

УДК: 577.212.3 619:616.98

## **Конструювання плазмиди pUC\_gB – компоненту ДНК-вакцини проти вірусної хвороби Марека** **О.С.Солодянкін**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»  
(Харків, Україна)  
alex\_solod@mail.ru*

Метою даної роботи було конструювання плазмиди, здатної експресувати глікопротеїн В вірусу хвороби Марека. Для цього було проведено біоінформатичне моделювання експресуючої плазмиди, яка мала структуру: pUC19 – сайт пізнання BamHI – промоторна ділянка гена  $\gamma$ -інтерферону курки – сайт пізнання Sall – ген глікопротеїну В – сайт пізнання HindIII – pUC19. Були розраховані системи праймерів для ампліфікації промоторної ділянки гена  $\gamma$ -інтерферону курки та гена глікопротеїну В. В результаті була сконструйована плазміда pUC\_gB – компонент ДНК-вакцини проти хвороби Марека. Шляхом секвенування плазмиди показано автентичність нуклеотидних послідовностей протективного антигену глікопротеїну В штаму JM-UA вірусу хвороби Марека та встановлено його ідентичність іншим штамам I серотипу вірусу хвороби Марека.

**Ключові слова:** *вірус хвороби Марека, ДНК-вакцина, глікопротеїн В.*

## **Конструирование плазмиды pUC\_gB – компонента ДНК-вакцины против вирусной болезни Марека** **А.С.Солодянкин**

Целью данной работы было конструирование плазмиды, способной экспрессировать гликопротеин В вируса болезни Марека. Для этого было проведено биоинформатическое моделирование экспрессирующей плазмиды, которая имела структуру: pUC19 – сайт узнавания BamHI – промоторный участок гена  $\gamma$ -интерферона курицы – сайт узнавания Sall – ген гликопротеина В – сайт узнавания HindIII – pUC19. Были рассчитаны системы праймеров для амплификации промоторного участка гена  $\gamma$ -интерферона курицы и гена гликопротеина В. В результате была сконструирована плазмида pUC\_gB – компонент ДНК-вакцины против болезни Марека. Путем проведенного секвенирования плазмиды была показана аутентичность нуклеотидных последовательностей протективного антигена гликопротеина В штамма JM-UA вируса болезни Марека и установлена его идентичность другим штаммам I серотипа вируса болезни Марека.

**Ключевые слова:** *вирус болезни Марека, ДНК-вакцина, гликопротеин В.*

## **Design of the plasmid pUC\_gB – a component of DNA vaccine against Marek's disease virus** **O.S.Solodiankin**

The aim of this work was to obtain the plasmid for expression of glycoprotein B of Marek's disease virus. This investigation included the bioinformatics study of expression plasmid. It has the structure: pUC19 – recognition site of BamHI – promoter region of chicken  $\gamma$ -interferon gene – recognition site of Sall – glycoprotein B gene – recognition site of HindIII – pUC19. The primers for cloning promoter regions of chicken  $\gamma$ -interferon gene and glycoprotein B were designed. As the result the plasmid pUC\_gB was constructed – as a component of DNA vaccine against Marek's disease. It was shown an authenticity of sequences of protective antigen glycoprotein B of Marek's disease virus JM-UA strain by sequencing of the obtained plasmid. The identity to the other strains of serotype I of Marek's disease virus was determined.

**Key words:** *Marek's disease virus, DNA vaccine, glycoprotein B.*

### **Вступ**

ДНК-вакцинація сьогодні займає чільне місце в системі інноваційного розвитку заходів та засобів превентивного спрямування при інфекційних патологіях в медицині та ветеринарії (Вороб'єв і др., 2005).

На сьогоднішній день у якості векторів для генної терапії застосовують реовіруси, аденовіруси, герпесвіруси та невірусні вектори, а саме бактеріальні та дріжджові плазмиди. Незважаючи на високу

трансдукційну ефективність вірусних векторів, вони мають такі недоліки, як високий ризик інсерційного мутагенезу, цитопатичну дію, ймовірну непередбачуваність створеної системи та високу економічну витратність щодо створення і використання в біотехнологічних регламентах (Богданенко и др., 2000; Black, 2003).

Бактеріальні артефактні хромосоми з інтегрованими генами вірусів тварин і людини демонструють стабільну експресію в еукаріотичних клітинах впродовж тривалого періоду (до 150 діб), у залежності від характеру векторного промотору та локалізації трансформованих клітин. При цьому конструкції є біологічно безпечними, оскільки не мають інвазивних властивостей та повністю утилізуються ферментними системами акцептора після закінчення їх фармакобіологічного впливу (Black, 2003).

Враховуючи переваги ДНК-вакцин, на теперішній час започатковані широкомасштабні розробки у напрямку їх створення, випробування та впровадження. Одна із сучасних проблем, яка потребує рішення на рівні вакцин нового покоління – це геноімунізація птиці проти хвороби Марека, одного з найбільш поширених необластичних захворювань птиці (Cui et al., 2009). Вона є альтернативою використанню вірус-вакцини, забезпечуючи надійну імунну відповідь за рахунок отримання популяції лімфоцитів (вони є клітинами-мішенями для вірусу), яка конкурентним типом взаємодії сигналізує про інфекцію та не дає змоги польовому вірусу інфікувати організм птиці.

Серед поверхневих антигенів вірусу хвороби Марека найбільш привабливим з точки зору використання у генно-інженерних конструкціях вважається глікопротеїн В (gB).

Антиген gB являє собою комплекс трьох глікопротеїнів, gr 100, gr 60 та gr 40, що локалізується у цитоплазмі та в мембрані інфікованих клітин. Цей антиген індукує секрецію основної маси специфічних антитіл, що забезпечує гуморальну імунну відповідь при хворобі Марека (Niikura et al., 1992).

Враховуючи все це, у представленій роботі була визначена для вирішення задача конструювання плазмідного вектора, що здатний експресувати глікопротеїн В вірусу хвороби Марека у клітинах птиці.

### Матеріали та методи

Множинне вирівнювання послідовностей та біоінформатичний аналіз нуклеїнових кислот проводили із застосуванням програми BioEdit version 7.0.0. Для розрахунків векторної конструкції були використані нуклеотидна послідовність  $\gamma$ -інтерферону курки, описана P.Kaiser et al., та нуклеотидна послідовність гена gB (Kaiser et al., 1998). Розрахунки праймерів проводили за допомогою програми AmplifX. Дизайн векторної конструкції здійснено за допомогою програми Clone Manager 7. Екстракцію геномної ДНК проводили сорбентним методом за методикою Boom et al. (1990).

Як джерело ДНК використовували розплодку штаму JM вірусу хвороби Марека в первиннотрипсинізованій культурі фібробластів курячих ембріонів (Стегній та ін., 2006). Трансформацію клітин проводили за допомогою комерційного набору фірми Fermentas. Виділення плазмід проводили методом, запропонованим Lee and Rasheed (1990).

Визначення кількісних показників ДНК проводили спектрофотометричним методом за довжини хвилі 260 нм (Маниатис и др., 1984). Для визначення оптичної щільності плазмідну ДНК розводили в 100 разів дистильованою водою. Кількість ДНК визначали за формулою:  $C[\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times K$ , де  $C$  – концентрація ДНК,  $A_{260}$  – оптична щільність за довжини хвилі 260 нм,  $K$  – коефіцієнт перерахунку ( $K$  є константою для розчинника, для дистильованої води він складає 38,1).

ПЛР проводили за допомогою комерційних наборів фірми Fermentas. Концентрація праймерів складала 100 нМ на 25 мкл реакційної суміші. Електрофоретичний аналіз проводили в 1%-ому агарозному гелі при напруженості 12 В/см.

Секвенування проводили з використанням праймерів gBX F й gBX R. Хімічний сиквенс був проведений з використанням комерційних наборів AbiPrism Terminator Kit (Applied Biosystems). Електрофоретичний аналіз продуктів реакції був здійснений на ДНК-аналізаторі ABI-3000 (AbiPrism) на базі центру секвенування GenoMed (Варшава, Польща). Корегування сиквенсу проводили за допомогою програми BioEdit.

### Результати досліджень

Як основа для майбутньої конструкції векторної системи нами була обрана багатокопійна синтетична плазмідна pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985), що несе ген резистентності до ампіциліну та має полілінкер із сайтами рестрикції EcoRI–SacI–KpnI–SmaI–BamHI–XbaI–SalI–PstI–SphI–HindIII в LacZ опероні.

Аналіз структур генів, вибраних для клонування, показав відсутність у їх складі сайтів пізнання ендонуклеазами BamHI, Sall та HindIII, що дозволило запропонувати наступну конструкцію вектору: pUC19 – сайт пізнання BamHI – промоторна ділянка гена γ-інтерферону курки – сайт пізнання Sall – ген глікопротеїну В – сайт пізнання HindIII – pUC19.

Після аналізу послідовності синтетичної фьюжн-вставки промоторна ділянка гена γ-інтерферону курки – ген глікопротеїну В стосовно правильного зчитування триплетного коду відносно сайту ініціації транскрипції нами були розраховані праймери, до 5'-кінців яких були додані сайти пізнання ферментами рестрикції (табл. 1).

Отримана модель вектору представлена на рис. 1.

Для ампліфікації промоторної ділянки гена γ-інтерферону курки з культури фібробластів курячих ембріонів нами була екстрагована сумарна ДНК сорбентним методом.

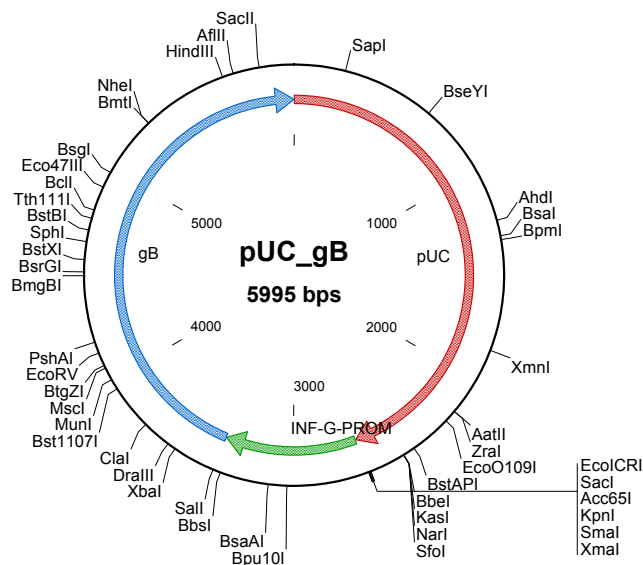
Оптимальна температура відпалу праймерів на ДНК-матриці склала 55°C, час денатурації, відпалу праймерів та елонгації – 60 сек., кількість циклів – 35.

У результаті нами був отриманий фрагмент розміром приблизно 725 п.н., що співпадав з попередніми теоретичними розрахунками (рис. 2).

Таблиця 1.

**Олігонуклеотиди для клонування гена глікопротеїну В та промоторної ділянки гена інтерферону курки**

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність 5' → 3'
gB F gB R promotor F promotor R	GTCGACTAAGATCATCTCACTAT AAGCTTGTTACACAGCATCATCTTCT GGATCCAACTTCAGCCATTGTCAG GTCGACCTCAGTGAGCTTCAGCTTCTA



**Рис. 1. Карта плазмиди pUC\_gB, що несе ген глікопротеїну В**

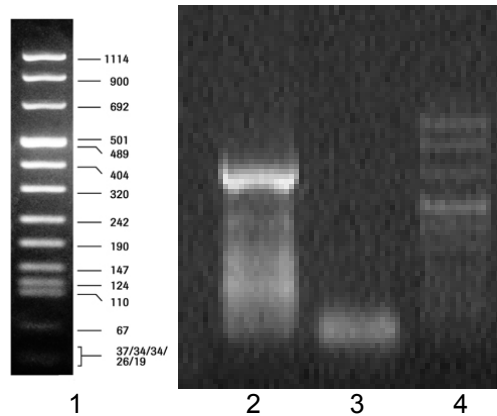
Реакцію ампліфікації гена глікопротеїну В проводили із сумішшю Taq та Pfu полімераз, виробництва фірми Fermentas.

При оптимізації режиму ампліфікації отримати продукт нам вдалося лише при поєднанні Touchdown-PCR та Long-PCR протоколів. В результаті нами був запропонований наступний протокол ампліфікації: 3 цикли з температурою відпалу праймерів 60°C, 3 цикли з температурою відпалу праймерів 57°C, 3 цикли з температурою відпалу праймерів 53°C, 25 циклів з температурою відпалу праймерів 50°C, час елонгації в усіх циклах складав 180 сек., температура 70°C.

Результати ампліфікації представлені на рис. 3.

Як видно з рис. 3, при проведенні ПЛР згідно з даним протоколом утворюється специфічний амплікон довжиною 2626 п.н.

Після накопичення фрагментів для утворення липких кінців була проведена реакція рестрикції з відповідними до сайтів впізнавання ендонуклеазами.



**Рис. 2. Результати гель-електрофорезу амплікону  $\gamma$ -інтерферону курки**

Примітки: 1 – еталон електрофорезу маркера, 2 – позитивний результат ПЛР, 3 – негативний контроль, 4 – маркер молекулярної ваги.

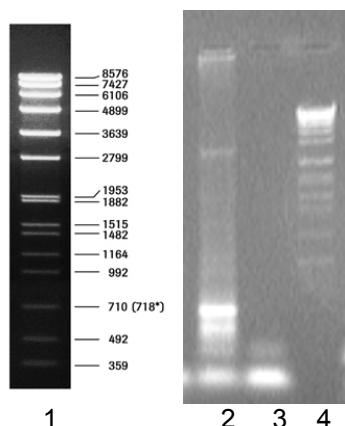
Отримані фрагменти були очищені на силікогелевій колонці та ліговані за допомогою лігази фагу Т4 в плазміді рUC19, що несе ген резистентності до ампіциліну.

З отриманою конструкцією було проведено трансформування клітин *Escherichia coli* штаму JM 109 з метою подальшого клонування.

Після накопичення плазміди рUC\_gB за умов хлорамфенікольної ампліфікації нами була проведена її екстракція лужним методом з подальшим переосадженням ізопропанолом.

Середній показник оптичної густини за довжини хвилі 260 нм для розчину плазміді рUC\_gB при розведенні в 100 разів складав 0,180 (N=5). Виходячи з цього, був розрахований середній кількісний показник виходу плазмідної ДНК з 4,5 мл добової культури рекомбінантних штамів *Escherichia coli*, який складав 0,68 мкг/мкл.

Ступінь забрудненості сторонніми речовинами визначали, виходячи зі значення співвідношення  $D_{260}/D_{280}=1,56$ , це свідчило про наявність невеликої кількості баластних речовин в розчині ДНК.



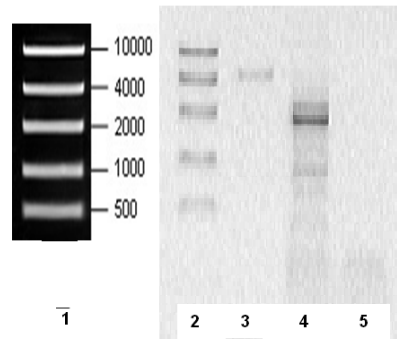
**Рис. 3. Результати гель-електрофорезу ПЛР із системою праймерів gB F та gB R**

Примітки: 1 – еталон електрофорезу маркера, 2 – позитивний результат ПЛР, 3 – негативний контроль ПЛР, 4 – маркер молекулярної ваги.

Після проведення нативного електрофорезу в 1% агарозному гелі екстрагованої плазміді рUC\_gB була виявлена ділянка розміром близько 6 тис. п.н. за електрофоретичною рухливістю (за маркером), що співпадало з теоретичним розміром плазміді рUC\_gB (5995 п.н.). Постановка ПЛР показала наявність у екстрагованій плазміді клонованого гена глікопротеїну В (рис. 4).

З метою виявлення інсерцій та делецій у клонованому гені нами було проведено його секвенування.

У результаті секвенування гена глікопротеїну В було встановлено первинну структуру ділянки довжиною 1025 п.н., що відповідає 4–1028 позиції відкритої рамки зчитування гена (рис. 5).



**Рис. 4. Результати гель-електрофорезу плазміди рUC\_gV та ПЛР з системою праймерів gV F та gV R**

Примітки: 1 – еталон електрофорезу маркера, 2 – маркер молекулярної ваги, 3 – плазміда рUC\_gV, 4 – позитивний результат ПЛР, 5 – негативний контроль ПЛР.

Аналіз ділянки гена, проведений за допомогою програми BLAST в режимі on-line, показав, що його послідовність відповідала послідовностям гена вірусу хвороби Марека І серотипу, v-патотипу. По відношенню до високовірулентних штамів вірусу хвороби Марека (N=15) ідентичність отриманої послідовності становила 99–100 %.

Отримані результати свідчать про відсутність інсерцій і делецій в накопичених плазмідах. Послідовність була опублікована в базі даних GenBank під номером EU771006.

```

1  cactatTTTA  ggcggaattg  catttttttc  cttatagtta  ttctatatgg  tacgaactca
61  tctccgagta  cccaaaatgt  gacatcaaga  gaagttggtt  cgagcgtcca  gttgtctgag
121  gaagagtcta  cgttttatct  ttgtccccc  ccagtggggt  caaccgtgat  ccgtctagaa
181  ccgccgcgaa  aatgtcccga  acctagaaaa  gccaccgaat  ggggtgaaag  aatcgcgata
241  ttattttaaag  agaatatcag  tccatataaa  tttaaagtga  cgctttatfa  taaaaafatc
301  attcagacga  cgacatggac  ggggacgaca  tatagacaga  tcaactaatcg  atatacagat
361  aggacgccc  tttccattga  agagatcacg  gatcfaatcg  acggcaaaag  aagatgctca
421  tctaaagcaa  gataccttag  aaacaatgta  tatgttgaag  cgtttgacag  ggatgcggga
481  gaaaaacaag  tacttctaaa  accatcaaaa  ttcaacacgc  ccgaatctag  ggcatggcac
541  acgactaatg  agacgtatac  cgtgtgggga  tcaccatgga  tatatcgaac  gggaaacctc
601  gtcaattgta  tagtagagga  aatggatgcc  cgctctgtgt  ttccgtattc  atattttgca
661  atggccaatg  gcgacatcgc  gaacatatct  ccattttatg  gtctatcccc  accagaggct
721  gccgcagaac  ccatgggata  tccccaggat  aatttcaaac  aactagatag  ctatttttca
781  atggatttgg  acaagcgtcg  aaaagcaagc  cttccagtca  agcgtaaact  tctcatcaca
841  tcacacttca  cagttgggtg  ggactgggct  ccaaaaacta  ctcgtgtatg  ttcaatgact
901  aagtggaaag  aggtgactga  aatgttgcgt  gcaacagtta  atgggagata  cagatttatg
961  gcccgTgaac  tttcggcaac  gttfatcagt  aatacgaactg  agtttgatcc  aaatcgcac
1021  atatt

```

**Рис. 5. Нуклеотидна послідовність ділянки гена глікопротеїну В, інтегрованого в плазміді рUC\_gV**

### Висновки

За проведеним аналізом нуклеотидних послідовностей ділянки гена γ-інтерферону курки та гена глікопротеїну В вірусу хвороби Марека сконструйовано специфічні праймери, оптимізовано протоколи постановки ПЛР з метою створення векторної молекули.

Теоретично розраховано та сконструйовано *in vitro* вектор рUC\_gV, який має послідовність рUC19 – сайт пізнавання BamHI – промоторна ділянка гена γ-інтерферону курки – сайт пізнавання Sall – ген глікопротеїну В – сайт пізнавання HindIII – рUC19, за допомогою якого після трансформації клітин *Escherichia coli* штаму JM 109 отримано amr-резистентний клон JM-pUC\_gV.

У результаті проведеного секвенування показана автентичність нуклеотидних послідовностей протективного антигену глікопротеїну В штаму JM-UA вірусу хвороби Марека та встановлено його ідентичність іншим штамам І серотипу цього вірусу.

### Список літератури

- Богданенко Е.В., Свиридов Ю.В., Московцев А.А., Жданов Р.И. Невирусный перенос генов in vivo в генной терапии // Вопросы медицинской химии. – 2000. – №3. – С. 38–56. /Bogdanenko Ye.V., Sviridov Yu.V., Moskovtsev A.A., Zhdanov R.I. Nevirusnyy perenos genov in vivo v gennoy terapii // Voprosy meditsinskoj khimii. – 2000. – №3. – С. 38–56./
- Воробьев А.А., Егорова Н.Б., Захарова Н.С. и др. Прогноз в области создания вакцин нового поколения для вакцинопрофилактики и вакцинотерапии инфекционных и неинфекционных болезней // Пульмонология. – 2005. – Вып.6. – С. 16–36. /Vorob'yev A.A., Yegorova N.B., Zakharova N.S. i dr. Prognoz v oblasti sozdaniya vaksyn novogo pokoleniya dlya vaksinoprofilaktiki i vaksinoterapii infektsionnykh i neinfektsionnykh bolezney // Pul'monologiya. – 2005. – Вып.6. – С. 16–36./
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии // Молекулярное клонирование. Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480с. /Maniatis T., Frich E., Sembruk Dzh. Metody geneticheskoy inzhenerii // Molekulyarnoye klonirovaniye. Per. s angl. – М.: Mir, 1984. – 480s./
- Стегній Б., Білокін В., Герілович А. Вивчення біологічних властивостей штаму JM-UA вірусу хвороби Марека // Ветеринарна медицина України. – 2006. – №10. – С. 13–14. /Stegniy B., Bilokin' V., Gerilovych A. Vyvchennya biologichnykh vlastyvostey shtamu JM-UA virusu khvoroby Mareka // Veterynarna meditsyna Ukrainy. – 2006. – №10. – С. 13–14./
- Black J. Genome projects and gene therapy: gateways to next generation biological weapons // Milit. Med. – 2003. – Vol.108, №11. – P. 864–871.
- Boom R., Sol C.J., Salimans M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microb. – 1990. – Vol.28, №3. – P. 495–503.
- Cui H.Y., Wang Y.F., Shi X.M. et al. Construction of an infectious Marek's disease virus bacterial artificial chromosome and characterization of protection induced in chickens // J. Virol. Methods. – 2009. – Vol.156, №1–2. – P. 66–72.
- Kaiser P., Wain H.M., Rothwell L. Structure of the chicken interferon-gamma gene, and comparison to mammalian homologues // Gene. – 1998. – Vol.207, №1. – P. 25–32.
- Lee S.Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // Biotechniques. – 1990. – Vol.9, №6. – P. 676–679.
- Niikura M., Matsuura Y., Endoh D. et al. Expression of the Marek's disease virus (MDV) homolog of glycoprotein B of herpes simplex virus by a recombinant baculovirus and its identification as the B antigen (gp100, gp60, gp49) of MDV // J. Virol. – 1992. – Vol.66, №5. – P. 2631–2638.
- Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene. – 1985. – Vol.33, №1. – P. 103–119.

---

**Представлено: Г.П.Горбенко / Presented by: G.P.Gorbenko**

**Рецензент: С.Ю.Утєвський / Reviewer: S.Yu.Utevsky**

*Подано до редакції / Received: 10.11.2010.*