

Таким образом установлено, что ММСК, выделенные из КМ и ЖТ КРС, обеспечивают репродукцию как ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов, относящихся к различным семействам и выделенным от разных видов животных. Установлено, что в процессе пассирования повышается чувствительность ММСК к вирусу ИРТ, но снижается к вирусам РПЛ и ЕМС. Возможно, что наблюдаемое снижение чувствительности к этим вирусам связано со спонтанной дифференцировкой ММСК и накоплением матрикса во время длительного культивирования. Решение этого вопроса связано с дальнейшими исследованиями авторов.

Список литературы

1. Савченкова, И.П. Перспективы использования стволовых клеток в ветеринарии / И.П. Савченкова, М.И. Гулюкин // Ветеринария. - 2011. - № 7. - с.3-5. 2. Donofrio, G. Susceptibility of bovine mesenchymal stem cells to bovine herpesvirus 4. / S. Colleoni, C. Galli, G. Lazzari, S. Cavirani, C.F. Flammini // J Virol Methods. - 2005. -V. 127. - N.2. - P. 168-170. 3. Donofrio, G. Swine adipose stromal cells loaded with recombinant bovine herpesvirus 4 virions expressing a foreign antigen induce potent humoral immune responses in pigs / S. Taddei, V. Franceschi, A. Capocéfalo, S. Cavirani, N. Martinelli, S. Ottonello, M. Ferrari // Vaccine. - 2011. - V. 29. - N.5. - P. 867-872. 4. Методические наставления по выделению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток из тканей взрослых особей млекопитающих, изучению их свойств и признаков / И.П. Савченкова, Л.К. Эрнст, М.И. Гулюкин, Е.В. Викторова // М.: Спутник + - 2010. - 23с. - ISBN 978-5-99730926-8. 5. Savchenkova, I.P. Osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells isolated from human bone marrow and subcutaneous adipose tissue / I.P. Savchenkova, M.S. Rostovskaya, N.I. Chupikova, S.Z. Sharifulina, A.S. Terlyashin // Cell and Tissue Biology. - 2008. - V. 2. - № 6. - P. 556-571. 6. Волкова, И.М Характеристика мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота / Е.В. Викторова, И.П. Савченкова, М.И. Гулюкин //Сельскохозяйственная биология. - 2012.- № 2. в печати.

SUSCEPTIBILITY OF BOVINE MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM CATTLE BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE TO VIRUSES IN VITRO

Viktorova E.V., Shulyak A. Ph., Gulyukin M.I., Savchenkova I.P.

All-Russian State Research Institute of Experimental Veterinary named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, Russia

Cellular populations with characteristics of multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) were isolated from bovine bone marrow (BM) and adipose tissue (AT). Susceptibility of derived MMSCs to DNA - and RNA-containing viruses of various types of animals was studied.

УДК 619:616.98:578.842.1.

РОЗРОБКА ВИДОСПЕЦИФІЧНИХ ПРОМОТОРНИХ КАСЕТ ДЛЯ КЛОНУВАННЯ ГЕНІВ ВІРУСІВ ТВАРИН

Герілович А.П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Розвиток сучасних біотехнологій засобів захисту тварин дедалі більшої уваги надає розробці, впровадженню та удосконаленню методологій, пов'язаних із застосуванням рекомбінантних ДНК. Стаття присвячується розробці промоторних видоспецифічних касетних векторів придатних для отримання експресуючих векторів для прокариотичних та еукариотичних систем. Робота виконана з використанням біоінформатичних методів. Розраховані праймерні системи для отримання видоспецифічних промоторних ділянок генів ВРХ, свиней та птиці, та моделі векторних ДНК.

Одержані результати будуть використані для одержання векторних конструкцій.

Сучасний ринок біологічних препаратів характеризується значним збільшенням питомої ваги продуктів молекулярних біотехнологій. Основні обсяги молекулярно-біотехнологічних досліджень проводяться з метою створення та впровадження діагностичних і профілактичних засобів, призначених для гуманної медицини, у той час, як у сфері ветеринарної медицини цей науковий напрямок у країнах СНД лише започатковується [1, 2, 3, 4].

На сьогоднішній день запропоновано досить велику кількість біотехнологічно значущих систем експресії протеїнів для клітин людини та криси, однак, враховуючи їх видоспецифічність, ефективність цих конструкцій при застосуванні у клітинах тварин є незадовільною [5].

Для експресії в культурах клітин найчастіше використовують промоторні ділянки вірусів [6, 7], однак ці ділянки не зовсім зручні для використання, оскільки вірусні промотори інгібуються під дією α - та γ -інтерферонів [8]. Альтернативою використання вірусних промоторів є промоторні ділянки інтерферонів, які використовуються японськими фахівцями [9].

У ННЦ «ІЕКВМ» впродовж 2006-2010 рр. виконаний цикл досліджень з конструювання рекомбінантних конструкцій на основі видоспецифічних промоторів гена інтерферону курки, що стали основою для створення моно- та бікомпонентних векторних систем на основі генів вірусу хвороби Марека, експресуюча і протективна ефективність яких була доведена експериментально. У порівнянні з даними американських науковців [10, 11] зразки розробленої кандидат-вакцини завдяки згаданим промоторним областям проявили на 5-10 % вищу імуногенність у контрольному зараженні.

У зв'язку з викладеним існує необхідність у розширенні спектру експериментальних робіт щодо формування принципів та розробки молекулярних біотехнологій виробництва рекомбінантних білків та ДНК для розробки засобів захисту тварин. Тому **метою нашої роботи** було створення моделей видоспецифічних експресуючих векторних молекул.

Матеріали і методи. Для проведення досліджень з міжнародних баз даних GenBank та DDBJ завантажували нуклеотидні послідовності перспективних видоспецифічних промоторних ділянок генів цитокінів та інших генів ВРХ, свиней та курей.

Нуклеотидні послідовності аналізували за допомогою біоінформатичного програмного забезпечення щодо розташування старт-кодонів та місць ініціації реплікації інформаційної РНК (іРНК). Грунтуючись на отриманих даних були обрані перспективні ділянки для інтеграції у векторні системи. Їх аналізували щодо наявності сайтів впізнання ендонуклеазами рестрикції з метою визначення можливості конструювання векторних ДНК на їх основі найбільш поширених полілінкерних систем. Окрім того, визначали структуру їх консервативних та варіабельних мотивів, прогнозовані ймовірні мутаційні зміни. Обрані для клонування цільові ділянки перевіряли щодо видоспецифічної відповідності та ймовірної спорідненості з близькими філогенетично видами. Ці маніпуляції проводили за допомогою *on-line* програм та алгоритмів множинних вирівнювань.

Обрані перспективні області з рестрикційною толерантністю, високою специфічністю, значним експресуючим потенціалом були застосовані для обчислення праймерних послідовностей для їх клонування у полілінкерні сайти експресуючих плазмідних векторних систем.

Конструювання систем праймерів для клонування перспективних промоторних ділянок ВРХ, свиней та курей.

На основі отриманих на попередньому етапі даних провели дизайн праймерів для клонування із залученням спеціалізованого програмного забезпечення (AmplifyX, BioEdit). При цьому цільові промоторні послідовності були вирівняні за допомогою ClustalW-модуля. Виявлені

консервативні ділянки з урахуванням рамки зчитування будуть застосовані для праймерного дизайну. Розраховані олігонуклеотидні послідовності були проаналізовані за допомогою міжнародних баз даних GenBank, EMBL, DDBJ з метою встановлення їх специфічності за алгоритмом FASTA. На 3'-кінці розрахованих праймерів додали сайти впізнання ендонуклеаз рестрикції.

Результати досліджень. Аналіз вмісту баз даних дозволив встановити неповність зазначених послідовностей, внаслідок чого жодна з них виявилася непридатною для конструювання промоторних інсерційних елементів.

Біоінформатичний аналіз був перекладений з категорії «nucleotide» до категорії «gene», що дозволило звузити коло наших пошуків та ідентифікувати цільові фрагменти.

Так, для ВРХ найбільш придатним промоторним регіоном виявилася область гена Х колагену, для свині – гена фактору некрозу пухлин та гена MPG-протеїну, а для курки – гена Х колагену та 0-гістону. Усі зазначені гени вміщували промоторну ділянку довжиною 300-3050 п.н., мали чітко ідентифіковані зони локалізації TATA-сигналу, а також локуси ініціального кодону відкритої рамки зчитування промотору.

Аналіз відповідності ідентифікованих фрагментів гена був проведений за допомогою програми BLAST on-line. Ген Х колагену ВРХ (*Bos taurus*) має виразну гомологію промоторної ділянки (100 %) лише з послідовностями ДНК ВРХ та собаки. Остання гомологія супроводжується кількома критичними інсерціями, що зумовлює видоспецифічність обраного перспективного еукаріотичного промотору.

При пошуку його гомологу для свині (*Sus scrofa*) зазначена ділянка ідентифікована не була. Всі інші послідовності генів Х-колагену та колагенів інших субкластерів та груп не мали промоторних регіонів, внаслідок чого були обрані альтернативні гени: MPG та TNF. Зазначені послідовності добре описані та потенційно можуть експресуватися у цілому ряді хазяїноспецифічних систем.

Біоінформатичний їх аналіз показав їх кластерну однорідність між породами свиней, а також видоспецифічність (гомологія з ідентичними генами інших ссавців знаходилась на рівні 40-63 %).

При доборі промоторних областей для розробки векторів для клонування генів птиці були проаналізовані різні гени *Gallus gallus*. Оскільки у наших попередніх дослідженнях вже був проведений комплекс робіт з генами імунологічно значимих білків, зокрема різними промоторними ділянками інтерферону, у якості таргетних були обрані гени Х-колагену та 0-гістону. Аналіз їх специфічності показав також високу (98-100) % специфічність обраних фрагментів.

За комплексною оцінкою інших критеріїв щодо потреб праймерного дизайну щодо розробки видоспецифічних промоторів обрані таргетні гени відповідали всім вимогам, тому на наступному етапі роботи ми приступили до розробки праймерів для клонування й моделювання видоспецифічних промоторних касет.

Розрахунок праймерних систем для ампліфікації та клонування промоторних областей здійснювали на основі розроблених нами принципів та з урахуванням критеріїв, сформульованих нами на підставі аналізу даних спеціальної літератури.

За біоінформатичним аналізом послідовності гена Х-колагену ВРХ нами створені праймери, які фланкували фрагмент промоторної області довжиною 192 п.н. До праймеру Bt collagen F aagccccgaattcatcttctgcaagtctca був штучно долучений сайт пізнання ендонуклеази EcoRI. Олігонуклеотид мав GC-вміст 48 % та температуру плавлення 64 °С. Антисмисловий праймер Bt collagen R ccctgtgccccgggtgagcactgcsagaagat містив сайт пізнання SmaI, мав GC-вміст 63 % та температуру плавлення 70 °С. Зазначені сайти пізнання ендонуклеаз повинні були забезпечити успішне вбудовування амплікону промоторної ділянки до полілінкерної області вектору pUC19, а змодельована векторна система отримала назву pUC19_bt_colprom@2 (рис. 1).

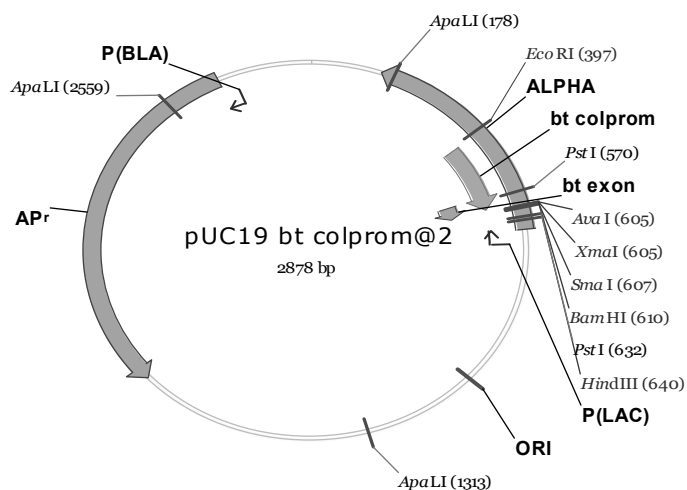


Рис. 1. Модель експресуючої касети pUC19_bt_colprom@2

Аналіз гена фактору некрозу пухлини свині дозволив ідентифікувати основні ознаки промоторної області та сконструювати праймерну систему, що фланкує ділянку довжиною 792 п.н. Смысловий праймер *Sus scrofa* TNF F gttgtggaattcaaggaagtttccgctgtg є носієм сайту рестрикції EcoRI на 5'-кінці та має GC-вміст 64 % і температуру плавлення 62 °С. Антисмысловий олігонуклеотид *Sus scrofa* TNF R gtgscgccccggggagcsgctgtgagagga містить сайт пізнання SmaI та характеризується більшим GC-вмістом (72 %), і, як наслідок, більшою температурою плавлення.

На основі теоретичного амплікону сконструйована експресуюча векторна касета pUC19_SS_TNFprom (рис. 2).

Аналіз карт генів курки (*Gallus gallus*) показав, що ген Х-колагену вміщує всі необхідні структурові мотиви для забезпечення повноцінного функціонування промоторної області.

Сконструйована модель векторної хазяїноспецифічної касети з промоторною областю гена Х-колагену курки довжиною 475 п.н. вміщувала TATA-область та 5'-кінець видоспецифічного промотору. Векторна система отримала назву pUC19_GG_collprom та базувалась на ампліконі, отриманому праймерами системи *Gallus gallus* collagen (F acacgggaattccctcggtggggcggtatg EcoRI та R ctgctgccccgggatgctaattaatca SmaI) (рис. 3).

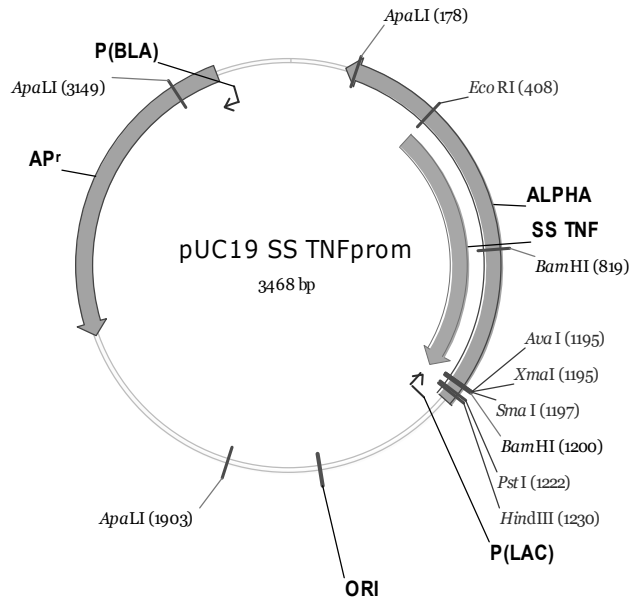


Рис. 2 Модель експресуючої касети pUC19_SS_TNFprom

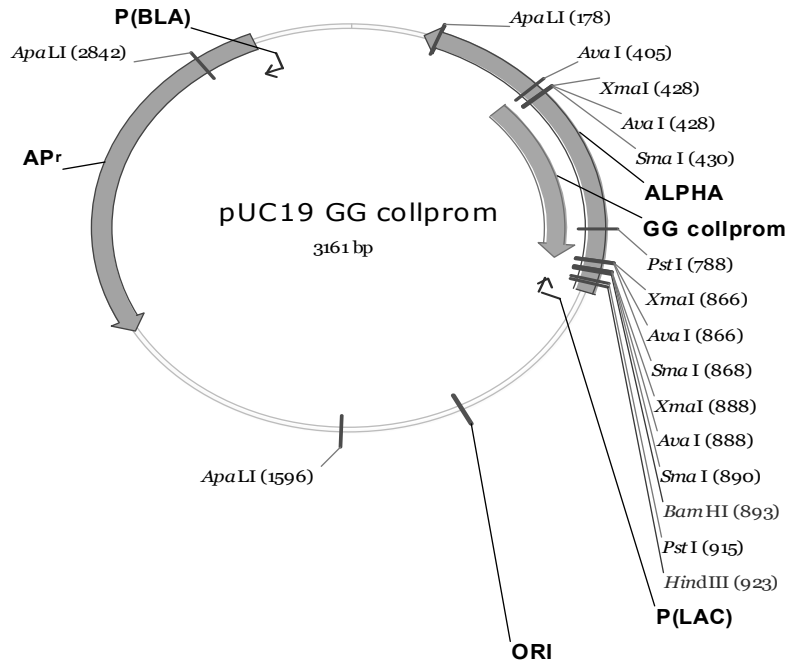


Рис. 3 Модель експресуючої касети pUC19_GG_collprom

Зазначені олігонуклеотиди мали GC-вміст на рівні 60 % та характеризувались температурою плавлення 63 °C.

Теоретичний макроаналіз праймерних систем за алгоритмом BLAST показав їх відповідність питомим матрицям та відсутність перехресних реакцій з гетерологічними ДНК та кДНК за умов дотримання режимів відпалу, які будуть розроблені у подальшій роботі.

Висновки. 1. Встановлено доцільність використання промоторних ділянок генів X-колагену ВРХ та курки, генів фактору некрозу пухлин та МРГ свині, а також 0-гістону курки в якості промоторних еукаріотичних фрагментів експресуючих векторних касет.

2. Розроблено системи праймерів Bt collagen, Sus scrofa TNF, та Gallus gallus collagen, які фланкують фрагменти видоспецифічних промоторів довжинами 192-792 п.н. та мають виразну специфічність та задовільну якість за параметрами температур плавлення і GC-вмісту.

3. На основі розроблених праймерів створені моделі експресуючих видоспецифічних векторних касет pUC19_bt_collprom@2 (*Bos taurus*), pUC19_SS_TNFprom (*Sus scrofa*), pUC19_GG_collprom (*Gallus gallus*) для клонування ДНК-фрагментів вірусів тварин і птиці.

Список літератури

1. Triche, T.J. Molecular biological aspects of soft tissue tumors [Text] / T.J. Triche // Curr. Top. Pathol. – 1995. – Vol. 89. – P. 47-72. 2. Pesavento, P.A. Molecular virology of feline calicivirus [Text] / P.A. Pesavento, K.O. Chang, J.S. Parker // Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. – 2008. – Vol. 38, № 4. – P. 775-786. 3. High-level gene cassette transcription prevents integrase expression in class 1 integrons [Text] / E. Guirin [et al.] // J. Bacteriol.

– 2011. – Vol. 193, № 20. – P. 5675-5682. 4. Щелкунов, С.Н. Клонирование генов [Текст] / С.Н. Щелкунов // Наука. – 1986. – С. 228. 5. Yokoyama, N. Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use [Text] / N. Yokoyama, K. Maeda, T. Mikami // J. Vet. Med. Sci. – 1997. – Vol. 59, № 5. – P. 311-322. 6. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate [Text] / C.H. Kweon [et al.] // Vaccine. – 1999. – Vol. 17, № 20-21. – P. 2546-2553. 7. Immunocytochemical confirmation of prion protein [Text] / J. Clinton [et al.] // Lancet. – 1990. – Vol. 336, № 8713. – P. 515. 8. Ghazizadeh, S. Repression of retrovirus-mediated transgene expression by interferons: implications for gene therapy [Text] / S. Ghazizadeh, J.M. Carroll, L.B. Taichman // J. Virol. – 1997. – Vol. 71, № 12. – P. 9163-9169. 9. Multiple shRNAs driven by U6 and CMV promoter enhances efficiency of antiviral effects against foot-and-mouth disease virus [Text] / S.M. Kim [et al.] // Antiviral. Res. – 2010. – Vol. 87, № 3. – P. 307-317. 10. High-level expression of Marek's disease virus glycoprotein C is detrimental to virus growth in vitro [Text] / B.K. Tischer [et al.] // J. Virol. – 2005. – Vol. 79, № 10. – P. 5889-5899. 11. The protein encoded by the US3 orthologue of Marek's disease virus is required for efficient de-envelopment of perinuclear virions and involved in actin stress fiber breakdown [Text] / D. Schumacher [et al.] // J. Virol. – 2005. – Vol. 79, № 7. – P. 3987-3997.

DEVELOPMENT OF SPECIES SPECIFIC PROMOTER CASSETTES FOR CLONING VIRUS GENES OF ANIMALS

Gerilovych A.P.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov

The development of modern biotechnologies of means for animal protection provides design, implementation and improvement of methodologies associated with recombinant DNA using. The paper is devoted to the development of species specific promoter cluster vectors suitable for reception of expression vectors in prokaryotic and eukaryotic systems. Work is performed using bioinformatics methods. Primer systems for species specific promoter sites of genes of cattle, pigs and poultry and models of vector DNA were calculated. The received results will be used to obtain a vector constructions.

УДК 619:616. 988: 638.4

БІОІНФОРМАТИВНА РОЗРОБКА ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ТИПУВАННЯ ЦИРКОВІРУСІВ СВИНЕЙ II ТИПУ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Герілович А.П., Рудова Н.Г.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Цирковірусна інфекція свиней поширена у більшості країн світу, де розвинене свинарство. Збудник хвороби, цирковірус свиней II типу (ЦВС-II), має декілька генотипів, визначення яких дозволяє встановити походження вірусу. У статті описані результати досліджень з біоінформатичної оцінки поліморфізму геномів ЦВС-II та розрахунку олігонуклеотидів до генотипів 2.1, 2.2 та нового генотипу 2.3. Проведені теоретичні дослідження щодо широти детекції та внутрішньовидової специфічності розроблених праймерів.

Цирковірусна інфекція свиней (ЦВІС) – це хронічна мультисистемна вірусна хвороба свиней різного віку, що супроводжується розладами імунної системи та перебігає у формі виснаження та імунопатії, клінічні ознаки яких залежать від природи супутніх інфекцій. Збудником ЦВІС є цирковірус свиней типу II (ЦВС-II), який належить до родини *Circoviridae*. Цирковіруси є ДНК-вміщуючими патогенами з одноланцюговим циркулярним геномом, не викликають ЦПД у культурах клітин, що ускладнює лабораторну діагностику ЦВІС [1].

Детекція вірусу стає можливою лише за умов виявлення антигена збудника за допомогою імуногістохімічних та імуноцитохімічних методів, або нуклеїнової кислоти за полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або гібридизації *in situ* [2].

Певні складнощі у лабораторній діагностиці цирковірусної інфекції зумовлює надзвичайний генетичний поліморфізм вірусної популяції. У доступній літературі описано декілька генетичних субліній вірусу, зокрема штами патогенного для свиней другого серотипу вірусу розподіляють на декілька генотипів: 2.1 (європейський), 2.2 (американський), а віднедавня описаний генотип 2.3 (представлений трьома ізолятами, виділеними в Китайській народній республіці) [3, 4].

У наших ранніх дослідженнях була розроблена система праймерів для серотипоспецифічної детекції ЦВС-II. Згадана розробка була покладена в основу тест-системи для виявлення ДНК цирковірусу типу II "Sui-DNA-test-PCV-2". Вона придатна для виявлення збудника, а одержуваний амплікон може бути секвенований та використаний для генотипування, натомість це потребує значних фінансових витрат та спеціалізованого обладнання, що унеможливує широке використання цієї методології [5].

У зв'язку з цим метою наших досліджень була розробка системи генотипування цирковірусів свиней за ПЛР. Першим кроком у реалізації цієї мети є розрахунок праймерів для мультиплексної індикації ЦВС-II та ідентифікації окремих його генотипів у форматі мультиплексної ПЛР.

Матеріали і методи досліджень. Робота виконана з використанням біостатистичних методів досліджень. З метою розробки олігонуклеотидів були створені локальні бази нуклеотидних послідовностей основних генів та повних геномів ЦВС-II генотипів 2.1, 2.2 та 2.3, які були отримані з GenBank-публікацій повних геномів та генів *gcr1* *gcr2*.

Їх аналіз щодо консервативності був проведений за допомогою програми BioEdit (v.7.2.4), після чого в областях консервативних мотивів з використанням AmpliX 1.5 були розраховані олігонуклеотиди за принципами видової та генотипової стабільності послідовностей та питомої специфічності до певних генетичних ліній цирковірусів.

Видо- та родоспецифічні праймери перевіряли методами локального та глобального порівняння за розробленим у ННЦ «ІЕКВМ» алгоритмом [6].

Результати досліджень. На першому етапі наших досліджень були проведені порівняльні дослідження послідовностей цирковірусу свиней II типу, отримані з бази даних GenBank. ЦВС-II генотипу 2.1 (54 послідовності) вміщували 17 консервативних ділянок, придатних для створення праймерів, 4 з яких не переміжались з консервативними ділянками інших генотипів. У межах зазначених ділянок було обрано 12 ймовірних праймерних пар, з яких за показниками генотипової специфічності та якості відібрано дві пари, котрі фланкували ділянки гена *gcr1* довжиною 233 та 440 п.н. Зважаючи на малу різницю у довжині теоретичних ампліконів, фланкованих праймерами PCV-2, для синтезу була обрана лише перша пара, яка отримала назву PCV 2-1.

Аналіз консервативних фрагментів 14 послідовностей окремих генів та повних геномів ЦВС-II генотипу 2.2 показало наявність у них 18 консервативних ділянок, з яких 6 були придатними для розробки праймерів з метою генотипоспецифічної детекції. Аналіз зазначених консервативних фрагментів дозволив охарактеризувати 17 олігонуклеотидних пар, з яких для синтезу була обрана система праймерів PCV 2.2, яка обмежувала ділянку гена *gcr2* довжиною 159 п.н. Відмінність утвореного фрагменту від