© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Мазлум Али, Жуков И.Ю., Аронова Е.В., Иголкин А.С., Власова Н.Н.

ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В ПРИСУТСТВИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ CD2v, pX69R И pE248R

ФГБУ «ВНИИЗЖ» федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, Владимирская область, г. Владимир, микрорайон Юрьевец, Россия

Введение. Африканская чума свиней (АЧС) является особо опасной геморрагической болезнью свиней, которую вызывает крупный ДНК-содержащий вирус семейсмтва *Asfaviridae)*. Поскольку нет эффективных и безопасных вакцин против АЧС, актуально изучение функций белков вируса путём анализа особенностей репликации вируса АЧС в присутствии рекомбинантных белков *in vitro.*
Цель – изучить функции и степень влияния CD2v, pE248R и pX69R на скорость и уровень репродукции вируса АЧС *in vitro* для разработки подходов к созданию вакцины против АЧС.
Материал и методы. Использовали вирус АЧС изолят Krasnodar 07/17 и штамм АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1. Гены X69R, EP402R и E248R клонировали в векторе pJET1.2/blunt в клетках *E. coli* JM-109. Локализацию рекомбинантных белков в клетках CV-1 изучали в реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием ФИТЦ-конъюгата поликлональных антител. Уровень репродукции вируса АЧС оценивали в реакции гемадсорбции и в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
Результаты. Сконструированы экспрессирующие рекомбинантные плазмиды pCI-neo/E248R, pCI-neo/EP402R и pCI-neo/X69R. Определена локализация и подтверждена специфичность полученных белков CD2v, pE248R и pX69R, для которых установлено, что они повышают уровень накопления вируса АЧС на 3–5-е сутки эксперимента на ~1,2–1,5 lgГАдЕ$_{50}$/см^3 по сравнению с отрицательным контролем.
Обсуждение. В результате анализа установлена важная роль белков CD2v, pX69R и pE248R в репродукции вируса, поскольку они влияют на её уровень. Функция белка pX69R неизвестна, однако в проведённых экспериментах определено его влияние на репродукцию вируса АЧС, проявившееся в увеличении уровня его накопления.
Заключение. Данная методология позволяет изучить характер влияния белков с неизвестной функцией на репликацию вируса АЧС.

Ключевые слова: *вирус африканской чумы свиней; рекомбинантные белки; уровень накопления вируса; репродукция вируса.*

Для цитирования: Мазлум Али, Жуков И.Ю., Аронова Е.В., Иголкин А.С., Власова Н.Н. Особенности репликации вируса африканской чумы свиней в присутствии рекомбинантных белков CD2v, pX69R и pE248R. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(4): 193-200. DOI:https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-193-200

Информация об авторах:

Мазлум Али**,** https://orcid.org/0000-0002-5982-8393
Жуков И.Ю.**,** https://orcid.org/0000-0002-3817-2129
Аронова Е.В., https://orcid.org/0000-0002-2072-6701
Иголкин А.С., https://orcid.org/0000-0002-5438-8026
Власова Н.Н., https://orcid.org/0000-0001-8707-7710

Для корреспонденции: Мазлум Али, канд. биол. наук, ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Владимирская область, г. Владимир, микрорайон Юрьевец. E-mail: ali.mazloum6@gmail.com

Mazloum Ali, Zhukov I.U., Aronova E.B., Igolkin A.S., Vlasova N.N.

ASF VIRUS REPLICATION FEATURES IN THE PRESENCE OF RECOMBINANT PROTEINS CD2v, pX69R AND pE248R

FGBI «ARRIAH» Federal State Budgetary Institution «Federal Center for Animal Health» Vladimir region, Vladimir city, Yuryevets microdistrict, 600901, Russian Federation

Introduction. African swine fever (ASF), sever hemorrhagic disease of swine caused by a large DNA virus of the *Asfaviridae* family.
Since there are no effective and safe vaccines against ASF yet, it is urgent to study the functions of its proteins, which is applicable by analyzing the features of ASF virus replication in the presence of recombinant proteins *in vitro.*
Purpose. To study the effect of ASFV recombinant proteins CD2v, pE248R and pX69R on the speed and level of reproduction of ASF virus *in vitro*. Thus, obtain the necessary knowledge to develop approaches for creating a vaccine against ASF.
Materials and methods. ASFV isolate Krasnodar 07/17 and strain ASF/ARRIAH/CV-1 were used. Cloning of X69R, EP402R, and E248R genes was performed in the pJET1.2 / blunt vector and pCI-neo in E. coli JM-109 cells, according to the manufacturer's manual. Localization of recombinant proteins in CV-1 cell line carried out by direct immunofluorescence reaction (DIF) using polyclonal antibodies conjugated to FITC.
The ASF virus reproduction level was assessed by hemadsorption reaction and qPCR kit (Central Research Institute of Epidemiology).
Results. Recombinant plasmids pCI-neo / E248R, pCI-neo / EP402R and pCI-neo / X69R were constructed.
The localization and the specificity of the obtained recombinant proteins CD2v, pE248R and pX69R was confirmed. It was established that these recombinant proteins induce the level of ASF virus reproduction on days 3-5 of the experiment by ~ 1.2-1.5 lgHADU$_{50}$/cm^3 in comparison with the negative control.
Discussion. The data obtained demonstrate the important role of CD2v, pX69R and pE248R proteins in the reproduction of the virus, since they significantly affect its level. The exact function of pX69R protein was not determined, however, in

the experiments its positive effect on ASF virus reproduction was established, manifested in an increase in its reproduction level.
Conclusion. This methodology allows us to study the nature of the effect of proteins with unknown function on ASF virus replication.

Keywords: *african swine fever virus; recombinant proteins; level of viral accumulation; virus reproduction.*

For citation: Mazloum Ali, Zhukov I.U, Aronova E.B, Igolkin A.S., Vlasova N.N. ASF virus replication features in the presence of recombinant proteins CD2v, pX69R and pE248R. *Voprosy Virusologii* (*Problems of Virology, Russian journal).* 2019; 64(4):193-200. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-193-200

For correspondence: Mazloum Ali, Ph.D, FGBI «ARRIAH» Federal State Budgetary Institution «Federal Center for Animal Health», Vladimir region, Vladimir city, Yuryevets microdistrict, 600901, Russian Federation.
E-mail: ali.mazloum6@gmail.com

Information about authors:
Mazloum Ali, https://orcid.org/0000-0002-5982-8393
Zhukov I.U, https://orcid.org/0000-0002-3817-2129
Aronova E.B, https://orcid.org/0000-0002-2072-6701
Igolkin A.S., https://orcid.org/0000-0002-5438-8026
Vlasova N.N. https://orcid.org/0000-0001-8707-7710

Acknowledgment. The study had no sponsorship.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 23 August 2019
Accepted 10 October 2019

Введение

Африканская чума свиней (АЧС) – особо опасная геморрагическая вирусная болезнь, которую вызывает крупный нуклеоцитопатический ДНК-содержащий вирус, единственный представитель семейства *Asfaviridae.*

Эпизоотология АЧС сложна и значительно варьирует по динамике и факторам распространения в зависимости от территориального расположения и уровня социально-экономического развития стран. Характер течения эпизоотии также зависит от свойств циркулирующего вируса, наличия и роли в распространении вируса векторов передачи и природных резервуаров.

До недавнего времени АЧС была в основном эндемичной в странах Африки к югу от Сахары, с очагами эпизоотий в Португалии, Испании (1957–1995 гг.) и на Сардинии (с 1978 г.). Однако с начала 2000-х годов ситуация кардинально изменилась и число стран, официально сообщивших о вспышках АЧС, возросло до 25.

В результате заноса вируса АЧС из Восточной Африки в Грузию в 2007 г. болезнь быстро распространилась по всему Кавказу и проникла на тысячи километров на северо-запад РФ [1, 2]. Дальнейшее распространение болезни привело к её появлению в 2012 г. на Украине, в 2013 г. в Беларуси и в начале 2014 г. в Литве и Польше. В этом же году вирус АЧС проник в Эстонию и Латвию, поражая как домашних, так и диких животных [3, 4].

Серьёзность нарастания угрозы АЧС подтверждается зарегистрированными спорадическими вспышками болезни в Молдове в сентябре 2016 г. [5], в Чехии и Румынии в 2017 г. [6], в Венгрии, Китае, Бельгии [7] и Монголии в 2018 г., во Вьетнаме и Лаосе в 2019 г.

Кроме того, в Африке к югу от Сахары, в Котд'Ивуаре и Кабо-Верде, были вновь зарегистрированы вспышки АЧС после более чем 15-летнего отсутствия [8].

Несмотря на предпринимаемые меры борьбы, распространение АЧС принимает глобальный характер. Поэтому необходимость создания эффективной безопасной вакцины против АЧС остаётся главной целью исследователей и способом защиты от панзоотии.

Для создания эффективной вакцины необходимо знать о структуре и функциях как протективных белков, так и белков, ответственных за вирулентность вируса АЧС и «ускользание» от иммунного ответа организма. В настоящее время реализуются различные подходы к изучению функций этих белков: от получения рекомбинантных белков и антител к ним до конструирования делеционных мутантов вируса АЧС и изучения их биологических свойств [9, 10].

Различными исследователями показано, что гены X69R, A179L, E248R, 1215L и DP96R, кодирующие белки pX69R, pA179L, pE248R, убиквитинконъюгирующий фермент E2 и UK играют важную роль в поддержании вирусной инфекционности, вирулентности возбудителя АЧС и выраженности клинических признаков болезни.

Ген EP402R кодирует белок CD2v, названный так из-за сходства с CD2 лейкоцитов свиньи [11, 12]. Транскрипция EP402R происходит на поздней стадии репликации вируса. Отсутствие фрагмента длиной 354 п.н. в EP402R не приводит к снижению скорости роста вируса *in vitro,* но нарушает способность вируса АЧС индуцировать гемадсорбцию.

Участвуя в клеточной адгезии, CD2v способствует повышению вирулентности вируса и модуляции иммунного ответа. В экспериментах на животных продемонстрирована его ведущая роль в патогенезе инфекции, тканевом тропизме, уклонении от эффекторов иммунной системы и усилении репликации вируса [13].

Ген E248R, расположенный в левой концевой вариабельной области генома вируса АЧС, кодирует белок pE248R, который имеет молекулярную массу 28 кДа.

Изучение репродукции делеционного мутанта вируса АЧС, лишённого гена E248R, показало, что белок pE248R не участвует в интернализации или адгезии вируса, а начинает функционировать после проникновения в клетку, участвуя в «раздевании» и транспортировке вируса в цитоплазме [14].

Белок pE248R необходим для образования инфекционного потомства вируса, но его репрессия не блокирует сборку вируса и на электронно-микроскопическом уровне зрелые вирионы, образовавшиеся при отсутствии этого белка, морфологически неотличимы от вирионов дикого типа. Тем не менее инфекционная активность делетированного по гену E248R вируса АЧС была по меньшей мере в 100 раз меньше, чем у вируса дикого типа [14].

Функция белка pX69R, кодируемого **геном X69R,** неизвестна, однако программа Vaxign, основанная на анализе нуклеотидных последовательностей генов, позволила позиционировать данный белок в качестве возможного компонента вакцины против АЧС [15, 16].

Цель работы – изучение функции и степени влияния вышеуказанных белков на скорость и уровень репродукции вируса АЧС *in vitro* для разработки подходов к созданию вакцины против АЧС.

Материал и методы

В качестве источника геномной ДНК использовали вирус АЧС изолят Krasnodar 07/17, выделенный в июле 2017 г. из пробы селезёнки павшей домашней свиньи (Краснодарский край).

Накопление вируса осуществляли путём последовательного пассирования в первичной культуре клеток селезёнки свиньи в течение 2–3 пассажей.

Вирусную ДНК из вируссодержащей суспензии 2-го – 3-го пассажей выделяли с помощью набора «ДНК-сорб-Б» (ООО «НекстБио», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Клонирование генов X69R, EP402R и E248R проводили в векторе pJET1.2/blunt с использованием клеток *E. coli* штамма JM-109, согласно руководству CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher) [17]. Рестрикцию и лигирование донорной плазмиды (pJET1.2) и плазмиды pCI-neo проводили, как описано J. Sambrook (2006) [18].

Для изучения локализации рекомбинантных белков pX69R, CD2v, pE248R, их накопления и исследования влияния на репродукцию вируса АЧС *in vitro*, использовали перевиваемую культуру клеток почки африканской зеленой мартышки (CV-1). Клетки CV-1 были трансфицированы плазмидами pCI-neo/X69R, pCI-neo/E248R и EP402R, согласно руководству к набору Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США). Очистку рекомбинантного белка CD2v проводили согласно методу очистки немаркированных белков из геля SDS-PAGE по протоколу R. Burgess (2009 г.) [19].

Экспрессию генов вируса АЧС, специфичность рекомбинантных белков и их локализацию в клетках CV-1 оценивали с помощью реакции прямой иммунофлюоресценции (РПИФ) с использованием ФИТЦ-конъюгата поликлональных антител к АЧС. Результаты РПИФ учитывали на люминисцентном микроскопе (Olympus, Япония).

Уровень репродукции вируса АЧС в культуре клеток оценивали в реакции гемадсорбции и с помощью тест-системы «АЧС» для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя; уровень репродукции вируса в культуре клеток определяли согласно методическим рекомендациям [20, 21].

Статистическая обработка цифровых данных, полученных в результате экспериментальных исследований, выполнена с использованием стандартных программ Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., США).

Результаты

В 2018 г. на основе изолята Krasnodar 07/17 была сконструировна клонотека, содержащая рекомбинантные плазмиды: pJET1.2-X69R со встройкой размером 1140 п.н., pJET1.2-A179L со встройкой размером 679 п.н.; pJET1.2-E248R со встройкой размером 759 п.н., pJET1.2-I215L со встройкой размером 717 п.н.; pJET1.2-DP96R со встройкой размером 404 п.н., pJET1.2-EP402R со встройкой размером 1109 п.н.; pJET1.2-O61R со встройкой размером 421 п.н. [17].

Поскольку белки pX69R, pE248R и CD2v вируса АЧС являются гликопротеинами, для получения рекомбинантных белков, не отличающихся по своим антигенным свойствам от вирусных, их синтезировали в эукариотической системе экспрессии.

С этой целью для реклонирования гена E248R провели рестрикцию ДНК рекомбинантной плазмиды клона pJET1.2-E248R и реципиентной плазмиды pCI-neo по сайтам XhoI и XbaI и переклонировали репорный ген в экспрессирующий вектор pCI-neo. Ген EP402R был реклонирован в pCI-neo по сайтам NotI и XbaI, а для гена X69R использовали сайты рестрикции EcoRI и XbaI.

Полученные клоны использовали для выделения плазмид pCI-neo/E248R, pCI-neo/EP402R и pCI-neo/X69R. Для определения наличия и размера соответствующей вставки проводили их рестрикционный анализ.

Результаты рестрикционного анализа и электрофоретического разделения в 1% агарозном геле представлены на рис. 1.

Таким образом, после рестрикции плазмиды pCI-neo/E248R по сайтам XhoI и XbaI получили 2 фрагмента: один около 5400 п.н. (соответствует размеру pCI-neo), второй – 717 п.н., что соответствует размеру гена E248R. Для плазмиды pCI-neo/EP402R после рестрикции NotI и XbaI также получили 2 фрагмента: один около 5400 п.н., второй – 1129 п.н., соответствующий размеру гена EP402R. Рестрикционный анализ pCI-neo/X69R (см. рис. 1Б) также позволил выявить 2 фрагмента: один около 5400 п.н., второй – 350 п.н., что соответствует размеру клонированного фрагмента, содержащего ген X69R (207 п.н.).

Анализ экспрессии генов вируса АЧС в клетках CV-1

Специфичность рекомбинантных белков и их локализацию в клетках CV-1 определяли с помощью РПИФ с использованием поликлонального ФИТЦ-конъюгата.

Для этого культуру клеток CV-1, трансфицированную соответствующей плазмидой, культивировали при 37 ^{0}C в CO_2 инкубаторе в течение 24 ч, фиксировали и исследовали при помощи флюоресцентной микроскопии. Анализ наличия и специфичности изучаемых рекомбинантных белков и определение их локализации представлены на рис. 2.

Результаты изучения локализации рекомбинантных белков в клетках CV-1 показали:

– в цитоплазме клеток CV-1, трансфицированных плазмидой pCI-neo/E248R, наблюдается равномерное диффузное специфическое свечение в результате взаимодействия белка pE248R и антител к АЧС, меченых ФИТЦ (см. рис. 2Б);

– в цитоплазме клеток CV-1, трансфицированных плазмидой pCI-neo/EP402R, белок CD2v распределён в цитоплазме неравномерно и локализован в непосредственной близости к клеточной мембране (см. рис. 2В);

– в цитоплазме клеток CV-1, трансфицированных плазмидой pCI-neo/X69R, белок pX69R также локализован в непосредственной близости к клеточной мембране, однако его комплексы с АЧС-ФИТЦ-антителами выявляли в виде скопления гранул разного размера (см. рис. 2Г).

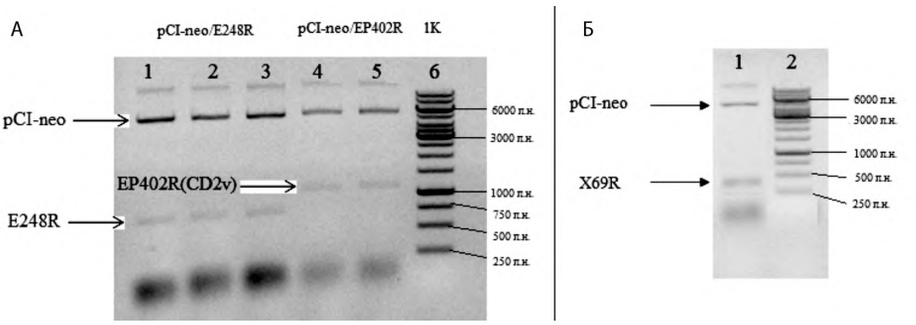

Рис. 1. Электрофореграммы продуктов рестрикции рекомбинантных плазмид pCI-neo/E248R, pCI-neo/EP402R (А) и pCI-neo/X69R (Б).

Рестрикционый анализ плазмид для определения наличия и размера встройки: А – треки 1, 2 и 3 – электрофорез pCI-neo/E248R после рестрикции; треки 4 и 5 – pCI-neo/EP402R после рестрикции; трек 6 – маркер 1к (Thermo Fisher Scientific) с линейкой фрагментов от 10 000 до 250 п.н.; Б – трек 1 – pCI-neo/X69R после рестрикции; трек 2 – маркер 1к (Thermo Fisher Scientific).

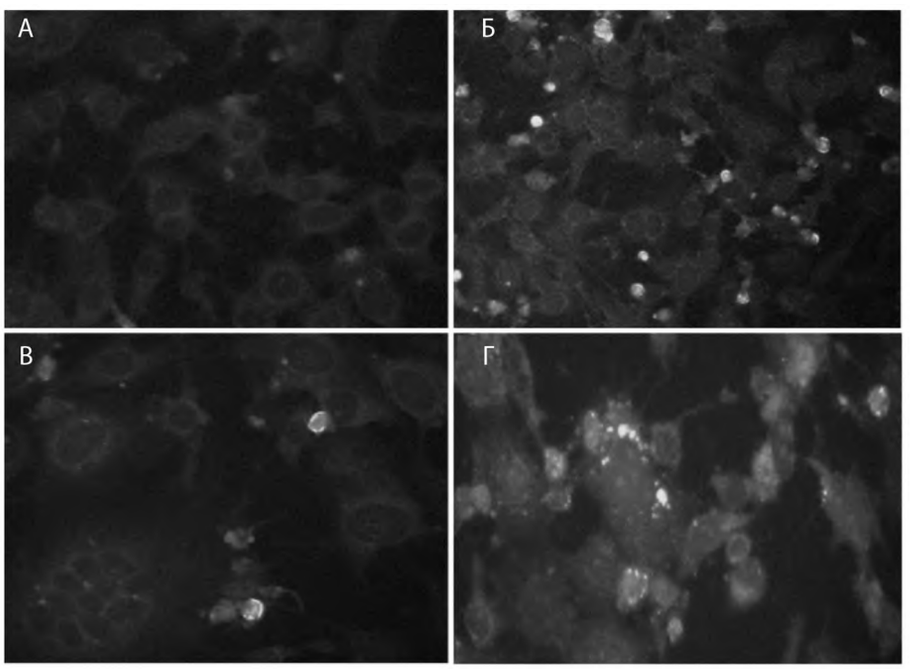

Рис. 2. Результаты реакции прямой иммунофлюоресценции – клетки CV-1 через 24 ч после трансфекции плазмидами.

А – pCI-neo без встройки – отрицательный контроль; Б – pCI-neo/E248R; В – pCI-neo/EP402R; Г – pCI-neo/X69R (ув. × 200).

Подобного специфического свечения не отмечали ни в отрицательном контроле (культура клеток CV-1, трансфицированная плазмидой pCI-neo без встройки) (см. рис. 2А), ни в ядре и/или перинуклеарной зоне трансфицированных клеток линии CV-1 (см. рис. 2).

Накопление и очистка рекомбинантного белка CD2v

Культуру клеток линии CV-1, трансфицированную плазмидами pCI-neo/EP402R и pCI-neo без встройки (отрицательный контроль), инкубировали в течение 48 ч при 37 °C. Для выявления синтеза белка и оценки уровня его накопления готовили лизат клеток.

С этой целью клетки монослоя, снятые с поверхности культуральных флаконов Т-25 с помощью трипсин-версена, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин. Осадок клеток дважды отмывали забуференным физиологическим раствором, ресуспендировали в 200 мкл раствора с ингибитором протеаз (PMSF Sigma, Германия) до концентрации 1мМ и обработали ультразвуком (6 циклов по 30 сек при 20 Мгц). Клеточный детрит осаждали центрифугированием при 12500 об/мин в течение 30 мин при +4 °C. В качестве контроля использовали осветленный лизат клеток, трансфицированных плазмидой pCI-neo без встройки.

Наличие рекомбинантного белка CD2v в осветлённом лизате трансфицированных клеток CV-1 определяли с помощью SDS-PAGE электрофореза. Результаты представлены на рис. 3.

На данной электрофореграмме в треках 2, 3, 4 и 5 с осветлённым лизатом клеток, трансфицированных плазмидой pCI-neo/EP402R, чётко регистрируется одна дополнительная мажорная полоса, соответствующая белку с молекулярной массой ~90 кДа, что совпадает с молекулярной массой вирусного белка CD2v. Аналогичная полоса отсутствует на треке 1 с осветлённым лизатом клеток, трансфицированных плазмидой pCI-neo.

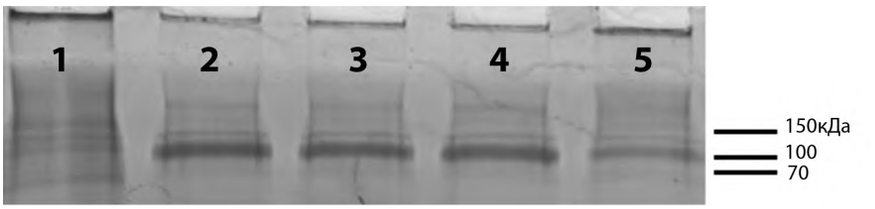

Рис. 3. Электрофореграмма лизатов клеток продуцента pCI-neo/EP402R.
Трек 1– лизат клеток продуцента pCI-neo; треки 2, 3, 4 и 5 – лизат клеток с pCI-neo/EP402R.

Далее выделяли рекомбинантный белок CD2v из ПААГ-SDS геля [19] в конечной концентрации 620 нг.

Изучение влияния рекомбинантного белка CD2v вируса АЧС на репродукцию вируса in vitro

Для определения характера влияния CD2v на репродукцию вируса АЧС *in vitro* рекомбинантный белок также вносили в культуру клеток селезёнки свиньи в дозе 50, 100, и 150 нг на культуральный флакон Т-25. Для каждой дозы проводили исследование в 4 параллелях. Для улучшения адсорбции из флаконов с клетками удаляли питательную среду и вносили полученный CD2v белок в 1 мл питательной среды без сыворотки. Далее флаконы инкубировали на шейкере при 37 С в течение 1 ч.

После инкубации в каждый флакон добавляли питательную среду до 10 мл и инфицировали культуру клеток вирусом АЧС изолята Krasnodar 07/17 в дозе 100 гемадсорбирующих единиц (ГАдЕ) на флакон (~0,01 ГАдЕ на клетку). В качестве контроля культуры использовали интактную культуру клеток, а в качестве отрицательного контроля – культуру клеток, заражённую вирусом, но с добавлением 100 нг альбумина.

Все пробы инкубировали в течение 7 сут при 37 ^{0}C, появление гемадсорбции регистрировали с помощью светового микроскопа. С 2-х по 7-е сутки из каждого флакона отбирали пробы культуральной жидкости для исследования в реакции гемадсорбции и методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Такой же метод был использован ранее при изучении влияния рекомбинантных белков p30 и p54 на репродукцию вируса АЧС *in vitro* [22].

Поскольку ПЦР-РВ применяется как количественный метод, ранее с помощью набора ФБУН «ЦНИИ» Эпидемиологии Роспотребнадзора определили минимальное количество копий генома вируса АЧС, выявляемого в образцах. Установили корреляцию между значениями порогового цикла (Ct) ПЦР-РВ, титра вируса в образцах и количества копий генома, в результате чего получили формулу для расчёта титра вируса по значению Ct, на основе которой рассчитали титр вируса в пробах [23]:

$$(\lg \text{Титр}) = \frac{1{,}655 - \lg Ct}{0{,}0988},$$

где Ct – значение порогового цикла (определяется как цикл, на котором происходит пересечение флюоресцентной кривой с пороговой линией).

Для подтверждения достоверности полученных результатов пробы, отобранные на 3, 5 и 7-е сутки, были исследованы параллельно в реакции гемадсорбции (РГАд) (см. таблицу).

По данным таблицы, увеличение титра вируса в пробах с добавлением CD2v на 0,3–1,0 lg ГАдЕ$_{50}$/см^3, определённое в РГАд, совпадает с полученными в ПЦР-РВ результатами и доказывает усиливающее влияние CD2v на репродукцию вируса АЧС *in vitro*.

Результаты эксперимента по изучению влияния разных количеств белка CD2v на уровень репродукции вируса *in vitro* также представлены на графике, построенном по данным определения титра вируса в реакции ПЦР-РВ (рис. 4).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что внесение 50 и 100 нг CD2v приводит к равнозначному эффекту в изменении уровня репродукции вируса АЧС с 3-х по 6-е сутки эксперимента, т.е. к повышению уровня накопления вируса АЧС по сравнению с отрицательным контролем (при разнице в Ct от 1,5 до 2 циклов на 3-и сутки и 1 цикл на 6-е сутки). Однако на 7-е сутки значения титров сравнялись с отрицательным контролем.

Оценка влияния концентрации вносимого рекомбинантного белка CD2v на уровень репродукции вируса африканской чумы свиней (n=4)

Количество добавленного белка, нг	Титр (lg ГАдЕ$_{50}$/см^3)					
	3-и сутки		5-е сутки		7-е сутки	
	РГАд	Рассчитанный на основе ПЦР-РВ	РГАд	Рассчитанный на основе ПЦР-РВ	РГАд	Рассчитанный на основе ПЦР-РВ
CD2v / 50	4,25±0,06	3,86±0,14	4,50±0,04	4,29±0,18	4,9±0,06	4,61±0,09
CD2v /100	4,10±0,08	3,90±0,10	4,60±0,06	4,52±0,19	5,10±0,04	4,69±0,15
CD2v / 150	4,50±0,06	4,17±0,11	5,50±0,03	5,43±0,17	6,25±0,05	6,13±0,10
Альбумин / 100	3,85±0,06	3,54±0,10	4,45±0,08	4,13±0,07	5,30±0,06	5,00±0,16

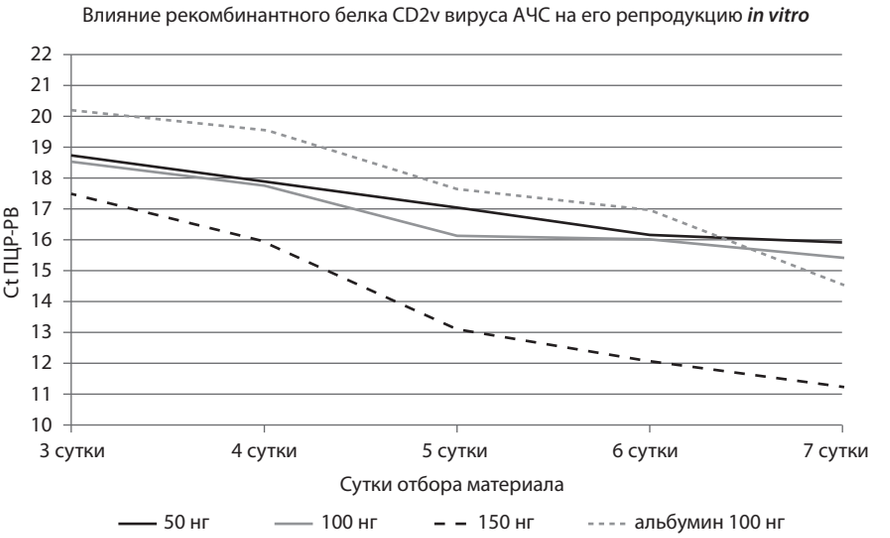

Рис. 4. График изменения уровня репродукции вируса африканской чумы свиней (АЧС) *in vitro* под воздействием белка CD2v.

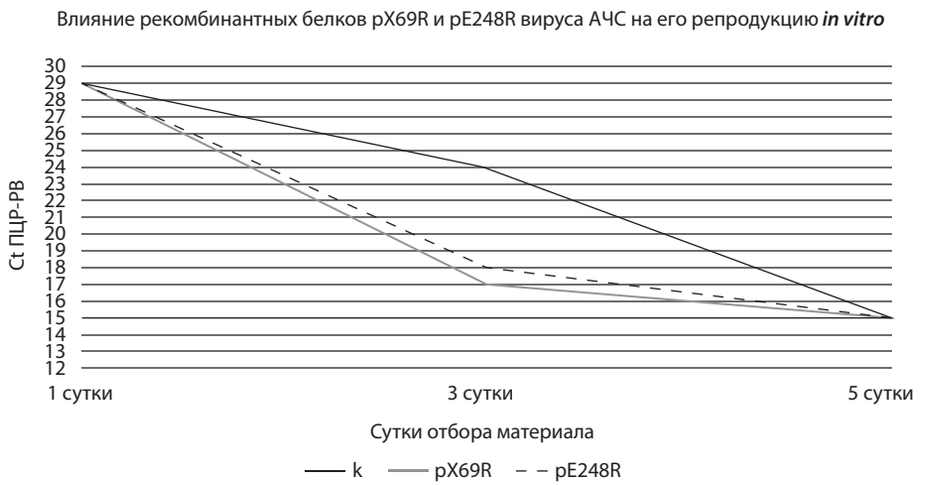

Рис. 5. График изменения уровня репродукции вируса африканской чумы свиней (АЧС) *in vitro* под воздействием белков pX69R и pE248R.

Изучение влияния рекомбинантных гликопротеинов pX69R и pE248R вируса АЧС на его репродукцию in vitro

Для индукции синтеза рекомбинантных белков pX69R и pE248R в CV-1 и определения характера их влияния на репродукцию вируса АЧС *in vitro* рекомбинантные плазмиды pCI-neo/X69R и pCI-neo/E248R использовали для трансфекции с Lipofectamine 3000 перевиваемой линии клеток CV-1. Через 24 ч культивирования для определения наличия синтеза белка пробы исследовали методом РПИФ.

После установления наличия синтеза белка культуру клеток остальных параллельных проб инфицировали вирусом АЧС штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» в дозе 100 ГАдЕ на флакон (~0,01 ГАдЕ на клетку). Использование в работе этого штамма вируса АЧС обусловлено его способностью к репродукции в перевиваемой культуре клеток CV-1 и наличием детальной характеристики его культуральных свойств [24].

В качестве отрицательного контроля использовали заражённую вирусом культуру клеток, трансфицированную плазмидой pCI-neo без встройки. Каждый опыт проводили в 6 параллелях.

Все пробы инкубировали в течение 7 сут при 37 ^{0}C, с 1-х по 7-е сутки из каждого флакона отбирали пробы культуральной жидкости для исследования с помощью метода ПЦР-РВ. Все результаты были статистически обработаны ($p < 0,05$) и представлены на рис. 5.

На рис. 5 показано, что через 1 сут после заражения значение Ct ПЦР-РВ для всех проб составило 29 (~2 lg ГАдЕ$_{50}$/см^3), а на 3-и сутки наблюдали значительную разницу уровня накопления вируса: Ct в отрицательном контроле составляло 24 цикла (~2,8 lg ГАдЕ$_{50}$/см^3), Ct в пробах с pX69R и pE248R –17 (~4,3 lg ГАдЕ$_{50}$/см^3) и 18 циклов (~4,0 lg ГАдЕ$_{50}$/см^3), соответственно. На

5-е сутки Ct ПЦР-РВ во всех пробах сравнялось и составило 15 циклов (~4,8 lg ГАдЕ$_{50}$/см^3).

Обсуждение

Полученные данные демонстрируют важную роль белков CD2v, pX69R и pE248R в репродукции вируса АЧС, но они в разной степени влияют на уровень и сроки его накопления.

Минимальные различия в значениях титра вируса АЧС на 7-е сутки могут быть связаны с тем, что рекомбинантный белок CD2v ускоряет его репродукцию, которая приводит к резкому уменьшению количества выживших клеток. В то время как в контрольных пробах происходит более медленное, постепенное нарастание титра вируса и, соответственно, уровня гибели инфицированных клеток, что приводит к снижению разницы в титрах 6–7-е сутки репродукции.

Интродукция 150 нг CD2v приводила к более выраженному различию в накоплении вируса в экспериментальных и контрольных пробах, так как с 3-х по 7-е сутки при добавлении 150 нг CD2v уровень накопления вируса был отличимо ($p < 0,05$) выше, чем в пробах с 50 и 100 нг белка, а к 7-м суткам эта разница в Ct ПЦР-РВ достигала значения 3,5 цикла, т.е. около 0, 75–1 lg ГАдЕ$_{50}$/см^3.

Исследования Rodriguez I. и соавт. (2009 г.) показали, что белок pE248R начинает функционировать непосредственно после проникновения вируса в клетку, участвуя в транспортировке вируса в цитоплазме [14]. Вследствие этого присутствие в клетках pE248R перед началом репликативного цикла инфекции, возможно, играет вспомогательную роль при транспортировке вируса в цитоплазме, что ускоряет его накопление.

Функция белка pX69R до сих пор не была определена, однако в проведённых экспериментах удалось установить его влияние на репродукцию вируса АЧС, проявившееся в существенном (~1,5 lg ГАдЕ$_{50}$/см^3 на 3-и сутки) увеличении его уровня накопления.

В данном эксперименте феномен влияния рекомбинантных белков на репродукцию вируса *in vitro*, проявившийся в увеличении титра накопления, имел непродолжительный характер, поскольку наблюдался только до 3-х суток эксперимента.

Интерпретировать полученный результат можно в нескольких вариантах:

1) синтез указанных белков происходит при экспрессии генов, встроенных в pCI-neo, но имеет непродолжительный характер (24–96 ч);

2) общеизвестно, что при репродукции в клетках вируса АЧС его белки способны выключать синтез клеточных мРНК и активировать синтез собственных мРНК, транскрибируемых с вирусного генома, т.е. при репликации вируса АЧС блокируется синтез хозяйских белков. В данном случае блокируется синтез белков, закодированных в плазмиде;

3) указанные белки могут оказывать влияние только на ранней стадии репродукции вируса АЧС (например, pE248R принимает активное участие в «раздевании» вируса и не является необходимым для дальнейших этапов его репродукции);

4) рекомбинантные белки обладают разной устойчивостью к внутриклеточным протеолитическим ферментам, поэтому могут иметь короткий период жизни (полураспада). Следовательно, белки присутствуют и действуют в короткий срок эксперимента. Когда белки разрушаются или теряют свое активность, их действие в эксперименте непродолжительно.

Заключение

Сравнительный анализ влияния рекомбинантных белков с изученной и неизвестной функцией позволяет получить дополнительные характеристики для белков и установить, в каком этапе репродукции вируса участвует каждый белок. Функция белка CD2v хорошо известна, однако сравнительный анализ локализации CD2v и белка pX69R с неизвестной функцией даёт дополнительную информацию о функциональных особенностях pX69R. Вероятно, это трансмембранный белок, необходимый для репликации вируса на ранних этапах, что было продемонстрировано в ходе сравнительного анализа результатов трансфекции клеток CV-1 плазмидными конструкциями pCI-neo/EP402R и pCI-neo/X69R.

Поскольку белок pE248R играет важную роль в «раздевании» вируса АЧС в цитоплазме клетки, его экспрессия в культуре клеток ускоряет этот процесс и, следовательно, репродукцию вируса. pX69R – неизученный белок с неизвестной функцией и локализацией, поэтому представленная работа является первой, в которой были определены локализация белка в клетках и его влияние на репродукцию вируса АЧС.

Очевидно, что использованная методология позволит выявить влияние на репликацию и других белков вируса АЧС с неизвестной функцией, что необходимо для определения основных протективных белков, а также для установления оптимальных иммунных механизмов, обусловливающих надёжную защиту от АЧС.

Таким образом, в результате проделанной работы было достоверно установлено, что рекомбинантные белки CD2v, pE248R и pX69R повышают уровень репродукции вируса АЧС на 3–5-е сутки эксперимента, причём уровень его накопления на ~1,2–1,5 lg ГАдЕ$_{50}$/см^3 выше, чем у отрицательного контроля, при $p < 0,05$ и 95% доверительном интервале.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Мазлум Али, Власова Н.Н;

лабораторное исследование – Мазлум Али, Жуков И.Ю., Аронова Е.В.;

сбор и обработка материала – Мазлум Али, Власова Н.Н.; статистическая обработка – Мазлум Али, Жуков И.Ю.; написание текста – Мазлум Али, Жуков И.Ю., Аронова Е.В., Власова Н.Н., Иголкин А.С.; редактирование – Власова Н.Н., Иголкин А.С.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1 – 8, 10 – 16, 18, 19 см. REFERENCES)

9. Болгова М.В., Балышев В.М., Пономарев В.Н., Неверовская Н.С. Паспортизация изолята «Девис» вируса африканской чумы свиней. В кн.: *Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных». Часть 1.* Покров; 2014: 43-7.
17. Мазлум А., Зиняков Н.Г., Иголкин А.С., Власова Н.Н. Клонирование генов, кодирующих трансмембранные белки и белки, ответственные за вирулентность вируса африканской чумы свиней. *Ветеринария сегодня.* 2018; (2): 3-7. Doi: https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7
20. Мазлум А., Шарыпова Д.В., Гаврилова В.Л. и др. *Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезёнки свиней.* Владимир; 2019.
21. Мазлум А. и др. *Методические рекомендации по оценке уровня репродукцию вируса африканской чумы свиней с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.* Владимир; 2019.
22. Мазлум А., Жуков И.Ю., Першин А.С., Иголкин А.С., Власова Н.Н. Влияние рекомбинантного белка p30 на репродукцию вируса африканской чумы свиней in vitro. *Ветеринария сегодня.* 2018; (3): 3-7. Doi: https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-3-26-3-7
23. Мазлум А., Власова Н.Н., Аронова Е.В., Иголкин А.С., Кривонос Р.А., Черных О.Ю. Определение корреляции показателя Ct и титра вируса африканской чумы свиней в биологических жидкостях. *Ветеринария Кубани.* 2018; 24(6): 4-7.
24. Власова Н.Н., Жуков И.Ю., Мазлум А., Шарыпова Д.В., Першин А.С., Иголкин А.С. Штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/ CV-1» вируса африканской чумы свиней, со сниженной вирулентностью для свиней, для вирусологических, диагностических, молекулярно-генетических и мониторинговых исследований. Патент РФ № 2675535; 2019.

REFERENCES

1. Garner G., Saville P., Fediavsky A., eds. African swine fever. Available at: http://lrd.spc.int/ext/Disease_Manual_Final/a120__african_swine_fever.html
2. Rowlands R.J., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., Vosloo W., et al. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(12): 1870-4. Doi: https://doi.org/10.3201/eid1412.080591
3. Gallardo C., Nieto R., Soler A., Pelayo V., Fernández-Pinero J., Markowska-Daniel I., et al. Assessment of African swine fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in Eastern European Union Countries: How to improve surveillance and control programs. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(8): 2555-65. Doi: https://doi.org/10.1128/JCM.00857-15
4. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). African swine fever virus. *EFSA J.* 2015; 13(7): 4163-92. Doi: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4163
5. World Organisation for Animal Health (OIE). African swine fever in Moldova. Immediate notification report. REF OIE: 21095. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000021095_20161004_170450.pdf_
6. OIE, 2017. World Animal Health Information Disease (WAHID). Paris, France: World Organisation of Animal Health.
7. OIE, 2018. World Animal Health Information Disease (WAHID). Paris, France: World Organisation of Animal Health.
8. World Organisation for Animal Health. African swine fever in Côte d'Ivoire. Immediate notification report. REF OIE: 15914. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000015914_20140828_131035.pdf
9. Bolgova M.V., Balyshev V.M., Ponomarev V.N., Neverovskaya N.S. Certification of the Davis isolate of the African swine fever virus. In: *Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktual'nye voprosy kontrolya infektsionnykh bolezney zhivotnykh». Chast' 1 [Materials of the International Scientific-Practical Conference «Actual Problems of Control of Animal Infectious Diseases». Part 1].* Pokrov; 2014: 43-7. (in Russian)
10. Galindo I., Hernaez B., Díaz-Gil G., Escribano J.M., Alonso C. A179L, a viral Bcl-2 homologue, targets the core Bcl-2 apoptotic machinery and its upstream BH3 activators with selective binding restrictions for Bid and Noxa. *Virology*. 2008; 375(2): 561-72. Doi: https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.050
11. Rodríguez J.M., Yáñez R.J., Almazán F., Viñuela E., Rodriguez J.F. African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *J. Virol.* 1993; 67(9): 5312-20.
12. Galindo I., Almazán F., Bustos M.J., Viñuela E., Carrascosa A.L. African swine fever virus EP153R open reading frame encodes a glycoprotein involved in the hemadsorption of infected cells. *Virology.* 2000; 266(2): 340-51. Doi: https://doi.org/10.1006/viro.1999.0080
13. Rowlands R.J., Duarte M.M., Boinas F., Hutchings G., Dixon L.K. The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, Ornithodoros erraticus. *Virology.* 2009; 393(2): 319-28. Doi: https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.040
14. Rodríguez I., Nogal M.L., Redrejo-Rodríguez M., Bustos M.J., Salas M.L. The African swine fever virus virion membrane protein pE248R is required for virus infectivity and an early postentry event. *J. Virol.* 2009; 83(23): 12290-300. Doi: https://doi.org/10.1128/JVI.01333-09
15. Xiang Z., Mobley H.L.T. Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010: 297505. Doi: https://doi.org/10.1155/2010/297505
16. Xiang Z., He Y. Genome-wide prediction of vaccine targets for humanherpes simplex viruses using Vaxign reverse vaccinology. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14(Suppl. 4): S2. Doi: https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S4-S2
17. Mazloum A., Zinyakov N.G., Igolkin A.S., Vlasova N.N. Cloning of genes encoding transmembrane proteins and proteins responsible for african swine fever virus virulence. Cloning of genes encoding transmembrane proteins and proteins responsible for african swine fever virus virulence. *Veterinariya segodnya.* 2018; (2): 3-7. Doi: https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7 (in Russian)
18. Sambrook J., Russell D.W. *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor; 2006.
19. Burgess R.R. Elution of proteins from gels. *Methods Enzymol.* 2009; 463: 565-72. Doi: https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63032-9
20. Mazlum A., Sharypova D.V., Gavrilova V.L., et al. *Guidelines for the Isolation and Titration of African Swine Fever Virus in a Culture of Pig Spleen Cells [Metodicheskie rekomendatsii po vydeleniyu i titrovaniyu virusa afrikanskoy chumy sviney v kul'ture kletok selezenki sviney].* Vladimir; 2019. (in Russian)
21. Mazlum A., et al**.** *Guidelines for Assessing the Level of Reproduction of African Swine Fever virus Using Real-Time Polymerase Chain Reaction [Metodicheskie rekomendatsii po otsenke urovnya reproduktsiyu virusa afrikanskoy chumy sviney s ispol'zovaniem polimeraznoy tsepnoy reaktsii v rezhime real'nogo vremeni]*. Vladimir; 2019. (in Russian)
22. Mazloum A., Zhukov I.Y., Pershin A.S., Igolkin A.S., Vlasova N.N. The effect of recombinant proteins p30 on African swine fever virus reproduction in vitro. *Veterinariya segodnya.* 2018; (3): 3-7. Doi: https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-3-26-3-7 (in Russian)
23. Mazlum A., Vlasova N.N., Aronova E.V., Igolkin A.S., Krivonos R.A., Chernykh O.Yu. Determination of the correlation of Ct and titer of African swine fever virus in biological fluids. *Veterinariya Kubani.* 2018; 24(6): 4-7. (in Russian)
24. Vlasova N.N., Zhukov I.Yu., Mazlum A., Sharypova D.V., Pershin A.S., Igolkin A.S. The strain «ASF / ARRIAH / CV-1» of the virus of African swine fever, with reduced virulence for pigs, for virological, diagnostic, molecular genetic and monitoring studies. Patent RF № 2675535; 2019. (in Russian)

Поступила 23.08.19

Принята в печать 10.10.19