

УДК 619:616.98.578.828.11Л

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СИНТЕЗИРОВАННОГО В *ESCHERICHIA COLI* РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА GP51 ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

К.Н. Мукунтаев, А.В. Шустов, Ы. Сыдыкнаби, Ш. Байдосова, К.К. Муканов

РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Астана  
lii@biocenter.kz

Важным аспектом предотвращения распространения лейкоза крупного рогатого скота является серологическая диагностика болезни. Основными диагностическими методами в программах по профилактике и ликвидации болезни считаются реакция диффузионной преципитации и иммуноферментный анализ.

В диагностических тест-системах для выявления маркёров инфекции лейкоза крупного рогатого скота в качестве антигена традиционно используется инактивированный вирус, выращенный в культурах клеток FLK. Такой антиген достаточно часто демонстрирует перекрестные реакции с антителами к другим вирусам животных. Возможной причиной снижения специфичности теста является коинфекция культур клеток FLK вирусами, присутствующими в фетальной сыворотке, добавляемой в среды для клеточных культур. Для повышения специфичности диагностических тестов разработан метод получения рекомбинантного антигена gp51 вируса лейкоза КРС с использованием бакуловирусных векторов. Однако данная технология не полностью решает существующие проблемы, так как она предусматривает использование дорогостоящих питательных сред и не избавляет от необходимости многостадийной очистки антигена. Методы генетической инженерии позволили создать эффективные бактериальные штаммы-продуценты рекомбинантных антигенов для диагностики разнообразных ветеринарных инфекций. Технология рекомбинантных ДНК позволяет получить высокоочищенные стабильные препараты рекомбинантного гликопротеина gp51 вируса лейкоза КРС.

Целью работы является разработка системы для бактериальной продукции рекомбинантного антигена gp51 вируса лейкоза КРС и изучение его диагностических свойств.

В результате выполненных исследований создан дизайн генноинженерной конструкции и синтезирована нуклеотидная последовательность гена gp51 длиной 858 пар оснований. Полученный ген клонирован в составе плазмиды для белковой экспрессии pET32/gp51. Получен штамм-продуцент *E.coli* BL21pET32/gp51 и отработаны параметры индукции рекомбинантного антигена gp51 в клетках штамма-продуцента с целью увеличения выхода целевого продукта. Разработан метод иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного антигена gp51. Результаты исследования лабораторной панели сывороток животных в непрямом ИФА показали полное совпадение с результатами рутинно используемого метода диагностики лейкоза КРС - реакции диффузионной преципитации (РДП).

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

### ВВЕДЕНИЕ

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) - РНК-содержащий вирус, относится к семейству *Retroviridae*, подсемейству *Oncoviridae*, вызывает энзоотический лейкоз, злокачественную болезнь лимфатической системы. Лейкоз крупного рогатого скота диагностируются почти во всех странах мира, вследствие чего Международное эпизоотическое бюро (МЭБ) включило болезнь в список наиболее широко распространенных болезней животных [1, 2, 3]. Отмечается высокая вариабельность болезни, как по ареалу распространения, так и по выраженности клинических признаков. Вариабельность заболеваемости в разных хозяйствах зависит от породы животных, климатических факторов, условия содержания и кормления. Например, у 30-70% зараженных животных лейкоз может проявляться в виде лимфоцитоза, а у 1-5% в виде лимфосаркомы [4, 5]. Наиболее важными нозологическими факторами развития клинических форм болезни являются наследственная предрасположенность и иммунологическая недостаточность.

Лабораторная диагностика лейкоза в разное время опиралась на гистологические и гематологические исследования, индикаторные культуры (кокультивирование лимфоцитов периферической крови животных с монослоями чувствительных клеток *in vitro*). В настоящее время для этиологической диагностики лейкоза КРС наиболее часто используются реакция диффузионной преципитации (РДП) с лейкозным антигеном и

методы молекулярной диагностики – полимеразная цепная реакция. Метод иммуноферментного анализа (ИФА) нашёл широкое применение в ветеринарной серологической диагностике [6, 7, 8]. РДП и ИФА приняты Международным эпизоотическим бюро (МЭБ) в качестве тестов на лейкоз КРС, используемых при международной торговле скотом [9, 10, 11].

Серологическая диагностика лейкоза в основном базируется на использовании вирусных белков p24 и gp51. На основе p24 и gp51 антигенов и специфических моноклональных антител разработаны различные варианты тест-систем [12, 13, 14, 15, 16]. Основным источником антигенов gp51 и p24 является вирус, нарабатываемый в культурах клеток почек эмбриона овцы (FLK), персистентно инфицированных вирусом. Выделение и очистка вируса из клеток FLK является малоэффективным и трудоемким процессом, с очень низким выходом конечного продукта. Вирусный белок – продукт гена *gag* (p24) был произведён в *E.coli* [17, 18], тогда как один из поверхностных гликопротеинов вируса, закодированный в гене *env* (gp51), получен в *Saccharomyces cerevisiae* [19], в культурах клеток, инфицированных рекомбинантным вирусом оспы коров [20, 21], и в последнее время, с использованием бакуловирусного вектора [22, 23]. По мнению De Giuseppe (2004), получение gp51 в бактериях или дрожжах имеет преимущества по сравнению с выделением внутриклеточного gp51, продуцируемого вирусом в инфицированных клетках по причине простоты очистки [24]. Диагностическими антигенами с потенциально большим применением являются синтетические пептиды. Синтетические пептиды, мимикрирующие иммунодоминантные эпитопы белков патогенов, имеют широкий потенциал использования в диагностических системах [25, 26, 27, 28, 29]. Для выбора таких пептидов при разработке тест-системы для диагностики лейкоза КРС dos Santos с соавторами использовала технологию фагового дисплея [30].

Целью данной работы являлось получение рекомбинантного антигена gp51 и изучение его диагностических свойств.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Бактериальные штаммы*

В работе использовали штаммы *E. coli* BL21(DE3) и XLBlue (Novagen, USA). Клетки *E.coli* выращивали на жидкой и плотной питательных средах LB.

### *Получение гена gp51 антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота и создание генетической конструкции*

Молекулярно-генетический дизайн проводили с использованием программного обеспечения Vector NTI 11.5 (Invitrogen). Сборку гена gp51 вируса лейкоза КРС проводили из олигомеров длиной 60 нт. Синтез гена проводили в двухраундовой полимеразой цепной реакции с использованием полимеразы Phusion Hot Start DNA Polymerase. Продукт ПЦР первого раунда использовали в качестве матрицы в ПЦР второго раунда, которую осуществляли с парой фланкирующих праймеров, несущих сайты рестрикции для клонирования гена в составе экспрессирующей конструкции. Для подтверждения правильности сборки гена ПЦР-амплификаты клонировали в составе плазмид на основе вектора pGEM-T Easy (Promega, USA), отобранные клоны использовали для наработки плазмидной ДНК для последующего секвенирования. ДНК рекомбинантных плазмид выделяли из трансформированных клеток штамма *E.coli* XLBlue с использованием набора PureYield Plasmid Miniprep System (Promega, США). Первичную структуру ДНК определяли с использованием наборов BigDye v.3.1 на автоматических анализаторах ДНК ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США).

Экспрессионная плазида получена путём клонирования гена gp51 в составе вектора pET32. Гидролиз плазмидных ДНК проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции NcoI и XhoI (Fermentas, Литва). Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 1% легкоплавкой агарозе. Электрофорез проводили при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере (0,04 М трис-ацетат pH 8,1, 0,002М ЭДТА) содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия, при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30-60 мин. Целевые фрагменты ДНК экстрагировали из геля смесью фенол-хлороформ и хлороформом, после чего осаждали ДНК этанолом. Очищенные фрагменты ДНК лигировали ДНК-лигазой фага T4.

### *Гетерологичная экспрессия клонированных генов*

Компетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали полученными экспрессионными плазидами, 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 mM. После добавления индуктора температуру культивирования снижали до 28°C и продолжали инкубацию в течение 4-5 часов. Биомассу бактерий собирали центрифугированием (3000 g, 15'), осадок бактерий ресуспендировали в охлажденном буфере TNE (20 mM Tris pH7,5; 1 mM EDTA; 100 mM 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.

### *Постановка иммуноблотинга*

Электрофоретический перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили с

использованием прибора для иммуноблотинга (Hoefer 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 хлор-нафтолом в присутствии перекиси водорода.

#### Иммуноферментный анализ

Для проведения ИФА использовали метод с истощением гетерофильных антител. В каждом эксперименте использовали по два 96-луночных планшета, на которые наносили разные антигены в соответствии со схемой: на планшет №1 иммобилизовали белки из лизата культуры штамма-продуцента BL21pET32/gp51. На планшет №2 наносили в том же разведении лизат клеток штамма BL21pET32 (последний не экспрессирует лейкозный антиген). Для использованных разведений к 10 мл бикарбонатного буфера pH9,5 добавляли 100 мкл соответствующего лизата. Планшеты 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 закрывали крышкой и инкубировали при 37°C в течение 1 часа и повторяли процедуру отмывки.

Исследование сывороток от коров проводили следующим образом. В каждую лунку иммуносorbента №2 (планшет с белками *E.coli*) вносили 95 мкл PBS-T и 5 мкл сыворотки; при этом последние 5 лунок последнего ряда (лунки для контролей) оставляли свободными. 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 №2 с исследуемыми сыворотками инкубировали при температуре 37°C в течение 60 минут. После окончания инкубации жидкость из лунок планшета №2 переносили в одноименные лунки планшета №1 и инкубировали при температуре 37°C в течение 60 минут. После инкубирования лунки планшета №1 отмывали от несвязавшегося материала. Реакции с конъюгатом и хромогенным субстратом ставили с планшетом №1. Для этого во все лунки планшета №1 вносили по 100 мкл рабочего разведения антивидового конъюгата. Рабочее разведение конъюгата готовили на PBS-T. Планшет закрывали крышкой и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После инкубирования повторяли процедуру отмывки. В лунки вносили по 100 мкл раствора тетраметилбензидаина. Планшет инкубировали при 18-22°C в тёмном месте в течение 30 минут. Реакцию останавливали внесением 100 мкл 2M серной кислоты. Не более чем через 3 минуты после остановки цветной реакции определяли оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм. Бланк фотометра выставляли по контрольной лунке H12 (контроль конъюгата).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение аминокислотных последовательностей антигена gp51 изолятов вируса лейкоза КРС, представленных в базе данных Genbank, демонстрируют высокую эволюционную консервативность данного белка. Кодон ATG в позиции 5989 последовательности прототипного изолята (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAR64538.1>) использовали в качестве стартового кодона. Таким образом, из последовательности рекомбинантного белка gp51 был исключён небольшой N-концевой фрагмент, соответствующий сигнальному пептиду для транспорта белка в эндоплазматический ретикулум. Иммунодоминантные районы gp51 не включают сигнальный пептид [24, 31, 32]. Для синтеза гена gp51 была выбрана последовательность, полученная путём обратной трансляции белка gp51 из культурального антигена (рис. 1).

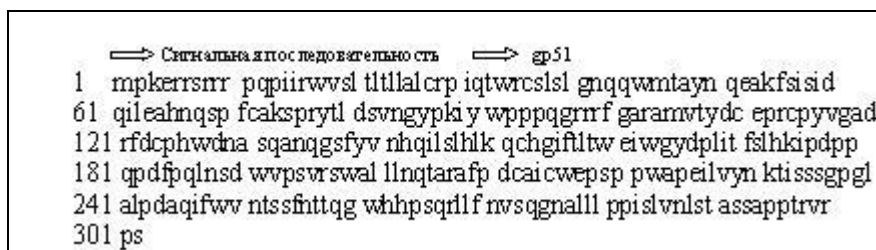
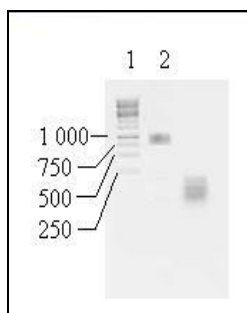


Рис. 1. Аминокислотная последовательность антигена gp51 вируса лейкоза КРС

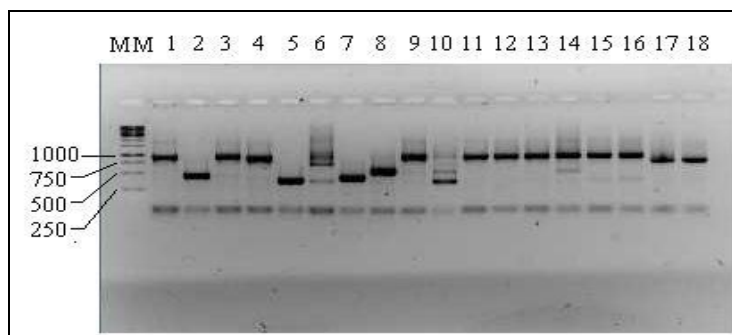
Были синтезированы 26 олигонуклеотидов длиной 60 пн, из которых синтезирован de novo ген gp51, имеющий на концах сайты рестрикции NcoI и XhoI. В ходе синтеза в ПЦР был получен продукт фрагмент ДНК длиной 858 пн (рис. 2).



1 –маркер длин ДНК; 2 – продукт ПЦР для синтеза гена *gp51*

**Рис. 2.** Результаты эксперимента по синтезу гена *gp51*

Полученный фрагмент ДНК был клонирован в плазмиды для промежуточного клонирования с использованием вектора pGEM-T Easy. Скрининг трансформантов вставки производили методом ПЦР с колоний. В соответствии с рисунком 3, 10 клонов из 18 (55%) имели вставки ожидаемой длины.

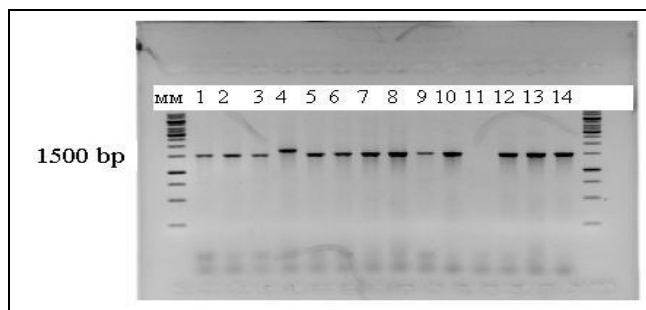


MM – маркер длин ДНК; 1-18 – результат ПЦР-скрининга с универсальными праймерами M13 Forward и M13 Reverse (Invitrogen).

**Рис. 3.** Результаты ПЦР анализа трансформантов

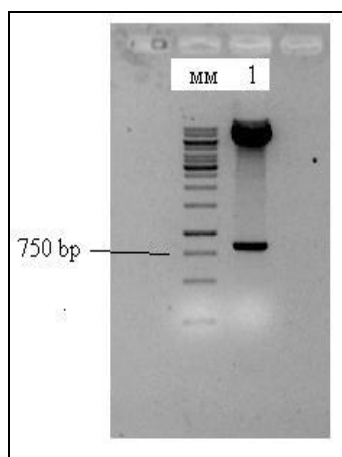
Анализ нуклеотидной последовательности клонированных вставок из нескольких отобранных клонов показал полное соответствие синтезированной последовательности ДНК расчётной структуре.

Фрагмент ДНК, несущий ген *gp51* антигена, был клонирован в экспрессионную плазмиду pET-32. Полученными экспрессионными плазмидами были электропорированы клетки штамма BL21(DE3). Тестирование 14 клонов методом ПЦР показало, что 12 клонов (85%), содержали рекомбинантную плазмиду со вставкой ожидаемой длины (рис. 4).



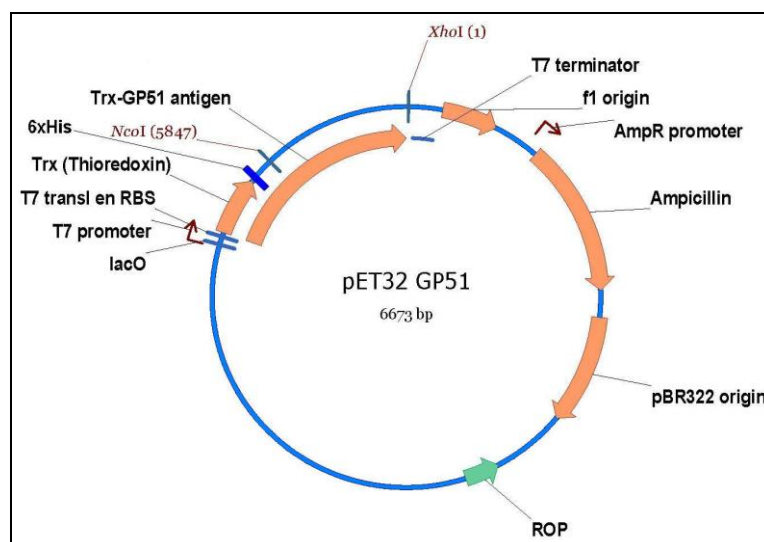
**Рис. 4.** Результат отбора клонов штамма-производителя BL21pET32/*gp51*

Рестрикционный анализ плазмиды pET32/*gp51*, выделенной из отобранных клонов, показал сохранность сайтов *NcoI* и *XhoI* по которым осуществлено клонирование (рис. 5). Обработка рестриктазами *NcoI* и *XhoI* выщепляет фрагмент ДНК размером 850 пн.



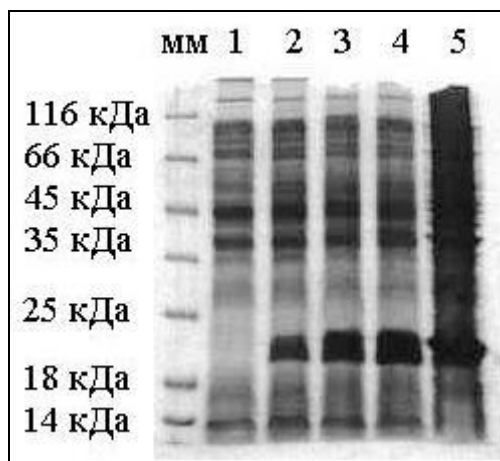
**Рис. 5.** Рестрикционный анализ плазмиды pET32/gp51

Генетическая карта плазмиды pET32/gp51 приведена на рисунке 6.



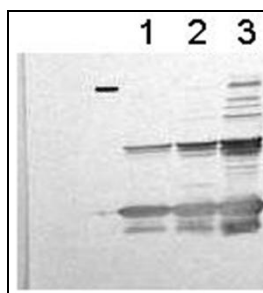
**Рис. 6.** Карта плазмиды pET-32/gp51

Для определения оптимальных условий продукции рекомбинантного белка в экспериментах варьировали концентрации индуктора экспрессии IPTG и время инкубации культуры с индуктором. Наибольший выход рекомбинантного белка был получен при 0,2 мМ IPTG и инкубации культуры с индуктором в течение 6 час (рис. 7). Было экспериментально обнаружено, что в данных условиях происходит усиленный синтез белка с молекулярной массой 22 кДа. Иммуноблот с антителами против гексагистидиновой метки (anti-His mAb) выявил присутствие в пробах лизатов клеток штамма-производителя двух белков с молекулярными массами 22 кДа и 45 кДа, содержащих гистидиновую метку (рис. 8).



MM – маркер длин белков; результаты индукции экспрессии 0,2 mM IPTG: 1 – до индукции; 2 – 2 часа после индукции; 3 – 4 часа после индукции; 4 – 6 часов после индукции; 5 – 20 часов после индукции

**Рис. 7.** Результаты эксперимента по индукции экспрессии



1 – 4 часа после индукции; 2 - 6 часов после индукции; 3 - 18 часов после индукции

**Рис. 8.** Иммуноблот лизата клеток штамма-продуцента gp51, индуцированных IPTG, с антителами против гексагистидинового метки

De Giuseppe с соавторами (2004) получал белок gp51 вируса лейкоза КРС в клетках насекомых с использованием рекомбинантного бакуловируса [24]. В описанных экспериментах также было обнаружено образование нескольких рекомбинантных белков с молекулярными массами от 32 кДа до 50 кДа, обладающих иммунореактивностью gp51. Вероятной причиной накопления в продуцирующей системе нескольких белков является ограниченный протеолиз либо, в случае белка экспрессируемого в клетках насекомых, определённую роль в наблюдаемой гетерогенности может играть переменное гликозилирование продуктов экспрессии [33, 34]. Однако, несмотря на обнаруженную гетерогенность продуктов экспрессии, в иммуноферментном анализе рекомбинантный антиген gp51 показал способность эффективно дифференцировать сыворотки крови коров из контрольной панели сывороток, маркированных или немаркированных по лейкозной инфекции.

Для определения диагностических характеристик рекомбинантного антигена gp51, синтезированного в бактериальном штамме-продуценте, использовали иммуноферментный анализ в варианте непрямого неконкурентного ИФА. В работе использовали 107 сывороток от коров с диагнозом лейкоз КРС (подтверждённым РДП) больных и 35 сывороток от здоровых животных. Все сыворотки исследовали методом РДП; эта часть работы выполнена в Республиканской ветеринарной лаборатории. Для исключения в ИФА неспецифических реакции, вызванных гетерофильными антителами, сыворотки предварительно истощали путем инкубации с лизатом клеток штамма BL21(DE3), трансформированных вектором без вставки гена gp51. Далее исследовали реактивность истощённых сывороток против лизата клеток, продуцирующих рекомбинантный gp51. Результаты изучения иммунореактивности сывороток из лабораторной панели образцов в ИФА полностью совпадали с результатами использованного “золотого стандарта” - РДП (таблица 1).

**Таблица 1.** Сравнительный анализ иммунореактивности сывороток коров в РДП и ИФА на основе рекомбинантного антигена gp51

Образец	Количество исследованных проб	РДП	ИФА Количество проб / Средний оптический показатель реакции, N=3	Совпадение
Сыворотки от больных животных	107	107	107 / 0,401±0,031	100%
Сыворотки от здоровых животных	35	0	0 / 0,110±0,029	100%

Полученные нами результаты аналогичны результатам ряда авторов, проводивших сравнение специфичности и чувствительности иммуноферментного анализа и реакции иммунодиффузии с использованием очищенного антигена gp51 [35, 36, 37, 38].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка технологичных и недорогих способов получения антигенов возбудителей инфекционных болезней исключительно важна для производства диагностических тест-систем. Антигены для диагностики лейкоза КРС произведены в культурах клеток FLK или в системе рекомбинантный бакуловирус – клетки насекомых. Продукция рекомбинантного gp51 в бактериальных системах экспрессии обладает рядом технологических преимуществ, в частности, в части простоты очистки продукта.

В данном исследовании был получен рекомбинантный негликозилированный антиген gp51, который был наработан в клетках *E. coli*, и определены диагностические характеристики продукта экспрессии. Создана генетическая конструкция pET32/gp51 и получен штамм-продуцент BL21pET32/gp51, который производит рекомбинантные белки с молекулярными массами 22 кДа и 45 кДа. Разработан метод иммуноферментного анализа с использованием полученного антигена. При исследовании лабораторной панели из 107 проб сывороток от больных животных и 35 проб от здоровых животных продемонстрировано полное совпадение результатов ИФА и РДП.

Полученные результаты демонстрируют возможность использования рекомбинантного негликозилированного антигена gp51 в серологической диагностике лейкоза крупного рогатого скота.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Coulston J., Naif H., Brandon R., Kumar S., Khan S., Daniel R.C., Lavin M.F. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates // *Journal of General Virology*. – 1990. – Vol. 71. – P.1737-1746.
2. BurrIDGE M.J., PuhR D.M., Hennemann J.M. Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida // *Journal American Veterinary Medicine Associate*. – 1981. – Vol. 179. – P.704-707.
3. Zhao X., Buehring G. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape // *Virology*. – 2007. – Vol. 366. – P.150–165.
4. 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. - P. 503-508.
5. 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. – P. 1.
6. Bicka L., Kuzmak J., Kozaczynska B., Plucienniczak A., Skorupska A. Expression of bovine leukemia virus protein p24 in *Escherichia coli* and its use in the immunoblotting assay // *Acta Biochimica Polonica*. – 2001. – Vol. 48. - P. 227-232.
7. Верковский О.А. Лабораторная диагностика инфекционных болезней крупного рогатого скота с использованием иммуноферментного анализа (лейкоз, ящур, бруцеллез) // *Ветеринария Кубани*. – 2007. – №2.
8. 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 // *Proceeding National Academy Science USA*. – 1985. – Vol. 82. - P. 677-681.

9. Miller J.M., Schmerr M.J., Van Der Maaten M.J. Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus // *American Journal Veterinary Research*. – 1981. – Vol. 42(1). – P. 5-8.
10. Gutierrez G., Alvarez I., Fondevila N., Politzki R., Lomomaco M., Rodriguez S., Dus Santos M.J., Trono Veterinary K. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA // *Veterinary Microbiology*. – 2009. – Vol. 137. – P. 224–234.
11. Juliarena M.A., Poli M., Ceriani C., Sala L., Rodriguez E., Gutierrez S., Dolcini G., Odeon A., Esteban E.N. Antibody response against three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen DRB3.2 alleles associated with bovine leukemia virus resistance // *Journal Dairy Science*. – 2009. – Vol. 92(1). – P. 375-81.
12. Meas S., Ohashi K., Turn S., Chhin M., Te K., Miura K., Sugimoto C., Onuma M. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia // *The Journal of Veterinary Medical Science*. – 2000. – Vol. 62, №7. – P. 779-781.
13. Meas S., Ruas F.J., Usui T., Teraoka Y., Mulenga A., Chang K.S., Masuda A., Madruga C.R., Ohashi K., Onuma M. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle // *Japanese Journal of Veterinary Research*. – 2002 – Vol. 50, №1. – P. 9-16.
14. Bruck C., Portetelle D., Mammerickx M., Mathot M., Burny A. Epitopes of BLV glycoprotein gp51 recognized by sera of infected cattle and sheep // *Leukemia Research*. – 1984. – Vol. 8. – P. 315.
15. Simard C., Richardson S., Dixon P., Belanger C., Maxwell P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency // *The Canadian Journal of Veterinary Research*. – 2000. – Vol. 64. – P.101-106.
16. Molloy J.B., Walker P.J., Baldock F.C., Rodwell B.J., Cowley J.A. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine leukaemia virus p24 antibody in cattle // *Journal of Virology Methods*. – 1990. – Vol. 28. – P. 47-57.
17. Siakkou H., Ulrich R., Uelze A., Mohring R., Rosenthal S. Immunological characterization of BLV proteins synthesized in *Escherichia coli* // *Acta Virologica*. – 1990. – Vol.34. – P. 256–262.
18. 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* // *Archiv fur Experimentelle Veterinar Medizin Leipzig*. – 1990. – Vol. 44. – P. 909–916.
19. 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.
20. 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 Research*. – 1990. – Vol.17. – P.131–142.
21. 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. – P.194–200.
22. 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.
23. 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.
24. 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 // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 2004. – Vol.11. – P.147–151.
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 // *Veterinary Microbiology*. – 2001. – Vol.79. – P. 111-121.
26. Soutullo A., Garcia 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 // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 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 // *The EMBO Journal*. – 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 // *The Journal of Cell Biology*. – 1995. – Vol.130. – P. 1189-1196.
29. Sioud M., Forre O., Dybwad A. Selection of legends for polyclonal antibodies from random peptide libraries: potential identification of (auto) antigens that may trigger B and T cell responses in autoimmune diseases // *Clinical Immunology and Immunopathology*. – 1996. – Vol.79. – P.105-114.
30. dos Santos E.M., Cardoso R., Filho L.R. G., Heinemann M.B., Leite R.C. Pimenta dos Reis J.K.. 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. Merza M., Sundquist B., Sober 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 // *Journal of Virology Methods*. – 1991. – Vol.33. – P. 345–353.

32. Voneche V., Portetelle D., Kettmann R., Willems L., Limbach K., Paoletti E., Ruyschaert J.M., Burny A., Bresseur 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 // *Proceeding National Academy Science USA*. – 1992. – Vol.89. – P. 3810–3814.

33. 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 // *Journal of General Virology*. – 1990. – Vol. 71. – P. 2641–2648.

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

35. Klintevall K., Naslund K., Svedlund G., Hajdu L., Linde N., Klingeborn B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum // *Journal of Virology Methods*. – 1991. – Vol. 33. – P. 319–333.

36. Graves D.C., McQuade M., Weibel K. Comparison of the enzymelinked immunosorbent assay with an early polykaryocytosis inhibition assay and the agar-gel immunodiffusion test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus // *American Journal of Veterinary Research*. – 1982. – Vol. 43. – P. 960–966.

37. Todd D., Adair B.M. An enzyme-linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukaemia virus antibodies // *Veterinary Record*. – 1980. – Vol.107. – P. 124–126.

38. Ressayng A.A., Gielkens A.L.J., Quak J., Mastenbroek M.N. Studies on bovine leukosis VII. Further experience with an ELISA for the detection of antibodies to bovine leukemia virus // *Veterinary Quarterly*. – 1981. – Vol.3. – P. 31–33.

## ТҮЙІН

Серологиялық диагностика ірі қара малдың лейкоз ауруының таралуын болдырмаудың маңызды аспекті болып табылады. Иммуноферменттік талдау және диффузды приципитация реакциясы аурудың алдын алу және жою бағдарламасында негізгі диагностикалық әдістер болып табылады.

Диагностикалық мақсатта дәстүрлі антиген ретінде FLK жасуша культурасынан бөлінген вирус пайдаланылады. Ірі қара малдың лейкоз вирусының табиғи белоктарын пайдаланып жасалған тест-жүйелер төмен мамандандырылған және жақын туыстас вирустардың антиденелерімен әсерлесуі мүмкін (айқас реакция). Осындай төмен сезімталдықтың негізгі себебі жасушалар культурасының әр түрлі вирустармен жұғымдалуына байланысты. Бұл мәселені шешу үшін бакуловирус - жасуша жүйесінде рекомбинантты gp51 антигенін алу әдісі шығарылған, бірақ бұл технология бар мәселені толық шеше алмайды. Өйткені қымбат қоректік орталар қолданылады және тазарту кезінде оның компоненттері толық жойылмайды. Сонымен қатар жасушалар басқа вирустармен жұғымдалуы мүмкін. Генетикалық трансформацияланған өндіруші-штамдар қолдану негізіндегі технология дәстүрлі әдістерге қарағанда ірі қара малдың лейкоз вирусының рекомбинантты ликопротеин 51 жоғары тазартылған тұрақты препаратын алуға мүмкіндік береді. Осыған байланысты жұмыстың мақсаты ішек таяқшасымен секрецияланатын рекомбинантты gp51 антигенін алу және оның диагностикалық қасиеттерін зерттеу болып табылады.

Жұмыста гендік-инженериялық, иммунологиялық, биохимиялық, серологиялық және биотехнологиялық зерттеу әдістері қолданылды.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде gp51 антигенінің 858 жұп негізден тұратын нуклеотидтік тізбегінің дизайны және синтезі жүргізілді. Алынған ген негізінде pET32/gp51 экспрессиялық векторы жасалынды. Gp51 антигенін өндіретін *E.coli*-дың BL21pET32/gp51 штаммы алынды. Көзделген өнімнің түсімін ұлғайту үшін өндіруші штамды өсірудің көрсеткіштері таңдалынып алынды. Жануарлар сарысуын тура емес иммуноферменттік талдау (алынған антиген негізіндегі) нәтижесі мен диффузды приципитация реакция нәтижесі толығымен сәйкес келді.

**Кілттік сөздер:** вирус, лейкоз, gp51, рекомбинантты антиген, иммуноферменттік талдау, диффузды приципитациялы реакция.

## SUMMARY

An important problem for prevention of the bovine leukemia is an effective serological diagnostics. The main methods of serologic diagnostics utilized in the programs for the prevention and eradication of the disease are the immune diffusion reaction and enzyme-linked immunosorbent assay.

For diagnostic test kits used in the detection of bovine leukemia in cattle traditional antigen is an inactivated virus grown in the FLK cell cultures. This antigen often demonstrates cross-reactivity with antibodies to other animal viruses. One considered reason for the decrease in specificity is possible coinfection of the FLK cell cultures

with virural contaminants present in the calf serum used in the culture medium. To increase the specificity of diagnostic tests a method of producing a recombinant antigen gp51 was developed using baculovirus expression system. However, this technology does not completely solve the existing problems, since it involves the use of expensive culture media and does not eliminate complex product purification. Methods of genetic engineering have already provided a variety of recombinant antigens for the use in diagnosis of veterinary infections. Recombinant DNA technology allows to obtain highly purified stable formulations of recombinant glycoprotein gp51 of the bovine leukemia virus.

The aim of this work is to develop a bacterial expression system for the gp51 protein of the bovine leukemia virus and to study the gp51 diagnostic properties in ELISA.

We designed a synthetic gp51 gene and synthesized its nucleotide sequence, 858 bp in length. The resulting gene was cloned into the construct for the recombinant protein expression pET32/gp51. The E.coli strain BL21(DE3) was transformed with the pET32/gp51 and the method for purification of the gp51 antigen was developed. Culture conditions and induction parameters have been optimized to increase the yield of the recombinant gp51. A method of ELISA was developed using the recombinant gp51. The ELISA results were fully congruent to the results of the routinely used diagnostic test for bovine leukosis – immune diffusion precipitation reaction (RDP).

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