

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА p30 ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ.

*А.С. Казакова, Н.Н. Власова, О.В. Капустина, О.М. Стрижакова*  
*A.S. Kazakova, N.N. Vlasova, O.V. Kapustina, O.M. Strizhakova*

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

*The article is dedicated to plasmid constructing for receiving recombinant protein p30 of African swine fever virus. Specificity of protein was confirmed in serological tests. Recombinant p30 is destined for using in diagnostic test-systems for analyses of porcine serums in indirect solid-phase enzyme immunoassay mode.*

Африканская чума свиней (АЧС) – вирусная болезнь, характеризующаяся высокой контагиозностью и летальностью, сверхострым, подострым, острым и хроническим течением. В 2000г. возбудитель отнесен к семейству Asfarviridae [2].

В связи с появлением в 2006 году стационарного очага вируса африканской чумы свиней в Грузии и в свете последних, возникших в 2008 году, вспышек АЧС на территории России (в Северной Осетии, Ставропольском крае, Чечне и Ингушетии), становится актуальной проблема создания современных экологически безопасных диагностических наборов, которые отличались бы точностью результатов и сравнительно невысокой себестоимостью. Таковыми могут являться диагностические наборы на основе рекомбинантных антигенов.

В ГНУ ВНИИВВиМ был разработан набор для диагностики вируса АЧС методом ТФ ИФА на основе рекомбинантного белка p30 («Набор диагностических препаратов на основе рекомбинантного антигена вируса африканской чумы свиней для ТФ ИФА», Копытов В.О., 2004).

Целью нашего исследования был анализ эффективности применения рекомбинантного антигена p30 и определения возможности его использования для исследований полевых сывороток животных на наличие специфических антител к вирусу АЧС.

### **Материалы и методы.**

Для экспрессии клетками *E. coli* штамма BL PLYSS, содержащими плазмиду pTT9p30, рекомбинантного белка p30 использовали: среду SOB, pH 7,0-7,2; бактоагар 1,8% на SOB-среде, pH 7,0-7,2; канамицин (25мг/мл); ампициллин (50 мг/мл); 1М MgCl<sub>2</sub>; ТЕ-буфер pH 7,4-7,6; 0,1 М IPTG; 2% X-Gal на DMSO.

Для проведения непрямого ТФ ИФА использовали растворы субстрата 2,2'-азино-ди [3-этилбензотиазолин-(6)-сульфоновая кислота] (ABTS); сенсibiliзирующий буфер (ЗФР) (забуференный 0,9%-ный раствор NaCl; pH 7,0-7,2); фосфатный буфер (ФБР) pH 7,3-7,6; отмывочный раствор – фосфатно-буферный раствор с твином-20 (ФБР-Т) pH 7,2-7,4; ФБР-Т-казеиновый блокирующий буфер pH 7,2-7,4; цитратный буфер (ЦБ), pH 4,4. В качестве антивидового конъю-

гата использовали пероксидазный конъюгат протеина А в рабочем разведении. Для блокирования неспецифических антител к *E.coli* в раствор для разведения сывороток и конъюгата вносили 0,1% лизата клеток *E.coli* штамма BL PLYSS.

В работе использовали инактивированные специфические сыворотки свиней к **I, II, III, IV серотипу вируса АЧС, полученные из коллекции лаборатории «Музейных штаммов» ГНУ ВНИИВВиМ**; нормальную сыворотку; специфические полевые гетерологичные сыворотки к вирусам КЧС, Тешена, Ауески и ТГС.

Для проведения реакции в качестве отрицательных контрольных антигенов использовали лизат клеток *E.coli* BL PLYSS без рекомбинантной плазмиды; лизат клеток интактной перевиваемой линии CV-1. Специфические антигены: инактивированный культуральный вирусный антиген АЧС, полученный в ГНУ ВНИИВВиМ – оптимальная доза сенсibilизации на ЗФР с рН 7,0-7,2 1:200, рекомбинантный белок р30, аффинно очищенный на целлюлозном сорбенте.

В работе использовали общепринятые методы культивирования клеток, вирусов и бактерий, выделения нуклеиновых кислот, работы с лабораторными животными, а также ряд молекулярно-биологических методов (ПЦР, клонирование в прокариотическом векторе) [3].

#### **Результаты и обсуждение.**

Для получения рекомбинантного белка р30 нами были трансформированы рекомбинантной плазмидной ДНК рТТ9р30, полученной Копытовым В.О. в 2004 г, клетки *E. coli* штамма BL PLYSS. Выбор штамма *E.coli* основан на свойстве данных клеток экспрессировать, в основном, белки, кодируемые рекомбинантной плазмидой.

В результате трансформации было получено более 100 рекомбинантных клонов, по уровню накопления плазмиды в которых два из них были отобраны для дальнейшего анализа.

Для определения наличия экспрессии гибридных белков клетки *E.coli* клонов 1 и 2, содержащие рекомбинантную плазмиду рТТ9р30, высевали в 5 мл 1xSOB среды с антибиотиками и инкубировали в течение 18 часов при +37°C. Далее ночную культуру вносили в SOB и **выращивали при комнатной температуре** на шуттель-аппарате (400 об/мин) в течение 3-4 часов. Затем в пробирки с жидкой средой добавляли 0,1M IPTG и культивировали не менее 2 часов при комнатной температуре для индукции промотора.

Для приготовления лизата пробы центрифугировали в течение 10 мин. при 3000 об/мин, надосадов удаляли, а клетки *E.coli* трижды замораживали и оттаивали, после чего ресуспендировали в 1xTE-буфере, клетки обрабатывали ультразвуком 3-4 раза по 15 секунд с паузой 40-60 секунд [1]. Клеточный детрит удаляли центрифугированием в течение 10 мин при 6000 об/мин.. Надосадов лизата трансформированных клеток *E.coli* использовали в качестве твердой фазы при постановке непрямого ТФ ИФА. В результате проведенных исследований было установлено, что оба бактериальных клона дают экспрессию рекомбинантного антигена р30 вируса АЧС.

Очистку рекомбинантного белка р30 проводили методом аффинной хроматографии на целлюлозном сорбенте.

При подборе основных параметров сенсibilизации было установлено, что оптимальными условиями для адсорбции рекомбинантного антигена являются – сенсibilизация на забуференном физиологическом растворе с рН 7,0-7,2

в течение 2 часов при температуре +37°C или в течение 15 часов при +4°C.

Для очищенного рекомбинантного белка определяли дозу сенсibilизации методом шахматного титрования с положительной к вирусу АЧС сывороткой и контрольной нормальной сывороткой свиньи. Установили, что доза сенсibilизации рекомбинантного антигена должна быть не ниже 100нг на лунку.

**Таблица 1. Изучение чувствительности и специфичности непрямого ТФ ИФА с использованием различных антигенов.**

n=3

№ п/п	Наименование сыворотки	Хар-ка сыворотки	Антиген*					
			Нормальный, КК CV-1	Лизат E.coli	Специфический АЧС/КК CV-1	Рек-АЧС р30/очищ.	Рек-АЧС р30/лизат кл.1	Рек-АЧС р30/лизат кл.2
1	сыворотка свиньи к вирусу АЧС II серотипа	титр антител в РЗГАд 1:320	0	0	1:16000**	1:32000	1:16000	1:8000
2	сыворотка свиньи к вирусу АЧС III серотипа	титр антител в РЗГАд 1:640	0	0	1:8000	1:16000	1:8000	1:4000
3	сыворотка свиньи к вирусу АЧС III серотипа	титр антител в РЗГАд 1:320	0	0	1:400	1:800	1:800	1:400
4	сыворотка свиньи к вирусу АЧС IV серотипа	титр антител РЗГАд 1:40	0	0	1:400	1:800	1:800	1:400
5	полевая сыворотка свиньи к вирусу болезни Тешена	титр антител в РН 1:32	0	0	0	0	0	0
6	специфическая сыворотка к ТГС	титр антител в РН 1:128	0	0	0	0	0	0
7	полевая сыворотка свиньи к вирусу КЧС	титр антител в РН -1:16	0	0	0	0	0	0
8	полевая сыворотка свиньи к вирусу болезни Ауески	титр антител в РН 1:4	0	0	0	0	0	0

9	отрицательная контрольная сыворотка	-	0	0	0	0	0	0
---	-------------------------------------	---	---	---	---	---	---	---

Примечание:

\* - при определении титра антител сывороток антигены использовались в рабочем разведении;

\*\* - приведены титры сывороток.

Из приведенных в таблице данных следует, что использование рекомбинантного белка р30, очищенного методом аффинной хроматографии, позволяет выявлять в непрямом ТФ ИФА специфические антитела к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней. Результаты сопоставимы с таковыми, полученными при постановке непрямого ТФ ИФА с использованием культурального антигена.

Титры антител к вирусу АЧС в полученных сыворотках крови свиней в непрямом ТФ ИФА с использованием в качестве специфического антигена лизата клеток *E.coli*, экспрессирующих рекомбинантный р30, и культуральный антиген составили в обоих случаях 1:400-1:16000.

### Заключение.

Установлено, что рекомбинантный белок р30 в форме хроматографически очищенного белка или лизата пригоден для анализа специфических к вирусу АЧС сывороток. Полученные клоны-продуценты рекомбинантного р30 могут использоваться как источники антигена для выявления специфических антител к вирусу АЧС в непрямом ТФ ИФА.

### Литература:

1. Копытов В.О., Колобова О.С., Анохина Е.Г. Экспрессия гена, кодирующего мажорный белок р30 вируса африканской чумы свиней в клетках *E.coli* // Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных: Материалы Международной научной конференции молодых ученых, 24-26 марта 2004 года/ ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ ВНИИЗЖ). – Владимир, 2004. – с.105-107.

2. Dixon L.K., Costa J.V., Escribano J.M., Rock D.L., Vinuela E., Wilkinson P.J. (2000). Family Asfarviridae, In: Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carestens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B.F.A., Murphy C.M., Fauquet D.H.L., Bishop S.A., Ghabrial A.W., Jarvis G.P., Martelli M.D. (eds). Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Summers Academic Press, San Diego, P. 159-165.

3. Maniatis T., Fritsch E.F., and Sambrooks S. 'Molecular Cloning. A laboratory Manual', Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.2006.