

УДК 619:578.824.11:615.371:573.6

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ pTZ57/GR3_MUT, НЕСУЩЕЙ ГЕН ГЛИКОПРОТЕИНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Иовлева А.Ю., Елаткин Н.П., Метлин А.Е.

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир

Клонирование генов различных вирусов с целью создания рекомбинантных вакцин стало рутинным методом. Одной из наиболее удачных является генно-инженерная вакцина против бешенства, которая широко применяется для ликвидации этого опасного заболевания в некоторых странах Европы и ряде штатов США [4]. Актуальной задачей является разработка рекомбинантных вакцин против бешенства на основе отечественных изолятов и штаммов. Основой для создания таких вакцин является конструирование плазмидных векторов, несущих вставки генов иммунодоминантных белков вируса бешенства, в первую очередь гликопротеина [1, 4]. Очень часто в процессе клонирования возникает необходимость исправления нуклеотидных замен, возникающих в ходе наработки кДНК генов, либо внесения искусственных нуклеотидных замен. Одним из наиболее простых, технологичных и удобных способов для этого является сайт-специфический (направленный) мутагенез [5], который используется не только для внесения инсерции или делеции точечных мутаций, но и для маркирования генов, корректировки рамок считывания, смены аминокислот и др.

Некоторые методики мутагенеза основываются на использовании в качестве матрицы однострессовой ДНК [2, 5]. Сайт-специфический мутагенез с использованием рестриктаз, расщепляющих метилированную ДНК позволяет вносить специфические мутации в двунитевую ДНК плазмиды, что позволяет избежать этапа клонирования в вектор на основе фага M13 [5]. Кроме того, данный метод не нуждается в специальных векторах, уникальных сайтах рестрикции, множественных трансформациях, для него не требуется большого количества плазмидной ДНК и циклов амплификации. Все это обеспечивает высокую эффективность внесения желаемой мутации, которая достигает более 80 %, и снижение вероятности появления случайных замен в процессе реакции [3, 6].

Ранее нами была сконструирована плазмида pTZ57/gp3, несущая ген гликопротеина вируса бешенства штамма RV-97. Ген гликопротеина, содержащийся в этой плазмиде, включал значимую замену (А на G) в положении 1372 нуклеотида от стартового кодона, которая приводила к замене глутаминовой кислоты на лизин в 458 положении [1]. Поэтому целью данной работы было получение плазмиды, в которой последовательность гена гликопротеина не содержала бы значимой замены нуклеотида в положении 1372.

Материалы и методы. В работе использовали штамм *E.coli* XL1, содержащий рекомбинантную плазмиду pTZ57/gp3 со вставкой гена гликопротеина вируса бешенства штамма RV-97 (рис. 1).

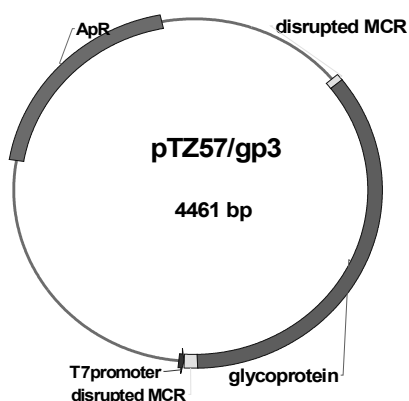


Рис. 1 Схема плазмиды pTZ57/gp3

Плазмидную ДНК получали с использованием наборов для выделения плазмид AxyPrep Plasmid Midiprep Kit («Axygen Biosciences», США) и PureYield Plasmid Midiprep System («Promega», США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Последовательности олигонуклеотидных праймеров для проведения реакции сайт-специфического мутагенеза рассчитывали в программе OLIGO 6.2 («Molecular Biology Insight», США) с учётом следующих требований: праймеры должны быть комплементарны друг другу, содержать желаемую мутацию и специфически отжигаться на целевую плазмиду; размер праймеров должен быть порядка 25-45 нуклеотидов, желаемая мутация должна быть в середине праймера [5].

Реакцию сайт-специфического мутагенеза проводили с использованием высокоточной генно-инженерной полимеразы Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity («Invitrogen», США), обладающей 3'-5' экзонуклеазной активностью. Расщепление исходной немутантной ДНК-матрицы проводили эндонуклеазой рестрикции *DpnI* («Fermentas», Литва). Реакции ставили в амплификаторе BioRad PTC-220 («BioRad», США).

Носителем мутантной плазмиды служили компетентные клетки авирулентного штамма *E.coli* XL1 («Stratagene», США), метилирующие плазмидную ДНК. Трансформацию компетентных клеток осуществляли методом электропорации с использованием мультипоратора Erpendorf («Erpendorf», Германия).

В работе применяли общепринятые методы культивирования бактерий: трансформированные клетки высевали на LB agar с ампициллином (50 мкг/мл), полученные клоны засеивали в жидкую среду SOB с ампициллином (50 мкг/мл), пробирки инкубировали в термостате при 37 °C на качалке (200 об/мин) 18 ч [3].

Для оценки эффективности трансформации (ЭфТр) подсчитывали общее число колониеобразующих единиц (КОЕ) на каждой чашке Петри, а также количество колоний, имеющих белый фенотип. ЭфТр рассчитывали по формуле: ЭфТр = (Количество белых колоний / Общее число КОЕ) × 100 %.

Первичную нуклеотидную последовательность гена гликопротеина в рекомбинантной плазмиде определяли на автоматическом секвенаторе ABIPrism 3100SX («AppliedBiosystem», США) с использованием праймеров на последовательность плазмиды (pUC/M13 – прямой прай-

мер, T7 – обратный) и на последовательность гена. Для анализа первичной нуклеотидной последовательности использовали прикладную компьютерную программу BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>).

Результаты исследований. На первом этапе работы были рассчитаны праймеры для сайт-специфического мутагенеза, отвечающие необходимым требованиям. Подобранные в результате анализа праймеры (табл. 1) состояли из 46 нуклеотидов, были комплементарны друг другу, не образовали димеров и шпилечных структур.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для сайт-направленного мутагенеза

	Последовательность праймера 5'...3'
Прямой праймер	TGACCTGGGTCTCCCGAAGTGGGAgAGTATGTATTACTGAGTGCA
Обратный праймер	TGCACTCAGTAATACATACTcTCCCCAGTTCGGGAGACCCAGGTCA

Примечание: Строчным жирным шрифтом отмечена вносимая замена.

Концентрация многокопийной плазмиды pTZ57/gr3, наработанной в компетентных клетках *E. coli* штамма XL1 и выделенной с помощью наборов для выделения плазмид: AxyPrep Plasmid Midiprep Kit (эксперимент № 1) и PureYield Plasmid Midiprep System (эксперимент № 2), составила 180 мкг/мл и 450 мкг/мл соответственно. При этом чистота полученной плазмиды (при измерении соотношения оптической плотности 260/280) оказалась выше в эксперименте № 1, чем в эксперименте № 2 (1,82 против 1,76), поэтому для дальнейшей работы использовали плазмиду, выделенную с использованием набора AxyPrep. Исходя из того, что для постановки реакции необходимо от 5 до 100 нг ДНК-матрицы, плазмиды разводили до концентрации 90 нг/мкл.

Выбор высокоточной полимеразы для реакции амплификации, обладающей 3'-5' экзонуклеазной активностью, обусловлен тем, что частота встраивания некомплемментарных нуклеотидов у данной полимеразы $2,3 \times 10^{-6}$, что существенно ниже, чем у обычной Taq-ДНК-полимеразы (10^{-5}). Высокая эффективность используемой полимеразы, низкая частота встраивания некомплемментарных нуклеотидов и небольшое количество циклов амплификации обеспечивали высокую эффективность внесения желаемой мутации и снижение появления случайных замен в процессе реакции. Для сравнения эффективности трансформации, собирали две реакционные смеси, с различными концентрациями матрицы, ионов Mg^{2+} и праймеров. Состав реакционной смеси представлен в табл. 2.

Таблица 2 – Состав реакционной смеси

Реактив	Реакция 1	Реакция 2
10x ПЦР-буфер	6,5 мкл	9 мкл
ДНК-матрица	1 мкл	1 мкл
MgSO ₄	2 мкл	4 мкл
Прямой праймер (F)	1 мкл	1 мкл
Обратный праймер (R)	1 мкл	1 мкл
дНТФ	1 мкл	1 мкл
Вода	11,5 мкл	32 мкл
ДНК-полимераза	1 мкл	1 мкл
Общий объем	25 мкл	50 мкл

Для каждой реакции подбирали температурно-временной режим (табл. 3), отличающийся температурой отжига праймеров для подбора условий, обеспечивающих оптимальную наработку мутантной плазмиды без неспецифической наработки.

Таблица 3 – Температурно-временной режим реакций амплификации

Реакция 1		Реакция 2	
95°C - 30 сек		95°C - 30 сек	
92°C – 1 мин	35 циклов	92°C – 1 мин	35 циклов
50°C – 1 мин		42°C – 1 мин	
50°C – 9 мин		50°C – 9 мин	

По окончании ПЦР проводили рестрикцию исходной немутантной плазмиды. Для этого в каждую пробирку вносили по 1 мкл рестриктазы *DpnI*. Данная эндонуклеаза (сайт узнавания которой: 5'-Gm⁶ATC-3') действует только на метилированную или полуметилированную ДНК и используется для расщепления немутированной исходной плазмиды и отбора синтезированной ДНК, содержащей специфическую мутацию. Выбор данной рестриктазы обусловлен тем, что она способна работать в ПЦР-буфере. Для более полного расщепления немутантной плазмиды время инкубирования смеси установили 6 ч при температуре 37 °С.

На следующем этапе проводили трансформацию продукта амплификации (мутантной плазмиды) в компетентные клетки *E.coli* штамма XL1. Трансформированные клетки высевали на селективную среду с добавлением X-gal и IPTG для сине-белой селекции. После инкубирования чашек с агаром в термостате при 37 оС 16 ч было получено для реакции №1: общее количество КОЕ – 123, количество колоний с белым фенотипом – 109; для реакции № 2: 131 и 79 колоний, соответственно. Таким образом ЭфТр составила:

Реакция № 1 ЭфТр= (109/123) x 100 % = 88,6 %

Реакция № 2 ЭфТр= (79/131) x 100 % = 60 %.

Розділ 2. Загальні питання та новітні методи в біотехнології

На последнем этапе работы проводили скрининг полученных клонов. Для этого с обеих чашек Петри отобрали 10 белых колоний для наработки плазмид. Выделенные плазмиды (расчетный размер 4500 н.о.) оценивали по электрофоретической подвижности относительно контрольных плазмид со вставкой (3839 н.о.) и без нее (2886 н.о.) (рис. 2).

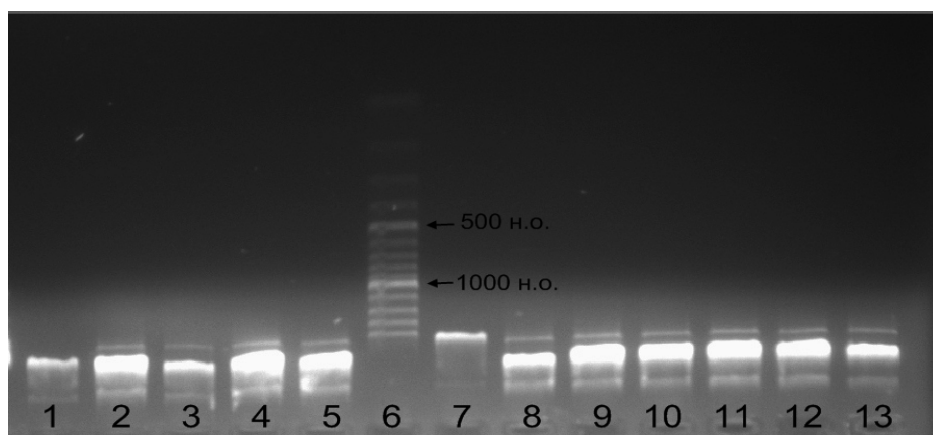


Рис. 2 Электрофореграмма полученных плазмид

1,7 – контрольные плазмиды 3838 н.о. (1) и 2886 н.о. (7), 6 – маркер молекулярных масс GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), 2-5, 8-13 – исследуемые плазмиды pTZ57/gp3_mut

Анализ полученных первичных нуклеотидных последовательностей плазмид показал отсутствие замены 1372 нуклеотида в клонированном гене у 6 из 10 исследованных клонов. Соотношение числа клонов с мутантной и не мутантной плазмидой для реакции № 1 составило 3:1, для реакции № 2-3:3.

Выводы. В результате работы были получены клоны мутантной плазмиды pTZ57/gp3_mut без значимой замены аденилового нуклеотида во встройке гена гликопротеина вируса бешенства.

Перспективы дальнейших исследований. Данная плаزمида может быть использована для дальнейших генно-инженерных работ по получению рекомбинантной вакцины против вируса бешенства и/или гликопротеина.

Список литературы

1. Конструирование рекомбинантной плазмиды pTZ57/gp со вставкой гена гликопротеина вируса бешенства штамма RV-97 / А.Ю. Иовлева, Н.П. Елаткин, А.Е. Метлин, С.С. Рыбаков // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2011 – Т. 9 (в печати).
2. Dong, Q., Karen-Beth, G. S. A one-step PCR-based method for rapid and efficient site-directed fragment deletion, insertion, and substitution mutagenesis // Journal of Virol. Methods. – 2008. – Vol. 149, № 1. – P. 85-90.
3. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrooks, S. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – N.Y.: Cold Spring Harbor, 2006. – 800 p.
4. Rabies // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – 6-th ed. – Paris, 2008. – Vol. 1, Chap. 2.1.13. – P. 304-323.
5. QuickChange site-directed mutagenesis kit. Instruction manual / Stratagene. – La Jolla, CA. – 2003. – 18 p.

OBTAINING OF MUTANT PLASMID PTZ57/GP3_MUT CARRYING THE GLYCOPROTEIN GENE OF THE BITE VIRUS

Iovleva A.Yu., Elatkin N.P., Metlin A.E.

FGI “Federal Center for Animal Health” (FGI “ARRIAH”), Vladimir

By the method of site-directed mutagenesis there were obtained the clones of mutant plasmid pTZ57/gp3_mut. Given plasmid is carrying the entire glycoprotein gene of the bite virus of strain RV-97. The proper insertion was confirmed by nucleotide sequencing.