

Kolchanova N. E., Okulich V. K.

Determination of chemotherapy action on microbial biofilm of periodontal pocket

The article reflects the current problem of diagnosis and treatment of inflammatory periodontal diseases. Biofilm-producing bacterial flora localized in periodontal pocket is researched. Methods of visual and quantitative assessment of biofilms are developed. Influences of antiseptic agents, enzymes on a microbial biofilms are studied as well.

Кудин К. В., Прокулевич В. А.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА КАПСИДА ЦВС-2 НА ОСНОВЕ ШТАММА *E. COLI*

Белорусский государственный университет, г. Минск

Цирковирус свиней типа 2 (ЦВС-2) является этиологическим агентом целого ряда заболеваний, объединяемых в научной литературе под общим названием цирковирусные болезни свиней (ЦВБС) [1, 2]. Наиболее серьезным и экономически значимым проявлением ЦВБС является синдром послеотъемного мультисистемного истощения. В периоды эпидемических вспышек инфекций ЦВС-2 смертность в хозяйствах может достигать 50 % [3–5] из-за чрезвычайно высокой летальности данного заболевания [3, 5–7]. В настоящее время инфекции, обусловленные ЦВС-2, присутствуют в каждой стране, связанной со свиноводством, и частота их встречаемости постепенно растет. В связи с этим все большие средства направляются на разработку вакцин и методов диагностики данного вируса.

Целью данной работы является создание бактериального продуцента рекомбинантного белка капсида на основе штамма ЦВС-2, циркулирующего в свиноводческих хозяйствах Республики Беларусь.

Материалы и методы

Получение фрагмента генома белорусского штамма ЦВС-2 описывали ранее [8]. Разработку праймеров и расчет основных термодинамических параметров реакции амплификации осуществляли с помощью веб-сервиса Primer3Plus (<http://primer3plus.com>). Ферментативные реакции, в том числе рестрикцию, лигирование, фосфорилирование, дефосфорилирование, обработку фрагментом Кленова и амплификацию проводили в соответствии с инструкциями, предоставленным фирмой-производителем ферментов (Thermo Fisher Scientific Inc.). Для клонирования созданных конструкций

использовали штамм *E. coli* XL1-blue. Для продукции рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 использовали штамм *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL [9].

Результаты и обсуждение

Системы экспрессии, основанные на векторах серии pET, являются самыми мощными на сегодняшний день инструментами для клонирования и экспрессии рекомбинантных белков в различных штаммах *E. coli*. Данные системы базируются на транскрипционных механизмах бактериофага T7 и являются индуцибельными, позволяя регулировать уровень наработки целевого белка в широком диапазоне.

Для экспериментов по экспрессии белка капсида ЦВС-2 выбрали вектор pET-24b(+), поскольку он содержит самый мощный на сегодняшний день инструмент экспрессии рекомбинантных белков.

Чтобы извлечь открытую рамку трансляции из фрагмента генома ЦВС-2, клонированного ранее [8], использовали метод ПЦР. Для этого, на основании анализа сиквенса клонированного фрагмента, были сконструированы два праймера: F_NdeI_PCV2 и R_XhoI_PCV2 (табл.).

Параметры разработанных праймеров

| Название | Сиквенс 5'→3' | Размер, нт | T _{плавл.} , °C | GC, % | Ампликон, п.о. |
|-------------|--|------------|--------------------------|-------|----------------|
| F_NdeI_PCV2 | gtaccat atgacgtatacaaggaggcgt | 28 | 61,5 | 47,6 | ~717 |
| R_XhoI_PCV2 | ag ctcgag ttaagggttaagtggggggtc | 29 | 62,2 | 52,4 | |

Каждый праймер состоял из основной отжигаемой части и небольшой нуклеотидной навески (выделена жирным шрифтом в табл.), содержащей определенный сайт рестрикции (выделен подчеркиванием в табл.) — *NdeI* или *XhoI*. Сайты рестрикции подбирались в соответствии со структурой полилинкера вектора pET-24b(+) и последовательностью амплифицируемой рамки трансляции таким образом, чтобы при лигировании сориентировать вставку в нужном направлении по отношению к промотору фага T7. При проведении ПЦР в качестве матрицы выступал выделенный и очищенный вектор pUC-PCV2, а в ходе реакции образовывался продукт размером ~717 пар оснований (п. о.), который представлял собой, фактически, открытую рамку трансляции гена белка капсида, фланкированную сайтами рестрикции *NdeI* (на 5`конце смысловой цепи) и *XhoI* (на 3`конце смысловой цепи).

Первоначальный план переклонирования предусматривал двойную рестрикцию вектора и амплифицированной вставки с образованием несовместимых липких концов (*NdeI* и *XhoI*) для лигирования в правильной ориентации. Однако в процессе работы выяснилось, что сайт *XhoI* в составе амплифицированного продукта неактивен и не распознается рестриктазой.

В связи с этим был разработан альтернативный двухэтапный вариант получения аналогичной конструкции. На первом этапе разрезанный рестриктазой *XhoI* вектор рЕТ-24b(+) после «затупления» концов фрагментом Кленова лигировался по тупым концам с амплифицированным высокоточной *Pfu* полимеразой фрагментом, содержащим открытую рамку считывания (ОРС) ЦВС-2. Для уменьшения вероятности самолигирования и увеличения доли рекомбинантных молекул вектор рЕТ-24b(+) после «затупления» концов обрабатывался фосфатазой, а продукт амплификации ОРС ЦВС-2, в свою очередь, фосфорилировался с помощью полинуклеотидкиназы. Поскольку вставка могла располагаться в векторе с равной вероятностью в любой ориентации, скрининг клонов после Ca^{2+} -зависимой трансформации штамма *E. coli* XL1-blue производили путем ПЦР с помощью различных попарных сочетаний четырех праймеров — двух сконструированных при выполнении этапа (табл.) и двух стандартных коммерческих праймеров для секвенирования вставок в векторе рЕТ-24b(+) (T7 Ppromoter и T7 Terminator Primer). Очевидно, что при правильной ориентации вставки продукт амплификации должен появляться при использовании любого прямого праймера (F_NdeI_PCV2 или T7_F) в сочетании с любым обратным (R_XhoI_PCV2 или T7_R), при использовании же только прямых или только обратных праймеров продукт отсутствует и может появляться лишь при неправильной ориентации вставки.

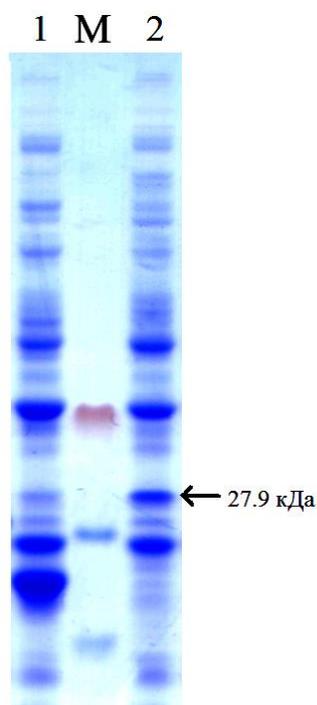


Рис. Результаты экспрессии рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 в штамме *E. coli*: 1 — положительный контроль, рекомбинантный свиной альфа-интерферон (19 кДа); М — маркеры молекулярного веса белков SM1861 (Thermo Fisher Scientific Inc.); 2 — продукция рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 (27,9 кДа)

Из отобранного таким образом положительного клона выделялась векторная ДНК, которая впоследствии обрабатывалась рестриктазой *NdeI* (при этом вырезался фрагмент длиной около 80 п. о., содержащий полилинкер) и после электрофореза и выделения из агарозного геля вектор лигировался сам на себя. В итоге получилась конструкция, аналогичная первоначально запланированному варианту, в котором рекомбинантный вектор лишен полилинкера и открытая рамка трансляции гена белка капсида ЦВС-2 совмещена с регуляторными элементами вектора без дополнительных ненужных аминокислотных остатков и нуклеотидных последовательностей. После Ca^{2+} -зависимой трансформации штамма *E. coli* BL21-CodonPlus предварительные эксперименты по экспрессии с использованием автоиндукционных сред Стьюдиера показали накопление в клетках продуцента рекомбинантного белка размером 27,9 кДа (рис., на дорожке 2 рекомбинантный продукт обозначен стрелкой).

Выводы

Таким образом, была создана конструкция для экспрессии в клетках штамма *E. coli* открытой рамки считывания, кодирующей полноразмерный рекомбинантный белок капсида ЦВС-2. Также был получен бактериальный продуцент белка капсида ЦВС-2. Полученные результаты будут использованы для разработки отечественных методов диагностики и профилактики цирковирусных инфекций свиней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Орлянкин, Б. Г. Цирковирусные болезни свиней / Б. Г. Орлянкин, А. М. Мишин // Свиноводство. 2010. № 5. Р. 50–53.
2. Раев, С. А. Специфическая профилактика цирковирусных болезней свиней : современное состояние и перспективы / С. А. Раев // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2014. № 1. Р. 26–29.
3. *Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds* / A. K. Cheung [et al.] // Arch. Virol. 2007. Vol. 152, N 5. P. 1035–1044.
4. *The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease — 2004–2006* / S. Carman [et al.] // Can. J. Vet. Res. 2008. Vol. 72, N 3. P. 259–268.
5. *Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome* / I. Morozov [et al.] // J. Clin. Microbiol. 1998. Vol. 36, N 9. P. 2535–2541.
6. *Postweaning multisystemic wasting syndrome : epidemiology and clinical presentation* / J. C. S. Harding [et al.] // Swine Heal. Prod. 1998. Vol. 6, N 6. P. 249–254.
7. *Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome* / J. Quintana [et al.] // Vet. Rec. 2001. Vol. 149, N 12. P. 357–361.
8. Кудин, К. В. Клонирование гена белка капсида белорусского штамма цирковируса свиней 2 типа / К. В. Кудин, В. А. Прокулевич // Вестник БГУ. 2011. Vol. 2, N 2. P. 37–41.
9. *BL21-CodonPlus™ cells correct expression problems caused by codon bias* / C. Carstens [et al.] // Strategies. 2001. Vol. 14, N 2. P. 50–52.

Kudzin K. V., Prakulevich V. A.

Development of the *E. coli*-based strain producing the recombinant PCV2 capsid protein

PCV2 is the most economically important swine pathogen. It has spread everywhere and become endemic in every pig-producing country. We have developed a pET-24b(+)-based construction for expression of the full length open reading frame, coding the capsid protein of the Belarusian strain PCV2. This construction was introduced into the *E. coli* strain and accumulation of the recombinant protein of the molecular weight of 27.9 kDa was observed. Thus, we have developed a bacterial strain capable of producing the recombinant PCV2 capsid protein.

¹Маклюк М. А., ¹Раевская И. А., ²Филипченкова М. А., ¹Чистенко Г. Н.

ОСТРЫЕ КИШЕЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ НЕУСТАНОВЛЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ В ОКТЯБРЬСКОМ РАЙОНЕ Г. МИНСКА

¹ Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

² Центр гигиены и эпидемиологии Октябрьского района г. Минска

В соответствии с рекомендациями ВОЗ, термин «острые кишечные инфекции» (ОКИ) объединяет более 30 заболеваний бактериальной, вирусной или протозойной этиологии, основным симптомом которых является острая диарея.

Тот факт, что 70 % случаев ОКИ приходится на заболевания с неустановленным возбудителем, можно считать следствием общепринятого для ОКИ «синдромального» принципа формирования диагноза, который полностью оправдывает себя при заболеваниях, не имеющих эпидемического характера. Напротив, при эпидемических ОКИ как можно более раннее выделение и идентификация возбудителя болезни становится важнейшей задачей, требующей, к сожалению, значительных затрат времени и наличия хорошо оснащенной лаборатории [1].

Более чем в половине случаев этиологию ОКИ не удается установить ни клинически, ни лабораторно. Эта задача, равно как и выбор патогенетического лечения, не может быть решена на этапе догоспитальной помощи [2].

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно регистрируется около 3–5 миллиардов случаев ОКИ и 5–10 миллионов смертей (преимущественно в развивающихся странах). В Республике Беларусь в последние годы сформировалась тенденция к снижению доли ОКИ неустановленной этиологии в общей структуре болеющих. Вместе с тем, она продолжает оставаться достаточно высокой [3].