

3. Ежкова, А.М. Коррекция содержания солей тяжелых металлов бентонитами в системе «почва-растение-животное-животноводческая продукция» в регионах различной степени техногенной нагрузки / А.М. Ежкова, А.Х. Яппаров, И.А. Яппаров, В.О. Ежков. Казань: Центр инновационных технологий, 2008.-340с.

4. Карта предрасположенности территории к проявлению неблагоприятных ситуаций (природных и техногенных) Республики Татарстан/ Под. ред. Б.Г. Петрова. - Казань, 2002.

5. Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов. - М.: Изд-во стандартов, 1990.-185с.

6. СанПиН 42-123-4089-85 от 31.03.86. ПДК тяжелых металлов в продовольственном сырье и пищевых продуктах.

УДК 619:578.832.1:636.52/58:577.21

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ КОПИЙ КДНК  
ГЕНОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА H5N1  
CONSTRUCTION OF FULL-SIZE CDNA COPIES OF GENES  
OF AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE H5N1

*Елаткин Н.П.<sup>1</sup>, Андрейчук Д.Б.<sup>1</sup>,  
Казакова А.С.<sup>2</sup>, Зиняков Н.Г.<sup>1</sup>, Мудрак Н.С.<sup>1</sup>  
Elatkin N.P.<sup>1</sup>, Andreychuk D.B.<sup>1</sup>, Kasakova A.S.<sup>2</sup>, Zynjalov N.G.<sup>1</sup>, Mudrak N.S.  
<sup>1</sup>-ФГУ Федеральный Центр Охраны Животных, г. Владимир  
<sup>2</sup>-Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии  
<sup>1</sup>-FGI Federal Center for Animal Health (FGI "ARRIAH")  
<sup>2</sup>-The National Institute for Veterinary Virology and Microbiology of Russia*

*Four full-size cDNA copies of genes encoding immunogenic proteins of avian influenza virus, namely hemagglutinin gene, nucleoprotein gene, and matrix protein genes 1 and 2 were obtained using a RT PCR. The produced cDNAs could be used for constructing recombinant vaccines against avian influenza.*

Грипп – острое контагиозное заболевание млекопитающих, птиц и человека, вызываемое вирусами из семейства Orthomyxoviridae. Высокопатогенный грипп птиц (ВПП) – крайне контагиозная, пантропная системная болезнь с высокой смертностью (до 100%), которая вызывается подтипами H5 и H7 вируса гриппа А, поражает домашнюю, дикую, синантропную птицу и наносит огромный ущерб птицеводству во всём мире, а также опасна для человека.

Важной задачей в борьбе с гриппом птиц является разработка высокоэффективных, безопасных, недорогих и технологичных вакцин. Перспективными вакцинами для борьбы с инфекционными заболеваниями в данное время являются генно-инженерные вакцины [3]. Принцип создания таких вакцин состоит в клонировании генов иммуногенных белков вируса гриппа птиц в различных векторах, для их последующей экспрессии. Поэтому важным этапом создания рекомбинантных вакцин является получение полноразмерных

копий генов, кодирующих иммунодоминантные белки вируса гриппа птиц. Иммуногенными белками, формирующими протективный иммунитет, являются гемагглютинин, нейраминидаза, нуклеопротеин, а также матриксные белки [5].

Целью работы было получение полноразмерных копий кДНК генов, кодирующих гемагглютинин, нуклеопротеин, матриксный белок 1 и 2 вируса гриппа птиц подтипа H5N1, методом полимеразной цепной реакции сопряжённой с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

#### Материалы и методы

В работе использован штам высокопатогенного гриппа птиц (ВППП) A/duck/Novosibirsk/02/2005 (H5N1). Выделение РНК ВПП проводилось с использованием набора для выделения РНК RNeasy Mini Kit («QIAGEN», Германия) согласно методике производителя. Для постановки обратной транскрипции (ОТ) использовали AMV-ревертазу («Promega», США) и генно-инженерную M-MLV- ревертазу SuperScript III Reverse Transcriptase (“Invitrogen”, США), гексамерные случайные праймеры («Fermentas», Литва), для постановки ПЦР Pfu-полимеразу («Fermentas», Литва) и Taq-полимеразу («Promega», США). Для этапа лигирования кДНК после реверсии использовали T4 DNA лигазу («Fermentas», Литва). Реакции проводили в амплификаторе BioRad PTC-220 («BioRad», США). Визуализирование ПЦР ампликонов проводили методом электрофореза в 2 % процентном агарозном геле с добавлением бромистого этидия [2]. Первичная нуклеотидная последовательность кДНК генов нуклеопротеина и матриксных белков было определена с использованием автоматического амплификатора AbbiPrism 7500 (“AppliedBiosystems”, США). Расчет праймеров для наработки кДНК генов производили с использованием программы OLIGO 6.2 исходя из первичных последовательностей генов, опубликованных в базе данных GeneBank.

#### Результаты и обсуждение

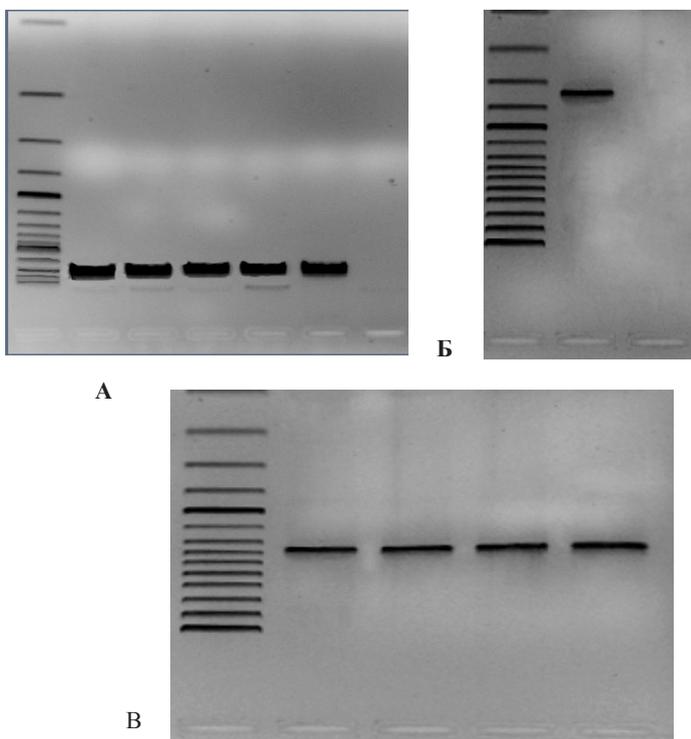
При выборе праймеров учитывалось минимальное содержание самокомплементарных регионов в последовательности праймера, которые могут приводить к образованию шпилек и димерных структур, за исключением праймеров на гемагглютинин, в структуру которых включены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции BamHI и PaeI (SphI) для последующего лигирования с плазмидным вектором. Последовательности праймеров, полученные в результате проведённого анализа (табл. 1), содержат старт и стоп кодоны. Размер ПЦР-ампликона, содержащего полноразмерный ген гемагглютинина – 1777 п.о., нуклеопротеина – 1508 п.о., матриксного белка 1 – 750 п.о., матриксного белка 2 – 352 п.о.

Таблица 1

Ген	Длина, п.о.	Праймер	Нуклеотидная последовательность праймера
Гемагглютинин	1777	FHA-1U	5' atccaaagcagggggttaactcg 3'
		RHA-L	5' gcatgcaagggtgtttaactacaatc 3'

Нуклеопротеин	1508	NPF	5' cttaaattgcatactcctctg 3'
		NP R	5' ttgtctccgaagaaataaga 3'
Матриксный белок 1	750	M1F	5' atgagtcttctaaccgaggt 3'
		M1R	5' tcacttgaatcgctgcactctgcac 3'
Матриксный белок 2	352	M2F	5'atgagtcttctaaccgaggtcgaacgcctaccagaaa cgaatggga3'
		M2R	5' ttactccaattctatgttg 3'

Наработка кДНК генов нуклеопротеина и матриксных белков не



**Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР гена нуклеопротеина (А); матриксного белка 2 (Б); матриксного белка 1 (В)**

представила трудности благодаря их небольшому размеру. Использовали ревертазу SuperScript III Reverse Transkriptase, Pfu-полимеразу, температура отжига составила +54 °С, время элонгации для нуклеопротеина, матриксного

белка 1 и матриксного белка 2 - 2 мин, 1 мин 50 сек и 35 сек, соответственно. Секвенирование полученных кДНК показало отсутствие значимых нуклеотидных замен.

Ввиду большого размера амплифицируемого гена гемагглютинаина, параметры ОТ-ПЦР, рекомендуемые производителями ферментов (Fermentas, Promega) оказались малоэффективными. Для увеличения эффективности ОТ-ПЦР и снижения вероятности неспецифического синтеза, необходимо было провести оптимизацию этого процесса.

Для этого сравнивалась эффективность различных ревертаз: AMV-ревертазы («Promega», США) и генно-инженерной M-MLV-ревертазы SuperScript III Reverse Transkriptase («Invitrogen», США); вводился этап лигирования после реверсии с различными параметрами процесса; сравнивалась эффективность ОТ-ПЦР в зависимости от качества компонентов реакционных смесей; изменялись параметры цикла ПЦР; оценивалась эффективность использования в ПЦР Pfu-полимеразы, обладающей большей точностью амплификации, и Taq-полимеразы.

Поскольку необходимо было наработать довольно большой фрагмент кДНК, в реакции обратной транскрипции использовалась смесь прямого специфического праймера и рэндом-праймеров в молярном соотношении 1:1. Оптимизация параметров цикла амплификации проводилась по температурному и временному профилю реакции. Температура плавления прямого и обратного праймеров составила соответственно 62,88 °С и 64,33 °С. Исходя из того, что температура отжига на 1-5°С ниже температуры плавления [4], ПЦР проводили при температуре отжига 59 °С. Время элонгации составило 2 мин. Для снижения частоты ошибок в процессе ПЦР амплификации, решили использовать Pfu-полимеразу («Fermentas», Литва), частота встраивания некомплементарных нуклеотидов у которой  $2,3 \times 10^{-6}$  [1], что значительно ниже, чем у Taq-ДНК-полимеразы. Установлено, что использование в ПЦР Pfu-полимеразы также повышает выход специфического продукта. В процессе оптимизации удалось увеличить выход специфического продукта с 10мкг/мл до 50мкг/мл (в очищенной пробе) и наработать кДНК гена гемагглютинаина в количестве, достаточном для клонирования.

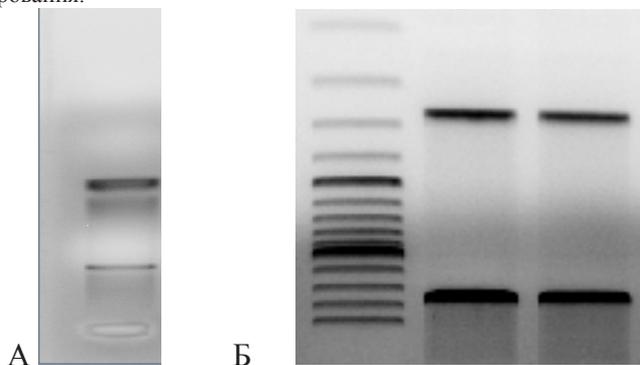


Рис.2.-Электрофореграмма продуктов ПЦР гена гемагглютинаина до

---

**оптимизации (А) и после оптимизации (Б)**

Полученные результаты позволили сделать следующие выводы по оптимизации амплификации кДНК гена НА вируса гриппа птиц: реверсию целесообразно проводить с ревертазой SuperSript III Reverse Transkriptase (“Invitrogen”, США), со свежими фосфатами (не более 1-2 циклов разморозки-заморозки); введение этапа лигирования (оптимальный режим лигирования 37<sup>o</sup>C 1 час) и использование в ПЦР Pfu- полимеразы повышает выход специфического продукта реакции; необходимо использовать только свежие пробы или однократно размораживаемые аликвоты с -20<sup>o</sup>C. Хранение проб при +4<sup>o</sup>C приводит к разрушению длинных сегментов вирусной РНК и, как следствие, к существенному снижению эффективности амплификации специфического фрагмента.

**Заключение**

В ходе работы получены кДНК четырёх генов, кодирующих белки вируса гриппа птиц: гемагглютини́на, нуклеопротеина, матричного белка 1, матричного белка 2, определена их первичная последовательность. Проведена оптимизация получения кДНК крупного фрагмента генома ВГП, кодирующего гемагглютинин. Полученные кДНК могут быть использованы в дальнейшем для генно-инженерных работ по получению рекомбинантной вакцины против ВГП.

**Литература:**

1. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия. Новосибирск, 2004. 496 с.
2. Maniatis T., Fritsch E.F., and Sambrooks S. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor, 2006. 800 p.
3. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. V. 1. 6th ed. Paris, 2008. P. 465 – 481.
4. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro / Rychlik W., Spencer W. J., Rhoads R. E. // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18, № 2. P. 6409 – 6412.
5. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 Mexican avian influenza viruses in chickens / Swayne D. E., Perdue M. L., Garcia M., Rivera-Cruz E., [et al.] // Avian Dis. 1997. V. 41, № 2. P. 335 – 346.

УДК: 619:617.002.3+619:612.1+577.118

**МАКРОЭЛЕМЕНТЫ КРОВИ И ПОКАЗАТЕЛИ  
АЗОТНОГО ОБМЕНА ПРИ ГНОЙНЫХ РАНАХ  
MACRO ELEMENTS OF BLOOD AND PARAMETERS  
OF A NITRIC EXCHANGE AT PURULENT WOUNDS**

*Ермолаев В.А. , Ляшенко П.М., Никулина Е.Н.  
Ermolaev V.A. , Lyashenko P.M. , Nikulina E.N.  
Ульяновская ГСХА  
Ulianovsk state agricultural academy*