

ПОЛУЧЕНИЕ
РЕКОМБИНАНТНОГО ГЕКСОНА
АДЕНОВИРУСА 3 ТИПА

Вишенина Диана Вячеславовна

Научный руководитель: Мукантаев Канатбек Найзабекович

Актуальность исследования

- ◆ Диагностика бычьего аденовируса затруднена из-за большого количества симптомов. Для обнаружения вируса применяют различные методы, такие как выделение вируса, гибридизация *in situ*, иммуноферментный анализ, иммунофлюоресценция, рестрикционный анализ и ПЦР. Однако, вышеперечисленные методы затратные по времени и требуют дорогостоящего оборудования и системы культуры ткани. В связи с этим, получение рекомбинантных антигенов вируса имеющих диагностическое значение является весьма актуальным.

- ◇ Учитывая широкую распространенность респираторных и желудочно-кишечных болезней молодняка сельскохозяйственных животных в Республике Казахстан, разработка современных экспресс тестов для выявления аденовирусной инфекции, основанных на рекомбинантных антигенах вируса и моноклональных антителах является весьма актуальной для нашей страны.
- ◇ В диагностическом плане наибольший интерес представляет капсидный белок аденовируса гексон. При этом гексон является группоспецифическим белком и индуцирует образование группоспецифических антител.

- ◆ *Цель диссертации:* получение штаммов E.coli, продуцирующих рекомбинантный гексон бычьего аденовируса 3-го типа.
- ◆ *Для достижения цели научной работы были поставлены следующие задачи:*
- ◆ 1. Дизайн генетической конструкции, несущей ген гексона бычьего аденовируса 3-го типа
- ◆ 2. Синтез гена гексона бычьего аденовируса и клонирование гена в экспрессионные плазмиды pET32 и pET28.
- ◆ 3. Трансформация компетентных клеток микроорганизмов полученными генетическими конструкциями.
- ◆ 4. Выделения и очистка рекомбинантного гексона бычьего аденовируса 3-го типа.
- ◆ *Новизна* работы заключается в получении впервые в Казахстане рекомбинантного гексона бычьего аденовируса 3-го типа и разработке на его основе экспресс-теста для серологической диагностики болезней молодняка.
- ◆ *Теоретическая и практическая значимость.* На основе полученных штаммов-продуцентов рекомбинантного гексона будут разработаны серологические экспресс-тесты для диагностики аденовирусных инфекций у крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследования

- ♦ В работе использованы штаммы *E. coli* DH5cc, BL21(DE3), плазмидный вектор pGEM-TEasy (Promega, USA), pET28, pET32. Клетки *E. coli* выращивали в LB среде.
- ♦ Для синтеза гена гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа использованы олигонулеотиды синтезированные в условиях *de novo*.
- ♦ *Выделение и очистка плазмидной ДНК* из штамма *E. coli* методом щелочного лизиса.
- ♦ *Фракционирование фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле.*
- ♦ *Разделение фрагментов ДНК* проводили в агарозном геле. Фрагменты выделяли из геля методом электроэлюции.
- ♦ *Лигирование фрагментов ДНК* проводили с помощью фермента ДНК-лигазы фага T4.
- ♦ *Рестрикцию плазмидной ДНК* проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции NdeI, XhoI и BamHI.

- ◆ *Трансформация клеток E.coli.*
- ◆ *Определение нуклеотидной последовательности ДНК* по методу Сэнгера.
- ◆ *Трансформация компетентных клеток плазмидными векторами pET-28 и pET-32 со вставками генов и экспрессия белка.*
- ◆ *Лизирование клеток* осуществляли с использованием ультразвукового дезинтегратора.
- ◆ *Очистку белка* осуществляли металлохелатной хроматографией.
- ◆ *Электрофоретическое разделение белков* в полиакриламидном геле.
- ◆ *Постановка иммуноблотинга.*
- ◆ *Тандемная масс-спектрометрия* для качественной идентификация белка гексона и сравнения данных с базой данных SwissProt по программе Mascot.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

- ♦ *Дизайн и синтез генетической конструкции, несущей ген фрагмента N-терминальной части гексона бычьего аденовируса*
- ♦ В результате проведенного дизайна, на основе рЕТ28 и рЕТ32 плазмид, были разработаны две генетические конструкции, несущих ген фрагмента N-терминальной части гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа.
- ♦ Экспрессионный регион плазмидного вектора рЕТ28 вместе со встроенным геном включает гены 6His-Tag, тромбиновый сайт, ген фрагмента N-терминальной части гексона вируса и 6His-Tag. Прогнозируемая молекулярная масса рекомбинантного белка экспрессируемая плазмидой составляет 24 кДа.
- ♦ В отличие от вектора рЕТ28, экспрессионный регион плазмидного вектора рЕТ32 включает гены тиоридоксинового белка, His-Tag, S-Tag, тромбина и энтерокиназы, His и S меток после выделения и очистки белка, гена фрагмента гексона и 6His-Tag.

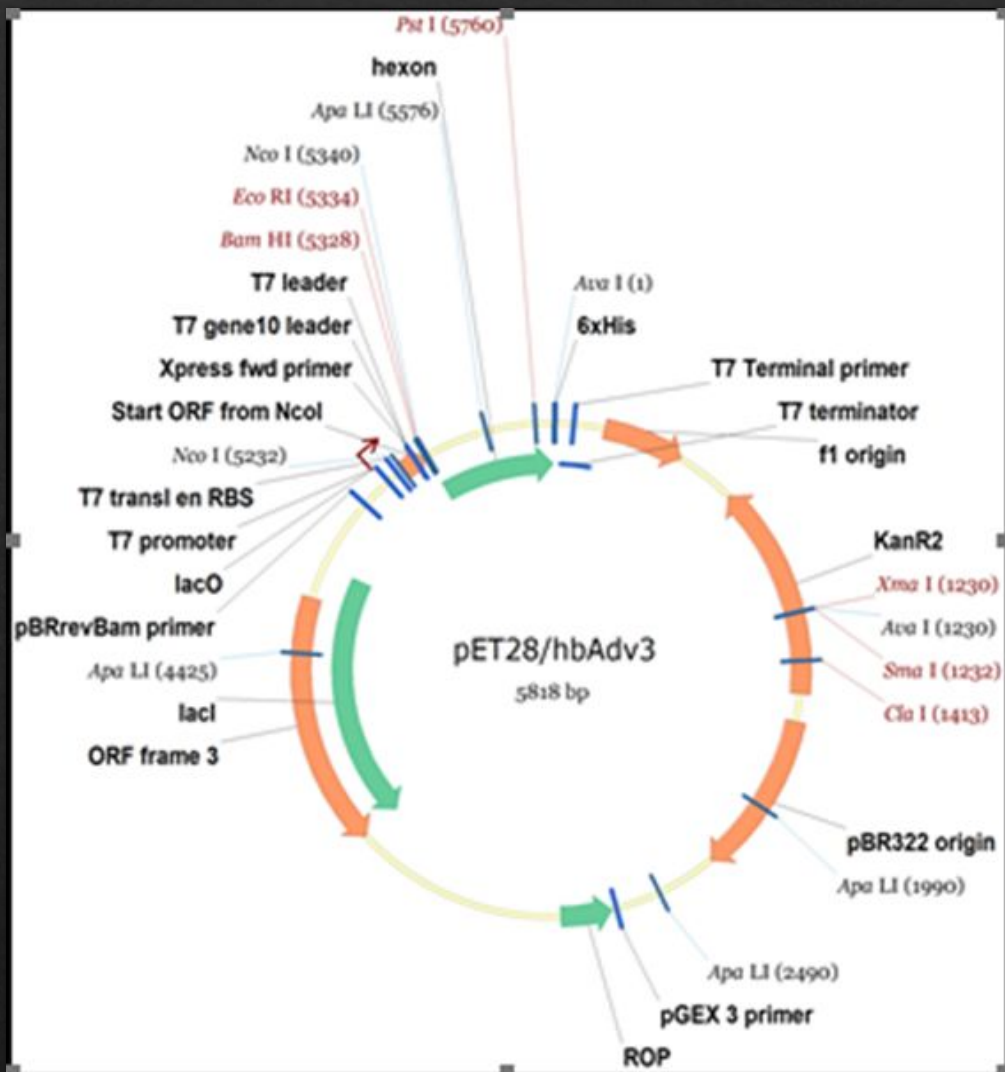


Рис. 1 - Схема генетической конструкции на основе рЕТ28 плазмиды несущей ген фрагмента N-терминальной части гексона бычьего аденовируса 3-го типа

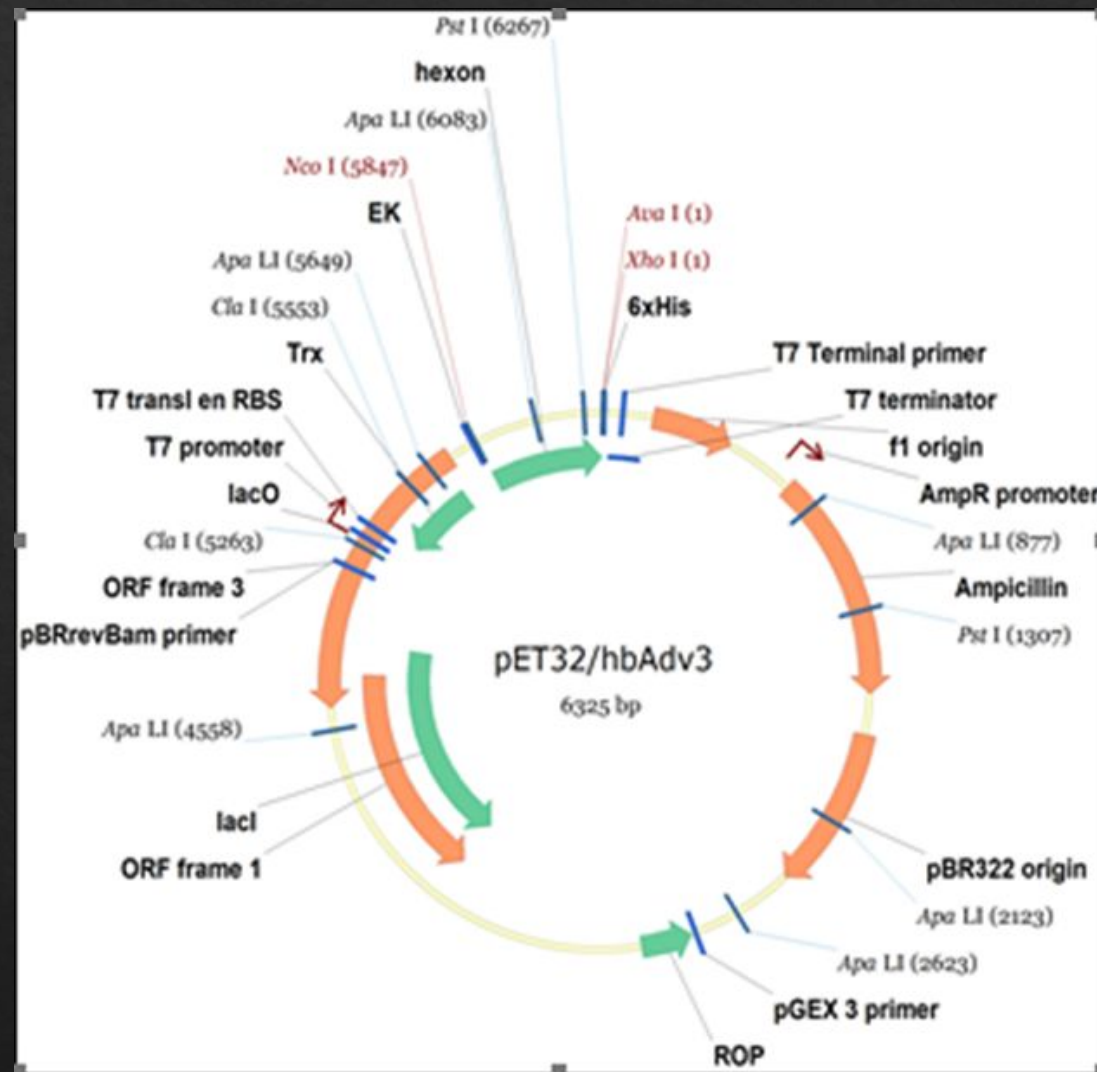


Рис. 2 - Схема генетической конструкции на основе рЕТ32 плазмиды несущей ген фрагмента N-терминальной части гексона бычьего аденовируса 3-го типа

- ◆ *Получение генетической конструкции на основе вектора pET28 и pET32, несущей ген фрагмента N-терминальной части гексона бычьего аденовируса*
- ◆ На основе отобранной аминокислотной последовательности фрагмента N-терминальной части гексона аденовируса крупного рогатого скота получена нуклеотидная последовательность, оптимизированная для экспрессии в кишечной палочке.
- ◆ К полученному гену фрагмента N-терминальной части гексона аденовируса крупного рогатого скота со стороны 3'-конца добавлена последовательность гексогистидиновой метки за которой следуют сайты для Xho и HindIII рестриктаз. Со стороны 5'-конца достроены сайты NcoI, EcoRI и BamHI рестриктаз.
- ◆ Синтез гена проводили методом двух раундовой полимеразной цепной реакцией. Молекулярная масса полученного продукта составляет 500 пар оснований, что соответствует прогнозируемой длине гена.

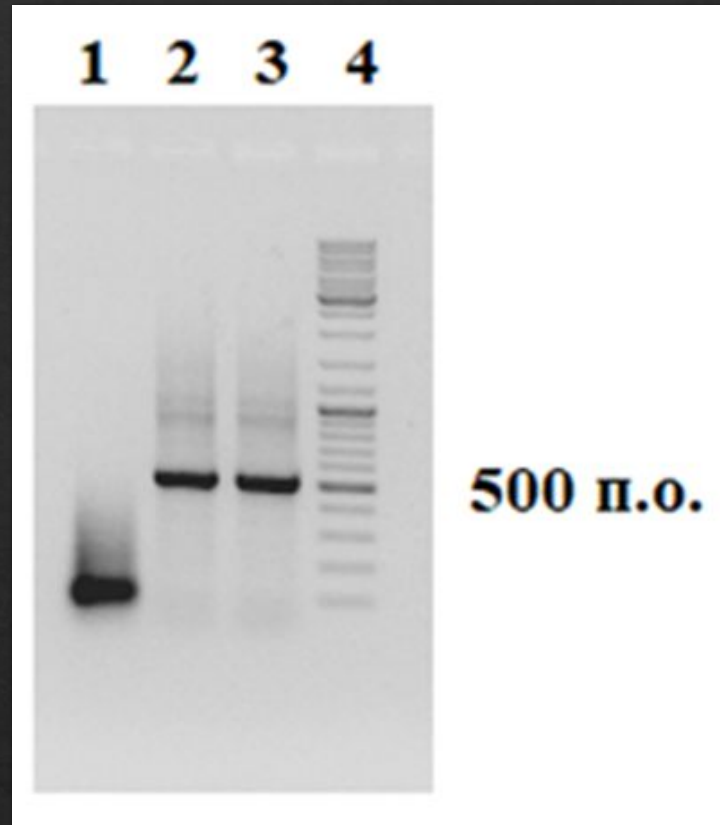


Рис. 3 - Электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции: 1 – продукт первого раунда полимеразной цепной реакции; 2,3 – продукт второго раунда полимеразной цепной реакции; 4 – молекулярные маркеры

- ◆ *Трансформация генетической конструкции и получение стабильных штаммов микроорганизмов, продуцентов рекомбинантного гена фрагмента N-терминальной части гексона аденовируса.*
- ◆ Полученный ген фрагмента N-терминальной части гексона бычьего аденовируса 3-го типа по сайтам рестрикции BamHI и HindIII клонирован в экспрессионную плазмиду pET28. По сайтам рестрикции NcoI и XhoI полученный ген клонирован в экспрессионную плазмиду pET32.
- ◆ Полученные конструкции трансформированы методом электропорации в экспрессионные штаммы E.coli BL21 и высевались на среду LB с содержанием антибиотика канамица для pET28 вектора и ампицилина для pET32 вектора.
- ◆ Колонии клеток скринировались на наличие экспрессионных векторов, несущих ген фрагмента гексона бычьего аденовируса 3-го типа.
- ◆ Результаты скрининга показали высокую эффективность трансформации. До 80% клонов несли плазмиды со вставками гена фрагмента гексона бычьего аденовируса 3-го типа.

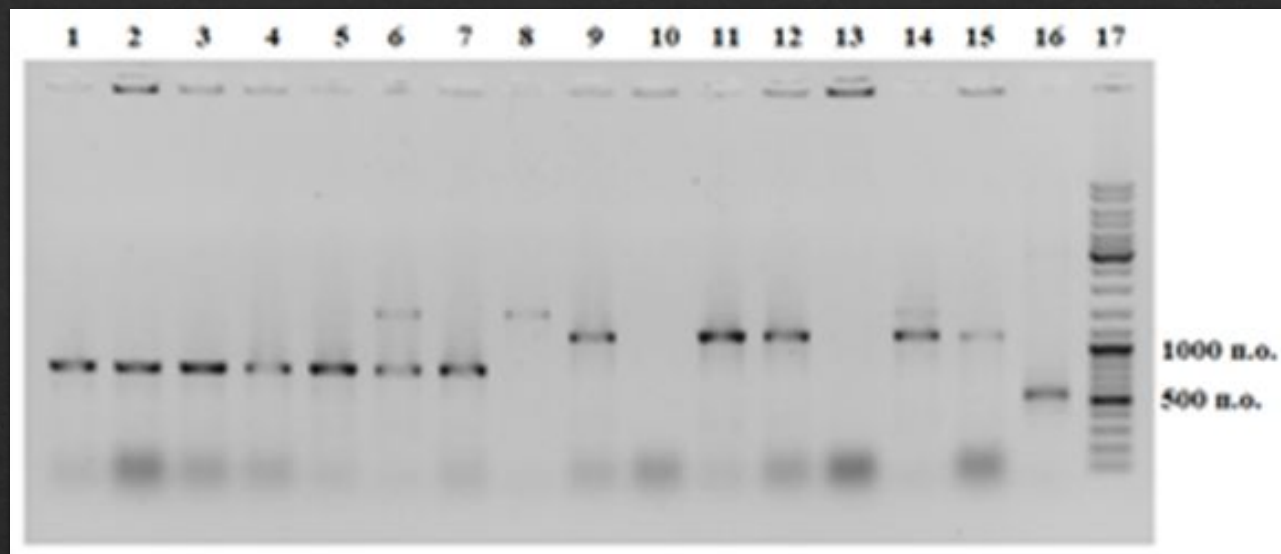


Рис. 4 - Электрофорез продуктов ПЦР скрининга колоний трансформированных клеток: 1-7 – клон клеток штамма BL21/pET28/bAdv3 hexon; 8-14 – клон клеток штамма BL21/pET32/bAdv3 hexon; 15 – положительный контроль; 16 – отрицательный контроль; 17 – молекулярные маркеры

После криоконсервации полученных штаммов микроорганизмов, определялась их экспрессионная активность.

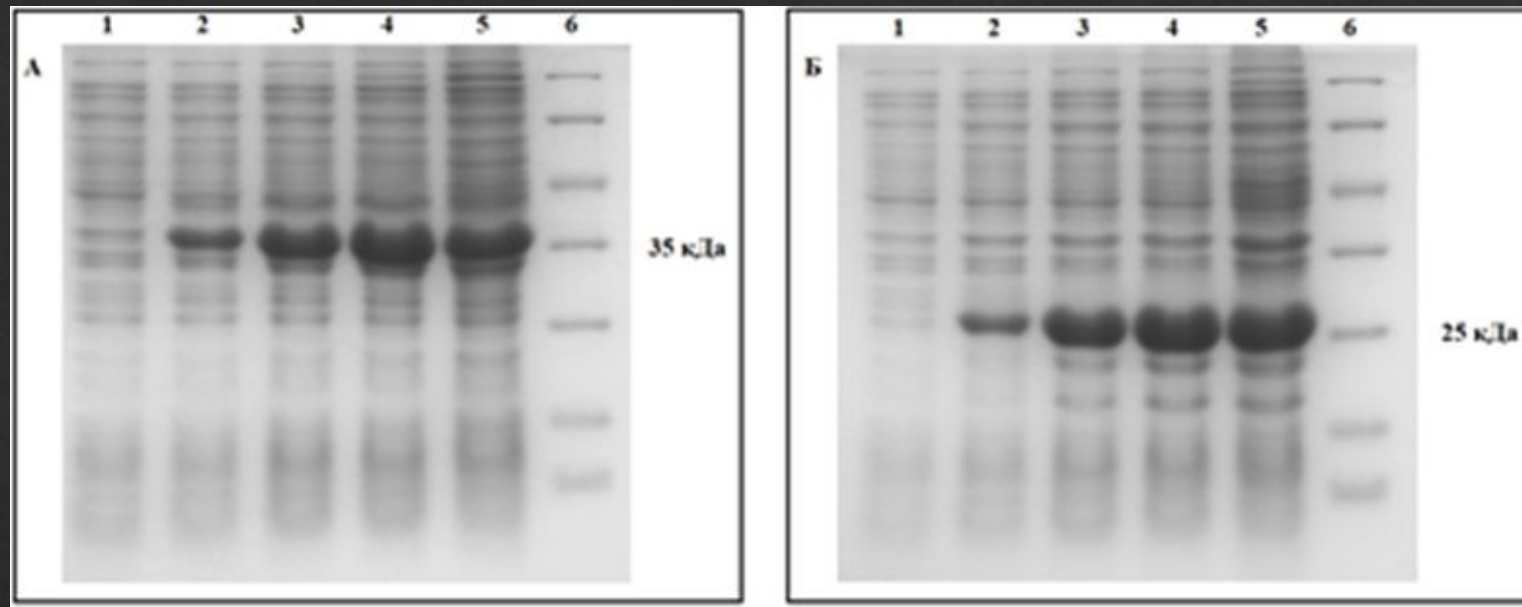


Рис. 5 - ПААГ электрофорез белков при определении экспрессионной активности штамм-продуцентов BL21/pET32/bAdv3 hexon (А) и BL21/pET28/bAdv3 hexon (Б): 1 – культура клеток без ИПТГ; 2 – 2 часа инкубирования с ИПТГ; 3 – 4 часов инкубирования с ИПТГ; 4 – 6 часов с ИПТГ; 5 – 12 часов с ИПТГ; 6 – молекулярные маркеры

Штамм *E.coli* BL21/pET32/bAdv3hexon производил белок молекулярной массой 34 кДа.

Штамм-продуцент *E.coli* BL21/pET28/bAdv3hexon производил белок молекулярной массой 24 кДа.

❖ *Выделение и очистка рекомбинантного гексона бычьего аденовируса*

- ❖ Для оптимизации выделения и очистки рекомбинантного гексона штаммы-продуценты культивировались в следующих условиях: концентрации индуктора 0,1 мМ, 0,25 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ; температуры питательной среды 25°C и 37°C. При этом результаты эксперимента оценивались по относительному содержанию рекомбинантных белков в нерастворимой фракции лизатов штамма-продуцента.

Таблица 1

Относительные количества рекомбинантных белков (%) в нерастворимых фракциях лизатов штаммов-продуцентов при различных условиях индукции экспрессии

Концентрации IPTG		0.1 мМ	0.2 мМ	0.5 мМ	1 мМ
BL21/pET32/bAdv3	25°C	50%	40%	30%	10%
	37°C	8%	8%	н/д	н/д
BL21/pET28/bAdv3	25°C	50%	40%	30%	10%
	37°C	8%	8%	н/д	н/д
Примечание- н/д – не детектируется					

- ♦ Как следует из приведенных данных, для всех выбранных для дальнейшей работы штаммов-продуцентов максимальная продукция рекомбинантных белков в растворимой фракции отмечена при следующих условиях культивирования: концентрация индуктора 0,2 мМ, температура культивирования после индукции экспрессии 250С.
- ♦ В следствии того, что рекомбинантный белок экспрессировался в тельца включения, важным параметром очистки является оптимальная концентрация мочевины в денатурирующем буфере. При определении оптимального денатурирующего буфера использовались различные концентрации мочевины. Из рисунка видно, что наиболее эффективным является 8 М мочевина.

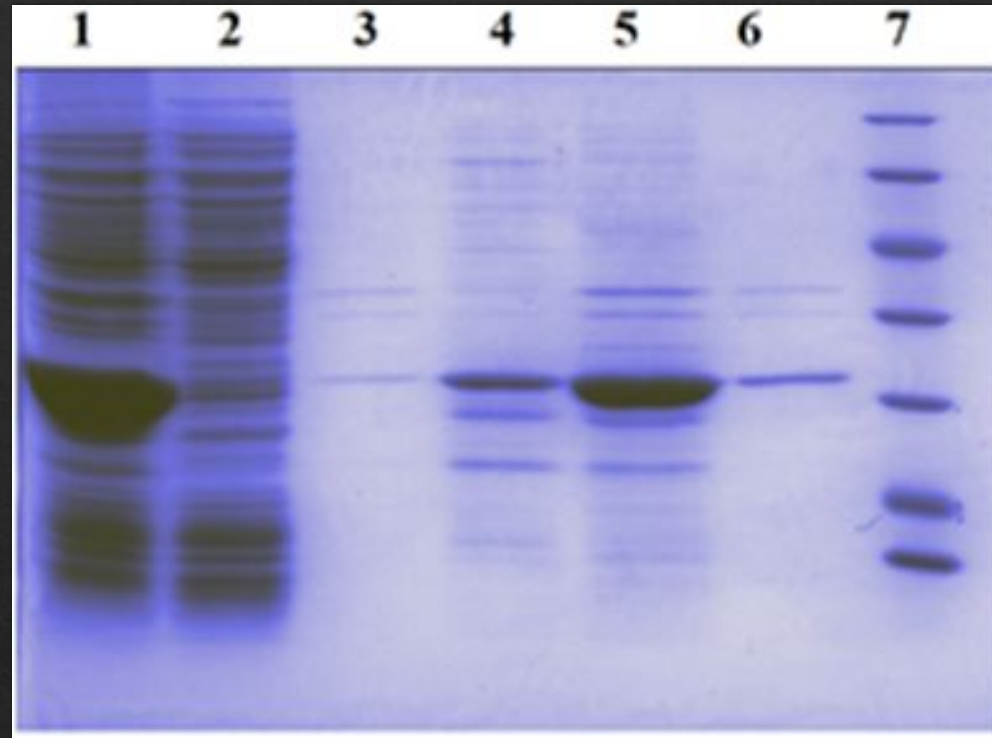


Рис. 6 - ПААГ электрофорез белков после денатурации мочевиной: 1 –осадок после разрушения клеток; 2 – над осадочная жидкость после разрушения клеток; 3 – 1М мочевины; 4 - 4М мочевины; 5 – 8М мочевины; 6 – 2 М мочевины; 7 – молекулярные маркеры

- ♦ В результате отработки параметров выделения и очистки рекомбинантных белков были получены очищенные препараты антигенов. Для очистки рекомбинантных белков использовали металлхелатную хроматографию на основе никель-сефарозы. В качестве элюирующего буфера использовали буфер с содержанием различных концентраций имидазола. Электрофоретический анализ показал чистые препараты белка молекулярной массой 24 кДа

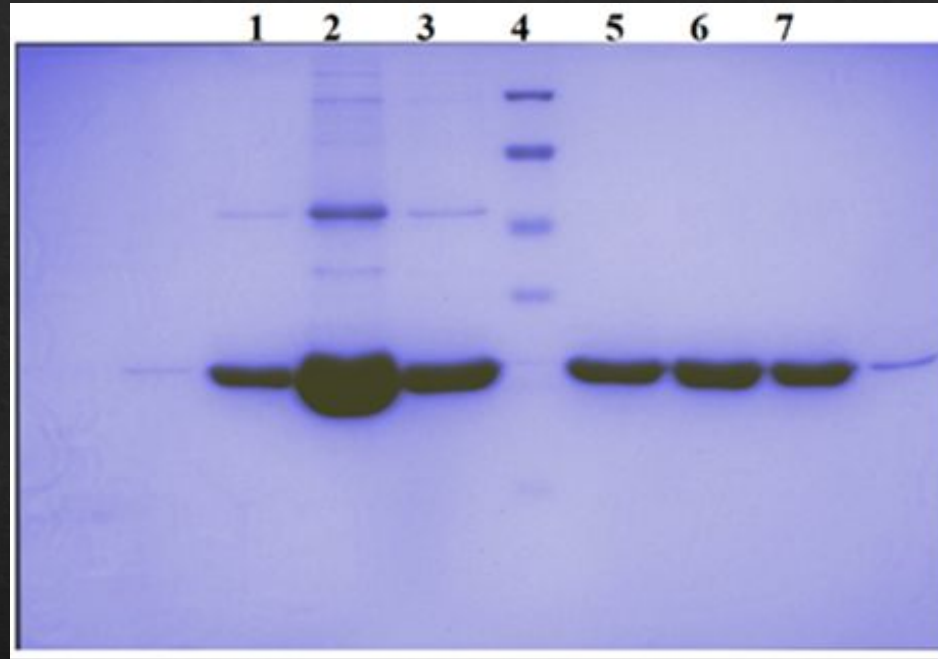


Рис.7 - ПААГ электрофорез белков после хроматографической очистки: 1-3 – 200 мМ имидазол; 4 – молекулярный маркер; 5-7 – 500 мМ имидазол

- ◆ *Качественная идентификация гексона бычьего аденовируса методом масс-спектрометрии.*
- ◆ В результате программой Mascot были представлены 43 наиболее вероятных белков, соответствующие полученным масс-спектрам, из которых наибольший скор (Score 2033) соответствовал только одному гексоновому белку рода Mastadenovirus семейства Adenoviridae, что ещё раз подтверждает, что был получен именно гексон бычьего аденовируса.

Таким образом, в результате диссертационной работы:

- ◆ 1. Проведен дизайн генетических конструкций на основе рЕТ28 и рЕТ32 плазмид, несущих ген фрагмента N-терминальной части гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа.
- ◆ 2. Методом двух раундовой полимеразной цепной реакцией синтезирован ген с молекулярной массой 500 пар оснований, что соответствует прогнозируемой длине гена.
- ◆ 3. Проведена трансформация компетентных клеток экспрессионный штамм E.coli BL21 полученными генетическими конструкциями. Скрининг полученных колоний показал высокую эффективность трансформации составляющая 80%.
- ◆ 4. Выделен и очищен рекомбинантный гексон бычьего аденовируса 3 типа. Электрофоретический анализ показал чистые препараты белка молекулярной массой 24 и 34 кДа.