

УДК 619:616.98:579.841.93

Г.О. Шыныбекова*,
К.К. Акылбаева, С.О. Садикалиева, К.Т. Султанкулова,
В.М. Строчков, В.Л. Зайцев, К.К. Табынов, Н.Т. Сандыбаев,
А.Р. Сансызбай

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности Казахстан,
Республика Казахстан, Жамбылская область, п.г.т. Гвардейский

*E-mail: gaukhar_1988@bk.ru

**Сравнительный генетический анализ
NS гена рекомбинантных гриппозных векторов
Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) и Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1),
экспрессирующих бруцеллезный антиген**

В данной статье представлены результаты сравнительного генетического анализа NS гена рекомбинантных гриппозных векторов Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) и Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) 1 и 6 пассажных уровней, экспрессирующие бруцеллезный рибосомальный белок L7/L12. Рекомбинантные вирусы Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) и Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) конструированы путем ко-трансфекции в культуре клеток Vero, затем адаптированы на 10-суточные развивающиеся куриные эмбрионы.

Результаты секвенирования и последующего сравнительного анализа последовательности NS генов рекомбинантных штаммов подтвердили наличие бруцеллезной вставки L7/L12. Дальнейшие исследования показали, что нуклеотидные последовательности гена NS рекомбинантных вирусов Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) и Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) 1 и 6 пассажных уровней генетически схожи между собой и степень идентичности составляет 100%, что доказывает генетическую стабильность рекомбинантных вирусных векторов в течение 6 последовательных пассажей.

Ключевые слова: рекомбинантный гриппозный вектор, бруцеллезный антиген, обратная генетика, ПЦР (полимеразная цепная реакция), секвенирование, генетическая стабильность.

G.O. Shynybekova, K.K. Akylbayeva, S.O. Sadikaliyeva,
K.T. Sultankulova, V.M. Strochkov, V.L. Zaitcev, K.K. Tabynov,
N.T. Sandybayev, A.R. Sansyzbay

**Comparative genetic analysis of NS gene recombinant influenza vectors
Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) and Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1),
expressing brucellosis antigen**

This article presents the results of a comparative genetic analysis of NS gene of recombinant influenza vectors Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) and Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) 1 and 6 of the passage levels, expressing the brucellosis ribosomal protein L7 / L12. Recombinant viruses Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) and Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) were designed by co-transfection in Vero cells culture, then were adapted by 10 per diem developing chick embryos.

The results of sequencing and subsequent Comparative analysis of NS gene sequence of recombinant strains confirmed the presence of brucellosis insertion L7/L12. Further research showed that the nucleotide sequence of the NS gene of recombinant viruses Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) and Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) 1 and 6 passage levels are genetically similar to each other and the degree of identity is 100 %, which proves the genetic stability of recombinant viral vectors for 6 consecutive passages.

Key words: recombinant viral vector, brucellosis antigen, reverse genetics, PCR (polymerase chain reaction), sequencing, genetic stability.

Г.О. Шыныбекова, К.К. Акылбаева, С.О. Садикалиева,
К.Т. Султанкулова, В.М. Строчков, В.Л. Зайцев, К.К. Табынов,
Н.Т. Сандыбаев, А.Р. Сансызбай

**Бруцеллез антигенін экспрессиялайтын
Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) және Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1)
рекомбинантты тұмау векторларының NS гендерінің
салыстырмалы генетикалық талдауы**

Мақалада L7/L12 бруцеллездың ребосомалды ақуызын экспрессиялайтын Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) және Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) рекомбинантты тұмау векторының 1 және 6 пассаж деңгейіндегі NS гендерінің салыстырмалы генетикалық талдау нәтижелері көрсетілген. Vero торша плазмидасының трансфекция әдісімен Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) және Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) рекомбинантты тұмау вирустары алынған.

Рекомбинантты штамдардың NS гендерінің нуклеотидті тізбектерін секвенирлеу және келесі салыстырмалы талдау нәтижелері L7/L12 бруцеллезді қойынды бар екендігі нақты көрсетілді. Келесі зерттеу нәтижелері Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) және Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) рекомбинантты вирустардың 1 және 6 пассаж деңгейіндегі NS гендерінің нуклеотидті тізбектері генетикалық тұрғыдан бір-бірімен ұқсас және гомологиялық жағынан 100% екенін көрсетті. 1 және 6 пассаж деңгейіндегі ұқсастығы рекомбинантты тұмау векторының 6 пассажаралығында генетикалық тұрақты екендігін көрсетеді.

Түйін сөздер: рекомбинантты тұмау векторы, бруцеллезді антиген, кері генетика, ПТР (полимеразды тізбекті реакция), секвенирлеу, генетикалық тұрақтылық.

Введение

Анализ первичной структуры геномов возбудителей опасных инфекций стал основой для многих исследований в различных направлениях от фундаментальных до чисто прикладных. Секвенирование нуклеиновых кислот является основным инструментом в изучении функций отдельных участков генов и в целом генома на молекулярном уровне. Полученные данные позволяют решать задачи по модификации участков нуклеотидных последовательностей и создания геномов с совершенно новыми функциями.

Вирусные векторы представляют собой рекомбинантные вирусы, в геном которых встроены целевые гены с набором регуляторных элементов. Среди существующих систем доставки антигенов вирусные векторы занимают особое место, поскольку обладают следующими свойствами: имеют природный механизм взаимодействия с клеткой и проникновения в нее; переносят чужеродный генетический материал в ядро клетки; способны обеспечивать длительную экспрессию антигена; вирусная оболочка защищает генетический материал, кодирующий антиген [1].

На сегодняшний день в обратной генетике используют в качестве вектора вирус гриппа [2, 3]. При конструировании гриппозных векторов мишенью является неструктурный NS белок вируса гриппа, который в ходе естественной гриппозной инфекции в больших количествах синтезируется в зараженных клетках и вызы-

вает выраженный антительный и Т-клеточный иммунный ответы [4].

Таким образом, метод обратной генетики решает задачу конструирования рекомбинантных гриппозных вакцинных штаммов, экспрессирующих протективные бруцеллезные белки, для создания векторной противобруцеллезной вакцины.

В рамках обратной генетики возможно создание жизнеспособных вирусных геномов и внесение в них целенаправленных мутаций, что уже используется для создания новых штаммов вирусов и прежде всего вакцинных.

Важнейшим направлением при разработке эффективных и безопасных вакцин против инфекционных заболеваний является создание аттенуированных рекомбинантных векторов. На основе технологии обратной генетики в Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности сконструированы модифицированные по NS гену рекомбинантные штаммы вируса гриппа, экспрессирующие бруцеллезный антиген L7/L12. Полученные рекомбинантные штаммы являются эффективными векторами для доставки бруцеллезного антигена в организм иммунизируемых животных.

Целью данной работы является сравнительный анализ химерного NS гена 1 и 6 пассажных уровней рекомбинантных вирусов гриппа Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) и Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1), экспрессирующих бруцеллезный антиген L7/L12 и оценка стабильности нуклео-

тидных последовательности при пассировании вирусного материала.

Материалы и методы

Конструирование рекомбинантного векторного вируса FLU-NS1-80-L7/L12 (H5N1), FLU-NS1-124-L7/L12 (H5N1). Синтез генетических конструкций, содержащих генетические сегменты PB2, PB1, PA, NP, M и NS вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) (ID CY033578.1) и HA, NA вакцинного штамма A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) вируса гриппа проведен в двунаправленной экспрессионной плазмиде pHW.

Для создания векторов вируса гриппа, стабильно выражающих белки бактерии бруцеллеза, были синтезированы ДНК плазмиды pHW 12AAS25C_801712g и 12AAS23C_1241712g, содержащие рекомбинантный вирусный ген белка NS1 с последовательностью L7/L12. Генетические конструкции синтезированы в Gene Art lifetechnologies, Австрия.

Рекомбинантные векторные вирусы FLU-NS1-80-L7/L12 (H5N1) и FLU-NS1-124-L7/L12 (H5N1), экспрессирующие бруцеллезный белок, были получены методом трансфекции плазмидами сертифицированных клеток Vero при помощи методики Nucleofector™, Lonza. Дефицитные по интерферону клетки Vero совместно трансфектированы с 0,5 µg/µl плазмидами, кодирующими PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M и NS гены. Трансфецированные клетки исследованы до появления цитопатического действия (ЦПД). После проявления ЦПД надосадочную жидкость центрифугировали при 300 g в течение 15 минут. Вирусный материал адаптирован на 10-суточные развивающиеся куриные эмбрионы.

В качестве объектов исследований в работе использованы 1 и 6 пассажные уровни вирусов FLU-NS1-80-L7/L12 (H5N1) и FLU-NS1-124-L7/L12 (H5N1) на 10-суточных куриных эмбрионах и вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах. Куриные эмбрионы заражали суспензией вируса в аллантоисную полость и помещали в термостат для инкубации при температуре 34°C в течение 48 ч. По окончании срока инкубации куриные эмбрионы помещали в холодильник при +4°C для охлаждения. После 12 часов охлаждения куриные эмбрионы вскрывали по общепринятой методике [5].

Выделение РНК. Выделение вирусной РНК проводили с использованием набора QIAmp Viral RNA Mini Kit, фирмы Qiagen.

Постановка ОТ-ПЦР. Продукты для секвенирования нарабатывали методом ПЦР, набором Super Script III One-Step RT-PCR with Platinum Taq Mix, фирмы Invitrogen, согласно протоколу производителя с использованием пар праймеров NS RTlen 10pmol/µl [5'-AGCAAAAGCAGGGTGACAAAG]; NS834 10pmol/µl [5'-CTCTTGCTCCACTTCAAGC].

Аmplификацию проводили на термоциклере GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystem.

Температурно-временной режим амплификации: 45°C – 60 мин, 94°C – 2 мин; затем 5 циклов 94°C – 30 секунд, 45°C – 30 секунд, 68°C – 3 мин; далее 31 циклов 94°C – 30 секунд, 5 °C – 30 секунд, 68°C – 3 минут; и 1 цикл 68°C – 10 мин.

Секвенирование. Нуклеотидную последовательность определяли при помощи прямого секвенирования ПЦР-продукта с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 фирмы Applied Biosystem на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3130 xl, Applied Biosystem.

Сравнительный генетический анализ проводили с использованием компьютерной программы «BLAST».

Результаты и их обсуждение

Для сравнительного генетического анализа NS гена использовали 1 и 6 пассажные уровни рекомбинантных вирусов в куриных эмбрионах. Рекомбинантные вирусы характеризуются наличием NS гена, содержащего вставку нуклеотидной последовательности L7/L12. Результаты ПЦР анализа на наличие бруцеллезной вставки L7/L12 в составе рекомбинантного вируса представлены на рисунке 1.

Рекомбинантные вирусы NS1-124-L7/L12, NS1-80-L7/L12 характеризуются наличием NS гена, содержащего вставку нуклеотидной последовательности L7/L12 в 80 и 124 позициях. Вследствие наличия вставки, рекомбинантные вирусы отличаются от вируса гриппа дикого типа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) наличием увеличенного размера геномного фрагмента NS, что было подтверждено результатами электрофореза в агарозном геле (рисунок 1).

Далее проводилось секвенирование для определения нуклеотидной последовательности NS гена рекомбинантных вирусов Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1), Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) 1 и 6 пассажных уровней.

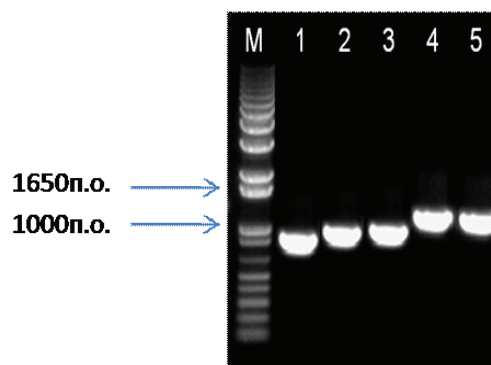
На рисунках 2 и 3 представлены нуклеотидные последовательности NS генов 1 и 6 пас-

сажных уровней рекомбинантных вирусов с конструкциями Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) и Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1).

Анализ рисунков 2 и 3 показывают, что нуклеотидные последовательности NS генов рекомбинантных вирусов с конструкциями Flu-NS1-80-L7/L12 и Flu-NS1-124-L7/L12 содержат вставку бруцеллезного белка L7/L12 в позициях 80 и 124 аминокислот, соответственно. Размер вставки L7/L12 ~ 370 п.о.

Для проверки генетической стабильности рекомбинантных вирусов проводили сравнительный анализ нуклеотидной последовательности NS генов рекомбинантных штаммов 1 и 6 пассажных уровней. Результат приведен на рисунках 4 и 5.

Нуклеотидный состав NS гена 6 пассажного уровня рекомбинантных штаммов соответствует исходному варианту рекомбинантных штаммов, т.е. 1 пассажному уровню.



М-маркер, 1kb; 1-положительный контроль, дикий штамм вируса гриппа (890 п.о.); 2-Flu-NS1-80-L7/L12 1 пассаж (~1000 п.о.); 3-Flu-NS1-80-L7/L12 6 пассаж (~1000 п.о.); 4-Flu-NS1-124-L7/L12 1 пассаж (~1100 п.о.); 5-Flu-NS1-124-L7/L12 6 пассаж (~1100 п.о.)

Рисунок 1 – Электрофореграмма NS гена, рекомбинантных штаммов, экспрессирующих бруцеллезные антигены 1 и 6 пассажных уровней

Flu – NS1 – 124 – L7/L12 (H5N1)	
1	GTGCACCTCC GAAAGTGGGG GGGAGCAAAA GCAGGGTGAC AAAGACATAA TGGATCCAAA CACTGTGTCA AGCTTTCAGG TAGATTGCTT TCTTTGGCAT CAGCTGGAGG CTTCAACCCC CCCTCGTTTT CGTCCCACTG TTCTGTGATT ACCTAGGTTT GTGACACAGT TCGAAAGTCC ATCTAACGAA AGAAACCGTA
101	GTCCGCAAAAC GAGTTGCAGA CCAAGAACTA GGTGATGCC CATTCCCTGA TCGGCTTCGC CGAGATCAGA AATCCCTAAG AGGAAGGGGC AGCACCCTCG CAGGCGTTTG CTCACGCTGT GGTTCCTGAT CCACTACGGG GTAAGGAAGT AGCCGAAGCG GCTCTAGTCT TTAGGGATTG TCCTTCCCCG TCGTGGGAGC
201	GTCTGGACAT CGAGACAGCC ACACGTGCTG GAAAGCAGAT AGTGGAGCGG ATTCTGAAAAG AAGAATCCGA TGAGGCACCT AAAATGACCA TGGCCTCTGT CAGACCTGTA GCTCTGTCGG TGTGCACGAC CTTTCGTCTA TCACCTCGCC TAAGACTTTC TTCTTAGGCT ACTCCGTGAA TTTTACTGGT ACCGGAGACA
301	ACCTGCGTCG CGTTACCTAA CTGACATGAC TCTTGAGGAA ATGTCAAGGG AGTGGTCCAT GCTCATACCC AAGCAGAAAAG TGGCAGGCC TCTTTGTATC TGGACGCAGC GCAATGGATT GACTGTACTG AGAACTCCTT TACAGTTCCC TCACCAGGTA CGAGTATGGG TTCGTCTTTC ACCGTCCGGG AGAAACATAG
401	AGAATGGACC AGGCGATCAT GGGAGGAATG GCAGATCTTG CAAAAATTGT GGAAATCTTT TCAGCACTTA CAGTGCCTGA AGCAGCAGAA CTTTCAAAAC TCTTACCTGG TCCGCTAGTA CCCTCCTTAC CGTCTAGAAC GTTTTAAACA CTTTCTAGAA AGTCGTGAAT GTCACGAAC TCGTCGTCTT GAAAGTTTTC
501	TTCTTGAAGA AAAATGGGGA GTGTCAGCAG CAGCACCAGT GGCAGTTGCA GCAGCTGGTG GTGCAGCTCC AGCAGCAGCT GCAGAAAGAA AAACAGAAAT AAGAACTTCT TTTTACCCCT CACAGTCGTC GTGGTGGTCA CCGTCAAGCT CGTCGACACC CACGTCGAGG TCGTCGTGCA CGTCTTCTTT TTTGTCTTAA
601	CGATGTGGTG CTTGCAGATG GGGAGCTAA CAAAATCAAT GTGATCAAG AAGTTAGAGC ACTGACAGGA CTTGGACTTA AAGAAGCAAA AGATCTTGT GCTACACCAC GAACGTCTAC CCCCTCGATT GTTTTAGTTA CACTAGTTTC TTCAATCTCG TGACTGTCTT GAACTGTAAT TTCTTCTGTT TCTAGAACAA
701	GAAGGGGCAC CAAAAGCAGT GAAAGAAGGG GCAAGCAAG ACGAAGCAGA AAAAAATCAA GCACAAGTGG AAGCAGCAGG GGCAAAAGTG GAACTTAAAT CTTCCCGGTG GTTTTCGTCA CTTTCTTCCC CGTTCGTTTC TGCTTCGTCT TTTTATAGTT CGTGTGAGC TTCGTCGTCC CCGTTTTCAC CTTGAATTAA
801	GATAATAAGC GGCCGC CTATTATTCG CCGGCG

Рисунок 2 – Нуклеотидные последовательности NS гена рекомбинантных вирусов с конструкциями Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1).

Flu – NS1 – 80 – L7/L12 (H5N1)	
1	GTCGACCTCC GAAGTTGGGG GGGAGCAAAA GCAGGGTGAC AAAGACATAA TGGATCCAAA CACTGTGTCA AGCTTTCAGG TAGATTGCTT TCTTTGGCAT CAGCTGGAGG CTTCAACCCC CCCTCGTTTT CGTCCCACGT TTTCTGTATT ACCTAGGTTT GTGACACAGT TCGAAAAGTCC ATCTAACGAA AGAAAACCGTA
101	GTCCGCAAAAC GAGTTGCAGA CCAAGAACTA GGTGATGCCC CATTCTTGA TCGGCTTCGC CGAGATCAGA AATCCCTAAG AGGAAGGGGC AGCACCTCG CAGGCGTTTG CTCACGCTCT GGTCTTGAT CCACTACGGG GTAAGGAAC AGCCGAAGCG GCTCTAGTCT TTAGGGATTC TCCTTCCCGC TCGTGGGAGC
201	GTCTGGACAT CGAGACAGCC ACACGTGCTG GAAAGCAGAT AGTGGAGCGG ATTCTGAAAG AAGAATCCGA TGAGGCACCT AAAATGACCG GAGGAATGGC CAGACCTGTA GCTCTGTGCG TGTGCACGAC CTTTCGTCTA TCACCTCGCC TAAGACTTTC TTCTTAGGCT ACTCCGTGAA TTTTACTGGC CTCCTTACCG
301	AGATCTTGCA AAAATTGTGG AAGATCTTTC AGCACTTACA GTGCTTGAAG CAGCAGAACT TCAAAACTT CTGGAAGAAA AATGGGGAGT GTCAGCAGCA TCTAGAACGT TTTTAACACC TTCTAGAAA TCGTGAATGT CACGAACCTC GTGCTCTTGA AAGTTTTGAA GAACCTCTTT TTACCCCTCA CAGTCGTCGT
401	GCACCACTGG CAGTTGCAGC AGCTGGTGGT GCAGCTCCAG CAGCAGCTGC AGAAGAAAAA ACAGAATTGC ATGTGGTGCT TGCAGATGGG GGAGCTAACA CGTGGTCACC GTCAACGTCG TCGACCAACA CGTCGAGGTC GTGCTGACG TCTTCTTTTT TGTCTTAAGC TACACCACGA ACGTCTACCC CCTCGATTGT
501	AAATCAATGT GATCAAGAA GTTAGAGCAC TGACAGGACT TGGACTTAAA GAAGCAAAAG ATCTTGTGTA AGGGGCACCA AAAGCAGTGA AAGAAGGGGC TTAGTTACA CTAGTTTCTT CAATCTCGTG ACTGTCTGA ACCTGAATT CTTCTGTTTC TAGAACAACT TCCCGTGGT TTTCTCACT TTCTTCCCGC
601	AAGCAAAAGC GAAGCAGAAA AAATCAAGC ACAACTGAAA GCAGCAGGGG CAAAAGTGA ACTTAAATGA TAATAAGCGG CCGC TTCGTTTCTG CTTCTGCTTT TTTAGTTTCG TGTGACCTT CGTCGTCCCC GTTTTCACT TGAATTTACT ATTATTCGCC GGCG

Рисунок 3 – Нуклеотидные последовательности NS гена рекомбинантных вирусов с конструкциями Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1).

Query	24	AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAG	83
57277	1		60
Query	84	ATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCAT	143
57277	61		120
Query	144	TCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACCCCTCGGTC	203
57277	121		180
Query	204	TGGACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAG	263
57277	181		240
Query	264	AATCCGATGAGGCACTTAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCTTACCTAACTG	323
57277	241		300
Query	324	ACATGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGAGTGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGG	383
57277	301		360
Query	384	CAGGCCCTCTTTGTATCAGAAATGGACCAGGCGATCATGGGAGGAATGGCAGATCTTGCAA	443
57277	361		420
Query	444	AAATTGTGGAAGATCTTTCAGCACTTACAGTGCTTGAAGCAGCAGAACTTTCAAAACCTC	503
57277	421		480
Query	504	TTGAAGAAAAATGGGGAGTGTcagcagcagcaccagtggtgagcttgagcagctggtggtg	563
57277	481		540
Query	564	cagctccagcagcagctgcagAAGAAAAAACAGAATTGATGTGGTGCTTGCAGATGGGG	623
57277	541		600
Query	624	GAGCTAACAAAATCAATGTGATCAAAGAAGTTAGAGCACTGACAGGACTTGGACTTAAAG	683
57277	601		660
Query	684	AAGCAAAAGATCTTGTGTAAGGGGCACCAAAAGCAGTGAAAGAAGGGGCAAGCAAAGACG	743
57277	661		720
Query	744	AAGCAGAAAAAATCAAAGCACAACTGGAAGCAGCAGGGGCAAAAGTGGAACCTTAAATGAT	803
57277	721		780
Query	804	AATAAGCGGCCGC	816
57277	781		793

Рисунок 4 – Сравнительный анализ NS гена рекомбинантных вирусов с конструкциями Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1), 1 и 6 пассаж.

Секвенирование и последующий сравнительный анализ последовательности NS генов рекомбинантных штаммов подтвердили наличие бруцеллезных вставок L7/L12 в составе выше-названных штаммов. Полученные конструкции генетически стабильны в течение 6 пассажей.

При проведении сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена NS реком-

бинантных вирусов Flu-NS1-124- L7/L12 (H5N1) 1 и 6 пассажных уровней с помощью компьютерной программы BLAST выяснилось, что они генетически идентичны и гомологичны между собой (рисунок 4, 5). Степень идентичности NS генов вирусных конструкций составляет 100%.

В результате исследований получен рекомбинантный гриппозный вакцинный штамм, эксп-

рессирующий бруцеллезные белки для создания векторной противобруцеллезной вакцины. Использование разработанной гриппозной векторной системы может служить перспективным подходом в решении задач разработки нового поколения противобруцеллезных вакцин. Эта технология вводит в геном вируса гриппа (посредством сайт-специфического мутагенеза) мутации и делеции, которые придают вирусу полезные свойства высокорепродуктивного и аттенуированного штамма, а также вставки чужеродных нуклеотидных последовательностей, кодирующие протективные белки других патогенов.

При создании вакцины против бруцеллеза немаловажную роль играет генетическая стабильность сконструированного рекомбинантного вируса [6]. С этой целью проводили секвенирование и последующий сравнительный анализ последовательности NS генов рекомбинантных штаммов, экспрессирующие бруцеллезные антигены. Результаты проведенных исследований подтвердили наличие бруцеллезных вставок L7/L12 в составе рекомбинантных штаммов Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) и Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена NS1 1 и 6 пассаж-

ных уровней рекомбинантных вирусов Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) и Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) с помощью компьютерной программы BLAST показал 100%-ую гомологичность, что доказывает генетическую стабильность рекомбинантных конструкций.

Выводы

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей NS гена рекомбинантных вирусов гриппа Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1) и Flu-NS1-124-L7/L12 (H5N1) 1 и 6 пассажных уровней показал, что они генетически идентичны между собой и гомологичны на 100%.

Результаты секвенирования и последующего сравнительного анализа последовательности NS генов рекомбинантных штаммов подтвердили наличие бруцеллезной вставки L7/L12. Полученные конструкции генетически стабильны в течение 6 пассажей.

На основании вышеизложенного, полученные рекомбинантные штаммы могут быть использованы как кандидаты векторной вакцины для формирования протективного противобруцеллезного иммунитета.

Query	24	AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGTAG	83
43985	1		60
Query	84	ATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCCAT	143
43985	61		120
Query	144	TCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACCCCTCGGTC	203
43985	121		180
Query	204	TGGACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAG	263
43985	181		240
Query	264	AATCCGATGAGGCACTTAAATGACCGGAGGAATGGCAGATCTTGCAAAATTTGTGGAAG	323
43985	241		300
Query	324	ATCTTTCAGCACTTACAGTGCTTGAAGCAGCAGAACTTTCAAACTTCTTGAAGAAAAT	383
43985	301		360
Query	384	GGGGAGTGTcagcagcagcaccagtggtgagctgagcagctggtggtgagctccagcag	443
43985	361		420
Query	444	cagctgcagAAGAAAAAACAGAAATTCGATGTGGTGCTTGAGATGGGGGAGCTAACAAAA	503
43985	421		480
Query	504	TCAATGTGATCAAAGAAGTTAGAGCACTGACAGGACTTGGACTTAAAGAAGCAAAAGATC	563
43985	481		540
Query	564	TTGTTGAAGGGGCACCAAAAGCAGTGAAAGAAGGGGCAAGCAAGACGAAGCAGAAAAAA	623
43985	541		600
Query	624	TCAAAGCACAACTGGAAGCAGCAGGGGCAAAAGTGAAGCTTAAATGATAATAAGCGGCCG	683
43985	601		660
Query	684	C	684
43985	661	.	661

Рисунок 5 – Сравнительный анализ NS гена рекомбинантных вирусов с конструкциями Flu-NS1-80-L7/L12 (H5N1), 1 и 6 пассаж.

Литература

- 1 Draper S., Heeney J. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer // *nat. rev. Microbiol.* – 2010. – V. 8. – P. 62–73.
- 2 Krug R.M., Yuan W., Noah D.L., Latham A.G. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein // *J Virology.* – 2003. – V. 309. – P. 181-9.
- 3 Карпов А., Тутыхина И., Логунов Д., Верховская Л., Шмаров М., Валихов А.Ф., Шульпин М.И., Дрыгин В.В., Народицкий Б.С. Конструирование рекомбинантных аденовирусов птиц CELo, экспрессирующих гены гликопротеинов gB, gE, gI вируса болезни Марека // *Биотехнология.* – 2007. – Т. 5. – С. 38 – 44.
- 4 Ferko B., Stasakova J., Romanova J., Kittel C., Sereinig S., Katinger H., Egorov A. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes // *J Virol.* – 2004. – V. 78. – P. 13037-13045.
- 5 Асанжанова Н.Н., Кыдырбаев Ж.К., Мамадалиев С.М., Абдураимов Е.О., Рыскельдинова Ш.Ж. Оптимизация параметров культивирования рекомбинантного штамма NIBRG-14 (H5N1) вируса гриппа на куриных эмбрионах // *Материалы международной конференции молодых ученых, посвященной 70-летию со дня рождения президента АН КазССР, академика М.А. Айтхожина.* – 2009. – С.6.
- 6 Садикалиева С.О., Тасыбаева А.С., Султанкулова К.Т., Шораева К.А., Бурашев Е.Д., Строчков В.М., Табынов К.К., Рыскельдинова Ш.Ж., Сандыбаев, Н.Т., Сансызбай А.Р. Оценка стабильности рекомбинантного вируса Flu-NS1-80 L7/L12 экспрессирующий бруцеллезный антиген // *Материалы международной научной конференции «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности».* – 2013. – С.165-172

References

- 1 Draper S., Heeney J. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer // *nat. rev. Microbiol.* – 2010. – V. 8. – P. 62–73.
- 2 Krug R.M., Yuan W., Noah D.L., Latham A.G. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein // *J Virology.* – 2003. – V. 309. – P. 181-9.
- 3 Karpov A., Tutykhina I., Logunov D., Verhovskaja L., Shmarov M., Valihov A.F., Shul'pin M.I., Drygin V.V., Narodickij B.S. Konstruirovaniye rekombinantnykh adenovirusov ptic CELo, jekspressirujushhih geny glikoproteinov gB, gE, gI virusa bolezni Mareka // *Biotechnologija.* – 2007. – T. 5. – P. 38 – 44.
- 4 Ferko V., Stasakova J., Romanova J., Kittel C., Sereinig S., Katinger H., Egorov A. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes // *J Virol.* – 2004. – V. 78. – P. 13037-13045.
- 5 Asanzhanova N.N., Kydyrbaev Zh.K., Mamadaliev S.M., Abduraimov E.O., Ryskel'dinova Sh.Zh. Optimizacija parametrov kul'tivirovaniya rekombinantnogo shtamma NIBRG-14 (N5N1) virusa grippa na kurinyh jembrionah // *Materialy mezhdunarodnoj konferencii molodyh uchenyh, posvjashhennoj 70-ti letiju so dnja rozhdenija prezidenta AN KazSSR, akademika M.A. Ajthozhina.* – 2009. – P.6.
- 6 Sadikalieva S.O., Tasybaeva A.S., Sultankulova K.T., Shoraeva K.A., Burashev E.D., Storchkov V.M., Tabynov K.K., Ryskel'dinova Sh.Zh., Sandybaev, N.T., Sansyzbaj A.R. Ocenka stabil'nosti rekombinantnogo virusa Flu-NS1-80 L7/L12 jekspressirujushhij brucelleznyj antigen // *Materialy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii «Innovacionnoe razvitie nauki v obespechenii biologicheskoy bezopasnosti».* – 2013. – P.165-172