Острикова К. В., Потапович М. И., Прокулевич В. А.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ОВЕЧЬЕГО ИНТЕРФЕРОНА-α В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Белорусский государственный университет, г. Минск

Инфекционные заболевания овец вирусной этиологии широко распространены и наносят большой экономический ущерб, поскольку эффективные средства борьбы с ними отсутствуют. К числу наиболее серьезных вирусных заболеваний овец можно отнести вирусную пневмонию, болезнь Найроби, энцефалит, ящур и др.

При разработке и создании противовирусных лечебно-профилактических препаратов для овец наиболее эффективным представляется использование овечьего ИФН-α, обладающего высокой антивирусной активностью [1].

Целью данной работы является клонирование и экспрессия гена овечьего ИНФ-α в клетках бактерий *Escherichia coli*.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue (F' :: Tn 10 proA$^+$B$^+$ lacI^{q}Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17(r_k^- m_k^+) glnV44 relA1 lac) из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ использовали для клонирования рекомбинантных плазмид.

Бактерии штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (*E. coli* B F$^-$ ompT hsdS (r_Bm_B) dcm$^+$ Tet^r galλ (DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]) фирмы Stratagene использовали для продукции рекомбинатных белков.

Генно-инженерные методики и ферменты. Выделение плазмидной ДНК проводили при помощи набора реактивов QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Германия).

Рестрикционный анализ и лигирование проводили согласно стандартным инструкциям, описанным Маниатис с соавт. [2].

Проведение Ca^{2+}-зависимой трансформации, электрофорез ДНК, электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ), подготовку проб, фиксацию и окрашивание ПААГ осуществляли с общепринятыми экспериментальными протоколами [3].

В работе использовались ферменты и буферные растворы фирмы Thermo Scientific. Денситометрический анализ изображений, окрашенных ПААГ-гелей, проводился с помощью программы TotalLab 2.01 («Nonlinear Dynamics Ltd.», Великобритания).

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы штамм бактерий *E. coli* XL-1 Blue трансформировали рекомбинантной плазмидой pET24b-ovine-ИФН-α, содержащей ген овечьего ИФН-α, встроенный по сайтам рестриктаз *Nde* I и *Eco* RI. Наличие гена овечьего ИФН-α проверяли рестрикционным анализом. В качестве отрицательных контролей выступала интактная и обработанная теми же рестриктазами плазмида pET24b (рис. 1).

Результаты электрофореза свидетельствуют о том, что плазмида, выделенная из клона штамма *E. coli* XL-1Blue, содержит ген овечьего ИФН-α (503 п.н.).

Затем рекомбинатной плазмидой pET24b-ovine-ИФН-α был трансформирован штамм бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3). Бактерии, унаследовавшие рекомбинантную плазмиду, выращивали в присутствии синтетического аналога лактозы — ИПТГ в концентрации 0,5 ммоль/л для индукции экспрессии гена овечьего ИФН-α. После чего проверяли наличие целевого продукта ПААГ-электрофорезом, результаты которого представлены на рис. 2.

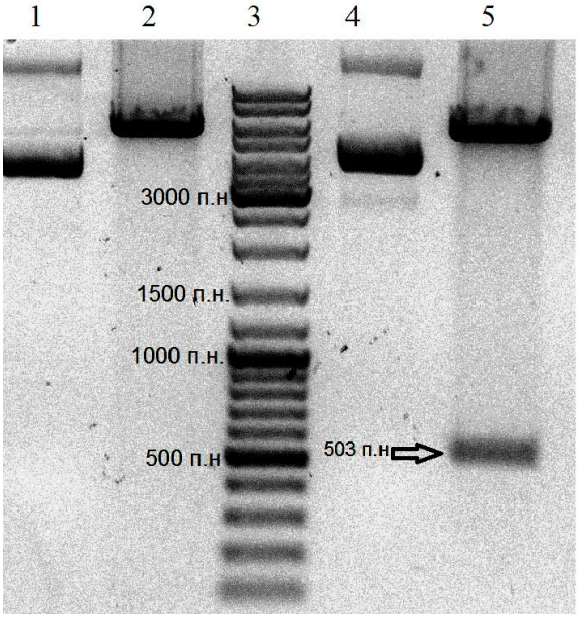

Рис. 1. Электрофореграмма результатов рестрикционного анализа плазмиды pET24b-ovine-ИФН-α. Дорожки:
1 — интактная плазмида pET24b(+); 2 — pET24b(+), обработанная рестриктазами Nde I и Eco RI; 3 — маркер молекулярного веса SM0333 («Thermo Scientific»); 4 — интактная плазмида pET-ovine-ИФН-α; 5 — pET-ovine-ИФН-α, обработанная рестриктазами Nde I и Eco R1

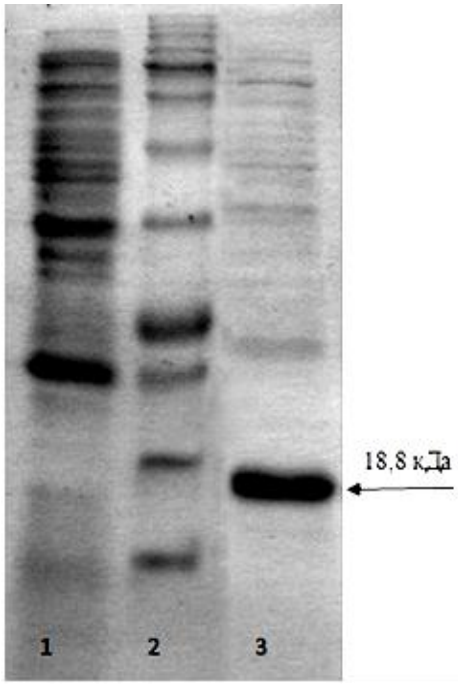

Рис. 2. ПААГ-электрофореграмма клеточных белков бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-pET-ovine-α-IFN. Дорожки:
1 — образец без индукции ИПТГ; 2 — маркер молекулярного веса Bluewide Range Protein Ladder (сверху вниз — 235 кДа, 170, 130, 93, 53, 41, 22, 9 кДа); 3 — образец через 4 часа после индукции ИПТГ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после индукции в бактериальных клетках, содержащих рекомбинантную плазмиду, наблюдается накопление целевого продукта (47 % от общего количества белка клетки), соответствующего по молекулярной массе овечьему α-IFN (около 18,8 кДа), что создает основу для биотехнологического производства видоспецифических антивирусных ветеринарных препаратов для овцеводства.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Биология* — наука XXI века : сб. тез. 18-й Междунар. Пущинской школы-конференции молодых ученых, Пущино, 21–26 апреля 2014 г. / редкол. : А. И. Мирошников [и др.] ; Пущинский науч. центр РАН, Пущинский гос. ун-т. Пущино, 2014. С. 72.

2. *Маниатис, Т.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. М. : Мир, 1984. 480 с.

3. *Current* protocol in molecular biology / F. M. Ausubel [et al.]. Boston, 2003. 17 p.

Vostrykava K. V., Patapovich M. I., Prakulevich V. A.

Expression of ovine interferon-α gene in E. coli cells

In the development of antiviral therapeutic and prophylactic preparations for sheep farming the most effective seems to be the use of ovine IFN-α, having a high antiviral activity. The aim of this work is cloning and expression of ovine interferon-α gene in *E. coli* cells.