

«СИНТЕЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ»

Веретенников В.В.^{1,2}, Тарлавин Н.В.^{1,2}, Джавадов Э.Д.^{1,2} д.в.н., Румянцев
А.М.¹ к.б.н.

- 1- Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»
- 2- Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

Ключевые слова: рекомбинантный белок, вирус инфекционной бурсальной болезни, вакцина, промышленное птицеводство.

Key words: recombinant protein, infectious bursal disease virus, vaccine, industrial poultry production.

АННОТАЦИЯ

Инфекционная бурсальная болезнь (ИББ) является одной из наиболее важных вирусных болезней молодняка промышленных птиц. В структуре вируса инфекционной бурсальной болезни есть четыре основных белка: VP1, VP2, VP3, VP4. Белки VP2 и VP3 содержат основные антигенные области ответственные за индукцию вируснейтрализующих антител защищающих птицу от вируса ИББ. Но доказано, что антитела вырабатываются в ответ не на весь белок VP2, а лишь на его фрагменты. В наших предыдущих исследованиях данные фрагменты и полноразмерный белок VP2 были синтезированы с использованием метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*.

В данном исследовании получены штаммы *E. coli*, которые синтезируют как полноразмерный белок VP2, так и его М-фрагмент. Для получения таких штаммов с помощью метода ПЦР были амплифицированы последовательности гена VP2 и его фрагмента. Были получены содержащие эти последовательности плазмиды pET23a-VP2 и pET23a-MVP2, которыми трансформированы клетки штамма бактерий *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Данные штаммы были выращены на жидкой среде, после чего проводили

индукцию синтеза рекомбинантных белков. С помощью метода денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле, был продемонстрирован синтез в клетках бактерий соответствующих белков размером 48 кДа для полноразмерного белка и 15 кДа для его М-фрагмента.

Таким образом, получены рекомбинантные белки вируса инфекционной бурсальной болезни, которые после проверки их иммуногенных свойств, будут использованы в качестве антигена в вакцинах против данной болезни.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционная бурсальная болезнь - это высококонтагиозная и иммунодепрессивная болезнь цыплят, которая вызывается РНК-содержащим вирусом из семейства *Birnaviridae* [5]. Его геном состоит из двух сегментов (А и В) двухцепочечной РНК, сегмент А кодирует три вирусных белка VP3 (792-1012 aa), VP4 (513-791 aa) и VP2 (1-512 aa), а сегмент В кодирует вирусную полимеразу VP1 [7].

Для получения субъединичных вакцин в ряде исследований белки вируса ИББ были синтезированы с использованием организмов-продуцентов [1,3,4,10]. При этом в большинстве случаев используются белки VP2 и VP3, которые содержат основные антигенные области ответственные за индукцию вируснейтрализующих антител защищающих птицу от вируса ИББ [6]. В ходе подобных исследований было обнаружено, что для обеспечения ответа В- и Т-клеток достаточно отдельных антигенных участков белка VP2 [7]. К таким участкам относится антигенный сайт в С-концевой части VP2 [6], а также два сайта в пределах 145 аминокислотного (aa) фрагмента в центральной области VP2 (М-фрагмент) и N-концевой области (18-139 aa) белка VP2 [1,8].

Для синтеза белков вируса ИББ в отдельных исследованиях используются разные организмы-продуценты. Ранее для продукции секреторного полноразмерного белка VP2 и его центральной области (М-фрагмента) нами были использованы метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*

[3]. В данном исследовании для продукции аналогичных белков использовали клетки бактерий *Escherichia coli*. Дальнейшее сравнение эффективности синтеза белков вируса ИББ с использованием разных организмов-продуцентов, а также их иммуногенности позволит выбрать наиболее эффективную систему для получения субъединичных вакцин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий и условия культивирования. Для наработки плазмид использовали штамм бактерий *Escherichia coli* DH5alpha (генотип: F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1, Thermo Fisher Scientific, США). Для синтеза белков использовали штамм BL21(DE3)pLysS (генотип: F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λ S) pLysS(Cam^R), Евроген, Россия). Для культивирования бактерий использовали среду LB: 1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 170 мМ NaCl, 2.4% агар (если среда твердая). Штаммы *E. coli* рутинно выращивали в термостате при температуре 37°C.

Для индукции синтеза белка в среду добавляли изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в концентрации 100 мМ. Культивирование при этом проводили при 30°C.

Плазмиды. Плазида рPICZ α -VP2 содержит последовательность гена оболочечного гликопротеина VP2 от эпизоотического штамма инфекционной бурсальной болезни «Синявинский», полученного в компании ООО «Кронвет» [1,3]. Для синтеза белков в бактериях *E. coli* использовали плазмиду рЕТ23а (Quiagen, США).

Молекулярные методы. Обработку фрагментов ДНК эндонуклеазами рестрикции AsuNHI (NheI), AspA2I (AvrII), FauNDI (NdeI) и Sfr274I (XhoI), а также дефосфорилирование 5'-концов проводили согласно рекомендациям фирмы производителя ферментов (Сибэнзим, Россия). Лигирование фрагментов ДНК проводили с помощью T4-лигазы (Евроген, Россия).

Для проведения ПЦР использовали набор Tersus Plus PCR (Евроген, Россия) и следующие параметры: 95°C – 3 минуты, а затем 30 циклов: 95°C - 30 с, 53°C - 30 с, 72°C - 90 с. В работе были подобраны и использованы следующие пары праймеров:

1. Для полноразмерной последовательности VP2:

VP2bact-F 5'-АТТАСАССТАGGAСAAACСТGCAAGATCAAACC-3'

VP2bact-R 5'-АТТАСТСТCGAGTGCTCCTGCAATCTTCAGG-3'

2. Для последовательности М-фрагмента:

MVP2bact-F 5'-АТТАСАСАТАТGACTGCAGCCGACGATТА-3'

MVP2bact-R 5'-АТТАСТСТCGAGTAGTGTGACGGGACG-3'

Методы выделения ДНК. Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля и реакционных смесей использовали набор Cleanup Standard (Евроген, Россия). Плазмидную ДНК из бактериальных клеток выделяли с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия).

Методы электрофореза. Разделение фрагментов ДНК проводили при помощи метода электрофореза в 1% агарозном геле в буфере ТАЕ (40 мМ Трис-НСl, 40 мМ уксусной кислоты, 0,5 М этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) рН 8.0).

Для выделения внутриклеточных белков клетки бактерий из 1 мл культуры собирали центрифугированием (3000g, 3 мин.). Отбирали среду и разводили клетки в 300 мкл буфера для лизиса (100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Трис-НСl, 8М мочевины, рН 8.0). В пробы добавляли 0,3 г стеклянных шариков (d=0,5 мм) и перемешивали их на вортексе в течение 10 мин. После центрифугирования (12000g, 10 мин.) отбирали надосадочную жидкость, содержащую белки. Разделение белков проводили при помощи метода денатурирующего электрофореза в 15% полиакриламидном геле согласно методике Остермана Л.А. [2].

Ожидаемые размеры синтезируемых белков рассчитывали с помощью сервера [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе работы были получены плазмиды pET23a-VP2 и pET23a-MVP2, содержащие полноразмерную последовательность гена оболочечного гликопротеина VP2 и использованную нами ранее последовательность М-фрагмента [3].

Полноразмерная последовательность гена VP2 была амплифицирована с помощью метода ПЦР с праймерами VP2bact-F и VP2bact-R. В качестве матрицы использовали плазмиду pPICZ α -VP2. Полученный фрагмент обрабатывали последовательно рестриктазами AspA2I (AvrII) и Sfr274I (XhoI). Плазмиду pET23a обрабатывали рестриктазами AsuNHI (NheI) и Sfr274I (XhoI), а затем проводили дефосфорилирование 5'-концов. После проведения электрофореза полученные фрагменты очищали из агарозного геля и лигировали.

Последовательность, соответствующая М-фрагменту гена VP2, была амплифицирована с помощью метода ПЦР с праймерами MVP2bact-F и MVP2bact-R. В качестве матрицы использовали плазмиду pPICZ α -VP2. Полученный фрагмент обрабатывали последовательно рестриктазами FauNDI (NdeI) и Sfr274I (XhoI). Плазмиду pET23a обрабатывали рестриктазами FauNDI (NdeI) и Sfr274I (XhoI), а затем проводили дефосфорилирование 5'-концов. После проведения электрофореза полученные фрагменты очищали из агарозного геля и лигировали.

Лигазами смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* DH5 α и отбирали трансформантов на среде с ампициллином. Из клеток полученных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и проверяли её с помощью метода ПЦР и рестрикционного анализа.

Таким образом, была получена плазида pET23a-VP2, содержащая полноразмерную последовательность гена VP2, а также плазида pET23a-MVP2 содержащая последовательность его М-фрагмента. Последовательности находятся под контролем промотора полимеразы T7. Поэтому плазидами трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Данный штамм содержит кассету экспрессии,

обеспечивающую регулируемый синтез РНК-полимеразы T7, которая в свою очередь обеспечивает транскрипцию последовательностей гена VP2 и его М-фрагмента в составе плазмид рЕТ23а-VP2 и рЕТ23а-MVP2.

Для анализа синтеза рекомбинантных белков полученных трансформантов культивировали в 20 мл жидкой среды LB с добавлением ампициллина в течение 12 часов. Затем добавляли в среду индуктор ИПТГ и культивировали клетки ещё 12 часов. В контрольные пробы ИПТГ не добавляли. Клетки собирали из 1 мл среды центрифугированием, лизировали и раствор внутриклеточных белков анализировали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 1).

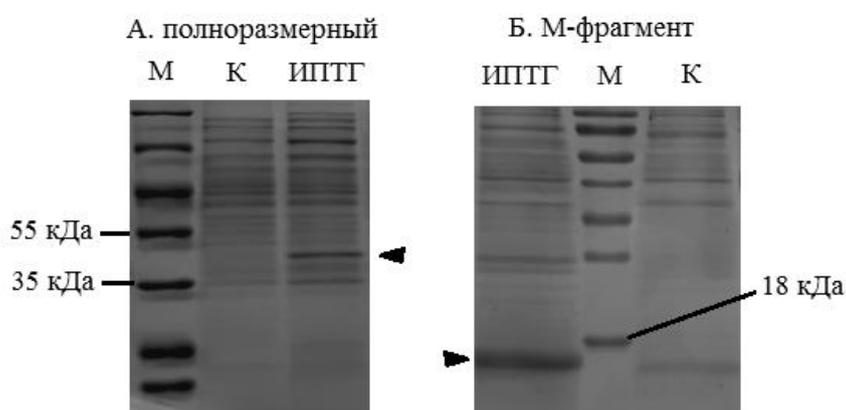


Рисунок 1. Электрофореграммы внутриклеточных белков штаммов бактерий *E. coli*, синтезирующих А. полноразмерный белок VP2 (48 кДа) и Б. М-фрагмент белка VP2 (15 кДа). Дорожки «К» соответствуют контрольным пробам, инкубированным без добавления ИПТГ, индуцирующего синтез белка. Дорожки «ИПТГ» соответствуют пробам, инкубированным с добавлением ИПТГ. Дорожки «М» соответствуют маркерам размеров белков.

Было показано, что полученные в работе на основе штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS бактериальные трансформанты синтезируют рекомбинантные белки ожидаемого размера (48 кДа для полноразмерного белка VP2 и 15 кДа для М-фрагмента).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вирулентные штаммы вируса ИББ вызывают высокую смертность промышленной птицы, а также иммуносупрессию, что приводит к

экономическим потерям. Поэтому вакцинация промышленной птицы против инфекционной бурсальной болезни необходима и является общепринятой практикой в Российской Федерации. Массовое производство живых и инактивированных вакцин против ИББ часто требует больших затрат, так как для размножения вируса при их производстве требуется цыплята и куриные эмбрионы. Следовательно, альтернативные методы производства вакцин с использованием различных систем экспрессии могут иметь положительный эффект как в плане благополучия птицеводческих хозяйств, так и в плане затрат на производство вакцин. В предыдущих наших исследованиях были получены штаммы метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, синтезирующие рекомбинантный белок VP2 вируса ИББ и его фрагменты [1,3].

В данной работе получены плазмиды pET23a-VP2 и pET23a-MVP2, которыми был трансформирован штамм бактерий *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Было показано (рис.1), что полученные трансформанты эффективно синтезируют белки ожидаемого размера, а именно 48 кДа для полноразмерного белка VP2 и 15 кДа для М-фрагмента.

Дальнейшие исследования данных белков на антигенную активность и сравнение их с уже синтезированными белками позволит выбрать наиболее иммуногенный вариант для производства рекомбинантных вакцин против инфекционной бурсальной болезни.

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ № 75428571 «Создание нового поколения вакцинных препаратов для птиц на основе рекомбинантных антигенов и адъювантов – иммуностимуляторов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джавадов Э. Д. Использование рекомбинантного белка VP2 в качестве субъединичной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / Э. Д. Джавадов, А. М. Румянцев, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин //

Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 3. – С. 9-14. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2021.3.9. – EDN СНРМТJ.

2. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.
3. Румянцев А. М. Гетерологичный синтез фрагментов N и M капсидного белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни птиц в дрожжах *Pichia pastoris* / А. М. Румянцев, М. А. Цыганков, В. В. Веретенников [и др.] // Экологическая генетика. – 2022. – Т. 20. – № 1. – С. 49-59. – DOI 10.17816/ecogen83441. – EDN TLTCEC.
4. Azad A.A. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segments of a birnavirus / Azad A.A., Jagdish, M.N., Brown, M.A., Hudson, P.J. // *Virology* 1987 161, 145–152.
5. Etteradossi N. Infectious bursal disease / Etteradossi N, Saif YM // 2013. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V (eds) *Disease of Poultry*, 13th edn. Blackwell Publishing, Ames Iowa, pp 219–246
6. Heine H.G. Sequence analysis and expression of the host protective immunogen VP2 of variant strain of IBDV which can circumvent vaccination with standard type 1 strain / Heine H.G., Haritou, M., Failla, P., Fahey, K., Azad, A.A. // 1991. *J. Gen. Virol.* 72, 1835–1843.
7. Lukert P.D. Infectious bursal disease / Lukert P.D., Saif, Y.M. // 2003, In: Saif, Y.M. (Ed.), *Disease of Poultry.* , 11th ed. Iowa State University, Ames, IA, USA, pp. 161–179.
8. Pradhan SN. Protective immune responses of recombinant VP2 subunit antigen of infectious bursal disease virus in chickens / Pradhan SN, Prince PR, Madhumathi J, Roy P, Narayanan RB, Antony U // *Vet Immunol Immunopathol.* 2012 Aug 15;148(3-4):293-301. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.06.019. Epub 2012 Jun 23. PMID: 22795186.

9. Stothard, P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques* 28: 1102-1104.
10. Wang XM. Highefficiency expression of the major antigen gene VP2 of infectious bursal disease virus in yeast and rudimentary immunization test. / Wang XM, Wang MP, Gao HL, Fu ZY, Zeng XW, Zhang SF // *Sci Agric Sinica* 2003;36:443-7.
11. Wang YS. Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus / Wang YS, Fan HJ, Li Y, Shi ZL, Pan Y, Lu CP. // *Vaccine*. 2007 May 30;25(22):4447-55. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.03.018. Epub 2007 Mar 26. PMID: 17445956.

"RECOMBINANT PROTEIN SYNTHESIS OF INFECTIOUS BURSAL
DISEASE VIRUS IN A BACTERIAL SYSTEM"

SUMMARY

Infectious bursal disease (IBD) is one of the most important viral diseases of young industrial birds. There are four main proteins in the structure of Infectious Bursal Disease virus: VP1, VP2, VP3, VP4. VP2 and VP3 contain the main antigenic regions responsible for the induction of viral neutralizing antibodies protecting poultry against IBD virus. But it is proved that antibodies are not produced in response to the whole VP2 protein, but only to its fragments. In our previous studies, these fragments and the full-length VP2 protein were synthesized using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.

In this study, we obtained strains of *E. coli* that synthesize both the full-length VP2 protein and its M-fragment. To obtain such strains, the sequences of the VP2 gene and its fragment were amplified using PCR. Plasmids pET23a-VP2 and pET23a-MVP2 containing these sequences were obtained and transformed into *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS cells. These strains were grown on liquid medium, followed by induction of recombinant protein synthesis. Using the method of denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel, the synthesis of the

corresponding proteins of 48 kDa for the full-length protein and 15 kDa for its M-fragment was demonstrated in the bacterial cells.

Thus, recombinant proteins of infectious bursal disease virus were obtained, which, after testing their immunogenic properties, will be used as an antigen in vaccines against this disease.

Веретенников Владислав Валерьевич ассистент кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ, младший научный сотрудник ФГБОУ ВО СПбГУ, vlad.veretennikov.96@mail.ru; Тарлавин Николай Владимирович ассистент кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ, младший научный сотрудник ФГБОУ ВО СПбГУ, tarlav1995@bk.ru; Джавадов Эдуард Джавадович доктор ветеринарных наук, профессор кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ, старший научный сотрудник ФГБОУ ВО СПбГУ, vnivip1@mail.ru; Румянцев Андрей Михайлович научный сотрудник кафедры генетики и биотехнологии ФГБОУ ВО СПбГУ, rummyantsev-am@mail.ru