

УДК 619:616.98:578:577.2

## КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ, ВЫЯВЛЯЮЩИХ ВИРУС АРТРИТА-ЭНЦЕФАЛИТА КОЗ

*Е.И. Барышникова, С.Ж. Цыбанов, А.С. Казакова,  
А.С. Малоголовкин*  
*E.I. Baryshnikova, S.G. Tsybanov, A.S. Kazakova,  
A.S. Malogolovkin*

*ГНУ всероссийский научно-исследовательский институт  
ветеринарной вирусологии и микробиологии  
The SRI National Research Institute for Veterinary  
Virology and Microbiology of Russia*

*This article describes the research of recombinant plasmid with Caprine arthritis encephalitis virus gag-gene part insertion. This construction might be used as positive control PCR diagnostic system. The specificity of recombinant plasmid in PCR and Real Time PCR was checked.*

Артрит-энцефалит коз (АЭК) – симптомокомплекс, характеризующийся развитием демиелизирующего энцефалита, прогрессирующего артрита и интестинальной пневмонии. Болезнь широко известна во Франции. Чаще вирус встречается в районах интенсивного козоводства – Европе, Австралии, США. Поэтому основной задачей для ветеринарной службы РФ является предупреждение импорта зараженного вируса АЭК скота. В настоящее время широко распространен прямой способ выявления генома вируса на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Одним из компонентов ПЦР тест-системы должен быть положительный контроль ПЦР (ПК), который является индикатором условий проведения реакции. Основными требованиями, предъявляемыми к ПК, являются специфичность, легкая воспроизводимость (накопление) и длительный срок его хранения. В настоящее время имеет место использование плазмидного вектора, в который встроены ПЦР-продукт данного вируса заведомо известного размера.

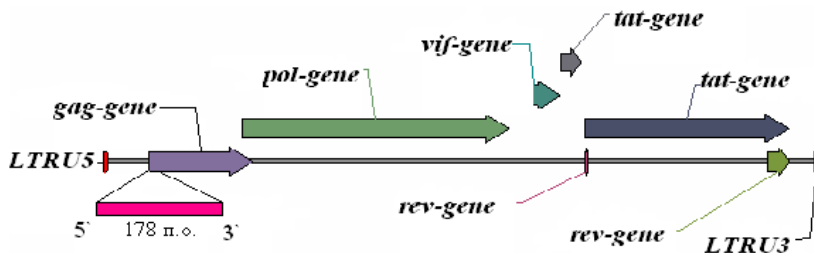
### *Материалы и методы*

В качестве вектора для клонирования была выбрана плаزمида pTZ57R, референс-штамм вируса АЭК (Европейский) (кат. № 75- G63). В качестве носителя экспрессирующей конструкции выбраны компетентные клетки авирулентных штаммов *E.coli* –XL-1 (Promega). При работе использовали общепринятые методы выделения нуклеиновых кислот и постановки молекулярно-биологических реакций (полимеразной цепной реакции (ПЦР), обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), рестрикции, лигирования [2] с применением ферментов фирмы Promega и Fermentas (GoTaq® Polymerase, AMV Reverse Transcriptase, T4 DNA Ligase), набор реактивов для проведения Real Time ПЦР в присутствии интеркалирующего красителя SYBR GreenI.

### *Результаты*

Подбор праймеров был осуществлен на основе анализа опубликованных

в GenBank первичных последовательностей геномов изолятов возбудителя АЭК с использованием прикладных программ BioEdit 6.0 и Oligo 6. Праймеры были подобраны на область начала *gag*-гена, т.к. она является консервативной и позволяет производить дифференциацию от близкородственных вирусов (рис.1). Для исключения возможности гибридизации рассчитанных праймеров с геномами других организмов, они были проверены при помощи программы BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), что позволило выявить комплементарность рассчитанных праймеров с геномами только возбудителя АЭК.



**Рис 1.** Схема генома АЭК с указанием расположения рассчитанных праймеров

Примечание:

1. Стрелками указаны участки расположения генов вируса АЭК
2. LTR U5, LTR U3 – длинные концевые повторы 3' и 5'-концы

Проводили однорандную ПЦР с предварительной ОТ-ПЦР. Комплементарную ДНК (кДНК) получали в результате предварительного отжига праймеров при 72°C в течение 5 мин и последующего синтеза кДНК при 42°C в течение 30 мин. Затем проводили ПЦР при следующих температурных режимах: денатурация при 95°C-3 мин 10с x 1 цикл; 95°C-20с, отжиг - 56°C-15с, элонгация - 72°C-23с x 40 циклов [3]. В результате реакции получили ПЦР-продукт размером 178 пар оснований (п.о.).

Для клонирования провели очистку ПЦР-продукта от агарозного геля с помощью экстракции смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:25:1) и преципитации этанолом. Осаждённую ДНК растворили в деионизованной воде

Лигирование проводилось по Т-концам в области мультиклонировочного сайта плазмиды pTZ57/R/T с использованием 5 ед. акт. Т4 ДНК-лигазы при 14°C в течение 2 часов.

Затем проводили трансформацию в компетентных клетках XL-1. В результате было получено 58 клонов белого цвета, среднего размера ( $\approx 0,7-0,8$  мм). Для дальнейшего скрининга отобрали пять колоний клеток E.coli, содержащих рекомбинантную плазмиду. Клоны выращивали в среде 1×SOB, содержащей ампицилин, при 37°C в течение 18 часов. Плазмидную ДНК (pDNA) выделяли методом экстракции смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:25:1) и последующей преципитацией этанолом.

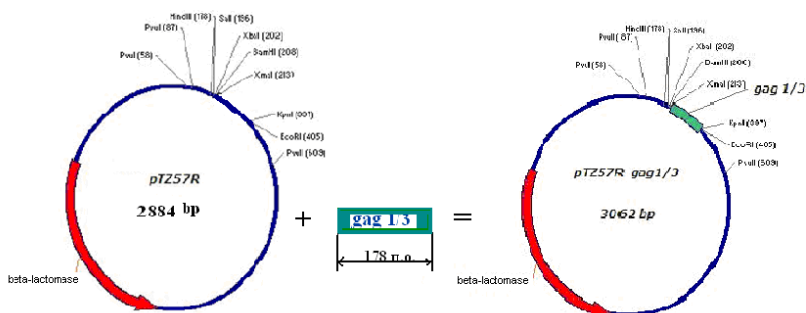


Рис 2. Схематичное изображение исходной плазмиды и рекомбинантной плазмиды, полученной в ходе молекулярнобиологических манипуляций

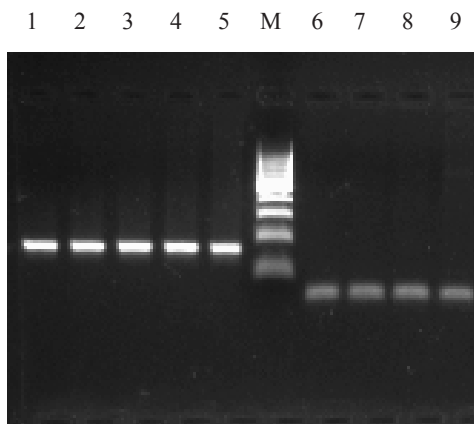


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных из ДНК, выделенной из клеточных клонов *E. coli*.

- Трек 1 – клон *E. coli* pTZ57R/gag1/3 разведение 1:10 (0,2  $\mu$ l на реакцию);
- Трек 2 – клон *E. coli* pTZ57R/gag1/3 разведение 1:10 (0,5  $\mu$ l на реакцию);
- Трек 3 – клон *E. coli* pTZ57R/gag1/3 разведение 1:10 (1  $\mu$ l на реакцию);
- Трек 4 – клон *E. coli* pTZ57R/gag1/3 разведение 1:100 (0,2  $\mu$ l на реакцию);
- Трек 5 – клон *E. coli* pTZ57R/gag1/3 разведение 1:100 (0,5  $\mu$ l на реакцию);
- Трек 6 – клон *E. coli* pTZ57R/gag1/3 разведение 1:1000 (0,5  $\mu$ l на реакцию);

Трек 7 – исходная плаزمида pTZ57R не несущая ДНК-встройки  
Трек 8 – исходная плазмидная ДНК не несущая ДНК-встройки  
Трек 9 – отрицательный контроль ПЦР  
М – маркер молекулярного веса 100 п.о.

Анализировали возможность использования выделенной плазмидной ДНК для ПЦР в качестве положительного контроля с диагностическими праймерами к **gag-гену вируса АЭК**. В качестве матрицы использовали необработанную рестриктазами плазмидную ДНК. При оптимизации реакции наилучшие результаты были получены при нагревании рDNA до 98°C в течение 5 мин. с последующим быстрым охлаждением проб при помещении их в лед или замороженный песок перед постановкой ПЦР.

Для подбора оптимальной концентрации матрицы для ПЦР были приготовлены разведения 1:10, 1:100, 1:1000. Результаты представлены на рис.3.

Для изучения эффективности использования полученную рекомбинантную плазмиду анализировали в **Real Time ПЦР в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I**. Путем варьирования количества праймеров (0,5-1,5 µl), матрицы 1:1000 (0,2-1 µl), dNTP (2-3 µl), MgCl<sub>2</sub> (2-3 µl) были подобраны оптимальные соотношения компонентов реакционной смеси: матрица 1:1000 – 0,5 µl, праймеры 1,5 µl концентрацией 10 p.m., MgCl<sub>2</sub> – 2,5 µl, dNTP – 2,5 µl. Реакцию проводили на приборе Rotor Gene 6000 (Corbette Research).

**Выводы.**

В результате исследований нами была получена рекомбинантная плаزمид, несущая вставку **gag-гена** вируса АЭК размером 178 п.о. Специфичность рекомбинантной плазмиды проверена в ПЦР и **Real Time ПЦР**. **Полученная конструкция** может быть использована в качестве ПК в тест-системе для выявления вируса АЭК методом ПЦР и Real Time ПЦР.

**Литература:**

1. Инфекционная патология животных: В 2т./ под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина.-М.: ИКЦ «Академкнига», Т.1.-2006.-191с.
2. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фриг, Дж. Сэмбрук // М.: Мир. – 1984.- 480 с.
3. Методические рекомендации по выявлению РНК вируса артрита-энцефалита коз методом полимеразной цепной реакции/РАСХН; ГНУ ВНИИВ-ВиМ. – Покров, 2006.-13с.