification of (auto) antigens that may trigger B and T cell responses in autoimmune diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol*, 1996, vol. 79, pp. 105-114.
30. Elizangela Maira dos Santos, Rone Cardoso, Luiz Ricardo Goulart Filho, Marcos Bryan Heinemann, Rômulo Cerqueira Leite, Jenner Karlisson Pimenta dos Reis. Selection of ligand peptides with the ability to detect antibodies in enzootic bovine leukosis. *African Journal of Biotechnology*, 2012, vol. 11, pp. 7302-7312.
31. Maniatis T., Fritch Je., Sjembruk Dzh. *Molekuljarnoe klonirovanie* [Molecular cloning]. Moscow, Mir, 1982. 479 p.
32. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, pp. 5463-5467.
33. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680-685.
34. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 1976, vol.72, pp. 248–254.

## ТҮЙІН

Ірі қара малдың лейкозының негізгі құрылымдық ақуызы р24 және гликопротеин gp51 ақуызы негізгі диагностикалық антигендер болып табылады. Осыған байланысты зерттеулердің негізгі бөлігі рекомбинантты антигендерді алуға бағытталған. gp51 және р24 антигенінің көзі ретінде вируспен созылмалы түрде жұқтырылған (FLK) қой эмбрионының бүйрек жасушаларының линияларынан алынатын вирусты пайдаланады. Бұл әдіс еңбекті көп қажет етеді және тиімділігі төмен, соңғы өнімнің шығымы аз болып отыр. Соңғы онжылдықта әр түрлі зерттеушілер Env гені гликопротеиндерін гетерологиялық жүйелерде, мысалы ішек таяқшасы, *Saccharomyces cerevisiae*, сонымен қатар сиыр шешегінің вирусының рекомбинантты жүйесінен, соңғы уақытта бакуловирустық жүйесінде экспрессиялауды сипаттады.

Алдыңғы жарияланған жұмыстарымызда тиоредоксин генін алып жүруші рЕТ32 экспрессионды векторының



негізінде алынған рекомбинантты gp51 антигенін сипаттап жазғанбыз. Дегенмен, алынған gp51+тиоредоксин антигенді диагностикалық тест-жүйелерінде қолдану нәтижелі реакцияларға қол жеткізбеді, тиоредоксинге тоғыспалы реакциялар жүруіне байланысты, бұндай нәтиже жоғары тиімді тест-жүйелерін әзірлеуде, әсіресе иммунохроматография және иммуноферментті талдауда жіберілмейді. Осыған байланысты жұмыстың мақсаты болып тиоредоксинсіз ішек таяқшасында экспрессияланған ірі қара малдың лейкозы вирусына gp51 рекомбинантты ақуызды алу болып табылады.

Жұмыс барысында иммунологиялық, биохимиялық, серологиялық және биотехнологиялық зерттеулер қолданылды.

Жүргізілген жұмыстар нәтижесінде ірі қара малдың лейкозының gp51 ақуызының 3' гені соңына гексагистидинді белгісі бар ген қосылды, содан кейін E3.pET22 экспрессионды векторында ген клондалды. Лейкоз вирусының gp51 генін алып жүруші вектордың трансформациясы жасалынды. Микроорганизмдер штамдарымен трансформацияланған gp51 ақуызын экспрессиялаудың параметрлері анықталды. Өр түрлі аналитикалық және иммунохимиялық әдістермен ізденіп зерттеп отырған ақуызды экспрессиялау дәлелденді.

**Кілтті сөздер:** вирус, лейкоз, gp51, рекомбинантты антиген, иммуноферментті талдау, диффузды преципитациялау реакциясы.