

УДК: 578.823:619

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.3.77

РЕАКЦИЯ ДИФфуЗИОННОЙ ПРЕЦИПИТАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА VP2 ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ

Веретенников В.В.^{1*} – канд. ветеринар. наук, асс. каф. эпизоотологии им В.П. Урбана; **Румянцев А.М.**² – канд. биол. наук, науч. сотр. каф. генетики и биотехнологии; **Джавадов Э.Д.**¹ – д-р ветеринар. наук, проф. каф. эпизоотологии им В.П. Урбана; **Тарлавин Н.В.**¹ – канд. ветеринар. наук, асс. каф. эпизоотологии им В.П. Урбана; **Красков Д.А.**¹ – асп. 2-го года кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана; **Иштуганова В.В.**² – студ. каф. генетики и биотехнологии.

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет».

*vlad.veretennikov.96@mail.ru

Ключевые слова: рекомбинантный белок, вирус инфекционной бурсальной болезни, вакцина, промышленное птицеводство.

Key words: recombinant protein, infectious bursal disease virus, vaccine, industrial poultry production.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-20116, <https://rscf.ru/project/24-26-20116/> и Санкт-Петербургского научного фонда.

Поступила: 27.08.2024

Принята к публикации: 20.09.2024

Опубликована онлайн: 01.10.2024



РЕФЕРАТ

Инфекционная бурсальная болезнь (ИББ) – это высококонтагиозная, иммунодепрессивная вирусная болезнь молодняка птиц, наносящее значительный экономический ущерб птицеводческой отрасли во всем мире. Вакцинация является наиболее важной мерой борьбы с ИББ. В промышленном птицеводстве все чаще и чаще применяются векторные вакцины против данной болезни (Vaxxitek HVT + IBD, VECTORMUNE® HVT-IBD). Их особенностью является синтез белка VP2 вируса ИББ, который является главным протективным антигеном при данной болезни. К сожалению, в Российской Федерации отсутствуют отечественные наборы для определения поствакцинальных титров антител на данные вакцины, поэтому разработка отечественных серологических наборов на белок VP2 вируса ИББ является актуальным направлением исследований на сегодняшний день. Цель настоящей работы – изучить специфичность рекомбинантного белка VP2, синтезированного в бактериальной системе экспрессии, в реакции диффузионной преципитации (РДП). В результате проведенных исследований на базе ФГБОУ ВО СПбГУВМ и ФГБОУ ВО СПбГУ получены штаммы *Escherichia coli*, которые синтезируют полноразмерный белок VP2 в концентрации 90 мкг/мл. Данный белок был использован как антиген в РДП в диагностиче-

ском разведении 1:8 с положительной сывороткой кур кросса Lohmann Brown в количестве 10 шт. с титром антител на вирус ИББ в ИФА (1:10 000). Были показаны полосы преципитации в агаровом геле и установлено, что синтезированный белок VP2 является специфичным. Полученные данные свидетельствуют об эффективном использовании рекомбинантных антигенов в качестве компонентов диагностических наборов.

ВВЕДЕНИЕ /INTRODUCTION

Возбудителем инфекционной бурсальной болезни является Avibirnavirus семейства Birnaviridae, который поражает незрелые В-лимфоциты в бурсе Фабрициуса, что приводит к атрофии этого органа и, как следствие, к иммуносупрессии. Инфицированная птица становится восприимчивой к широкому спектру других вирусных и бактериальных патогенов, что вызывает высокую смертность в птицеводческих хозяйствах [1]. Важным моментом в борьбе с ИББ является выбор времени вакцинации молодых цыплят. Цыплята защищены материнскими антителами в первые 2-3 недели жизни. Преждевременное введение вакцинного штамма может нейтрализовать вирус и снизить эффективность вакцинации. Следовательно, скрининг цыплят на иммунный статус до и после вакцинации имеет большое значение, и разработка надежных тест-систем является актуальным [2].

В прошлом диагностика ИББ основывалась на исследовании специфических клинических симптомов и патологии. В настоящее время известно множество способов, используемых для определения титра антител к вирусу ИББ, таких как реакция нейтрализации (РН), реакция иммунофлюоресценции (РИФ), реакция диффузионной преципитации в агаровом геле (РДП) и иммуноферментный анализ (ИФА). РДП является специфичным методом выявления антител как к вирусу ИББ, так и к белку VP2. При помощи диагностических сывороток с использованием РДП можно определить антиген в патологическом материале. Сообщалось, что при использовании рекомбинантного белка VP2 вируса ИББ в серологических тестах получалось успешно детектировать специфические антитела [3], а другие исследователи сообщили, что чувствительность и специфичность обнаружения

специфических антител с помощью VP2 синтезированного в клетках насекомых, лучше, чем при использовании белка VP3 [4]. Поэтому целью настоящей работы было изучить специфичность рекомбинантного белка VP2, синтезированного в бактериальной системе экспрессии, в реакции диффузионной преципитации (РДП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Плазмида, штаммы бактерий и условия культивирования.

В работе использована полученная ранее плазмида pET23a-VP2, которая содержит последовательность гена оболочечного гликопротеина VP2 от эпизоотического штамма инфекционной бурсальной болезни «Синявинский» [5]. Для синтеза белков использовали штамм бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (генотип: F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+] K-12(λS) pLysS(Cam^R), Евроген, Россия).

Для культивирования бактерий использовали среду LB: 1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 170 мМ NaCl, 2.4% агар (если среда твердая). Культуры бактерий *E. coli* рутинно выращивали в термостате при температуре 37°C. При синтезе белка температуру понижали. Для индукции синтеза белка в среду добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в концентрации 0,1 мМ.

Анализ синтезируемых белков.

После культивирования клетки бактерий собирали центрифугированием (5 минут при 5000 об/мин). Среду удаляли и осадок клеток разводили в фосфатно-солевом буфере (PBS, 0,01 М, pH 7,4) в объеме, соответствующем 1/5 объема исходной культуры. Клетки разрушали с использованием ультразвука, после чего остатки клеток собирали центрифугиро-

ванием (15 минут при 10000 об/мин). Далее отбирали надосадочную жидкость, содержащую растворимые белки.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях проводили согласно общеизвестной методике [6]. Для анализа электрофореграмм и определения концентрации белков использовали программу ImageJ [7].

Реакция диффузионной преципитации.

В качестве антигена использовали лизаты бактериальных клеток, содержащие синтезированный рекомбинантный белок VP2 вируса инфекционной бурсы болезни.

Сыворотка крови. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови кур, не имеющих антител к вирусу ИББ. В качестве положительного контроля – сыворотку крови кур кросса Lohmann Brown в количестве 10 шт., полученную после вакцинации на базе ФГБОУ ВО СПбГУВМ с титром антител на вирус ИББ в ИФА (1:10 000) [1].

Материалы, необходимые для постановки реакции. Дистиллированная вода, агар «Дифко» (Becton Dickinson, США), хлористый натрий.

Постановка реакции. РДП проводили по стандартной методике [8]. Готовили агаровую среду, состоящую из 1 % агара «Дифко» и 8% раствора NaCl. Пробы с рекомбинантным белком VP2 вируса ИББ исследовали методом последовательных двукратных разведений, начиная с цельного разведения и до 1:32. Оптимальным диагностическим разведением антигена считали 1:8. Пробу испытуемой диагностической сыворотки разводили физиологическим раствором 1:2 и последовательным двукратным шагом доводили до разведения 1:32. Оптимальным диагностическим разведением положительной сыворотки считали 1:8. После заполнения лунок чашки Петри помещали в термостат при температуре +37°C. Учет результатов проводили через 48-72 ч. после постановки реакции. Агар в чашках Петри окрашивали 1 ч. в растворе Кумасси (Coomassie brilliant blue G-250 (Servicebio,

Китай), 0,5% раствор в смеси метанола, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 50:10:40) и отмывали смесью изопропилового спирта, уксусной кислоты и воды (25:10:65). Реакцию учитывали при наличии линий преципитаций между положительным антигеном и положительной сывороткой, а также отсутствием линий преципитаций между контрольным антигеном и сывороткой кур, свободных от антител к вирусу ИББ, которые были проверены на наборе ID Screen® IBD VP2 (ID.vet, Франция).

Специфичность. Аналитическую специфичность определяли тестированием сыворотки кур, не имеющих антител к вирусу ИББ (данные сыворотки были проверены методом ИФА с использованием набора ID Screen® IBD VP2).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Белок VP2 синтезировали в клетках штамма бактерий *E. coli* BL21(DE3) pLysS, содержащих плазмиду pET23a-VP2 [2]. Клеточные лизаты, содержащие растворимые белки анализировали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (Рис. 1).

Был продемонстрирован синтез нужного рекомбинантного белка VP2 размером 48 кДа. При анализе электрофореграмм за счёт сравнения с образцами контрольного белка с известной концентрацией была определена концентрация VP2 в растворе – 90 мкг/мл.

Клеточные лизаты, содержащие растворимые белки и рекомбинантный VP2 использовали в качестве антигена для постановки реакции диффузионной преципитации с положительной сывороткой в разведении 1:8 (Рис. 2) и отрицательной сывороткой крови птиц кросса Lohmann Brown в объёме 45 мкл. Дополнительно провели РДП с лизатом клеток штамма бактерий *E. coli* BL21(DE3) pLysS, не содержащих плазмиду pET23a-VP2.

За положительный результат РДП принимали образование линии преципитаций между лункой с исследуемой сывороткой и положительным антигеном в разведении. Наибольшее разведение антигена, дающее линию преципитации с гомо-

логичной сывороткой (в данном случае 1:8), являлось показателем титра антигена. Было показано, что титр антигена VP2 в РДП при синтезе в бактериальной системе экспрессии – 1:16. Данный титр антигена является высоким, так как при остром заражении птсумке Фабрициуса

редко превышал 1:16 в РДП [1]. Полос преципитации не было обнаружено и вирусом ИБВ титр антигена в при использовании лизата клеток штамма бактерий *E. coli* BL21(DE3) pLysS, не содержащих плазмиду pET23a-VP2, в качестве антигена.

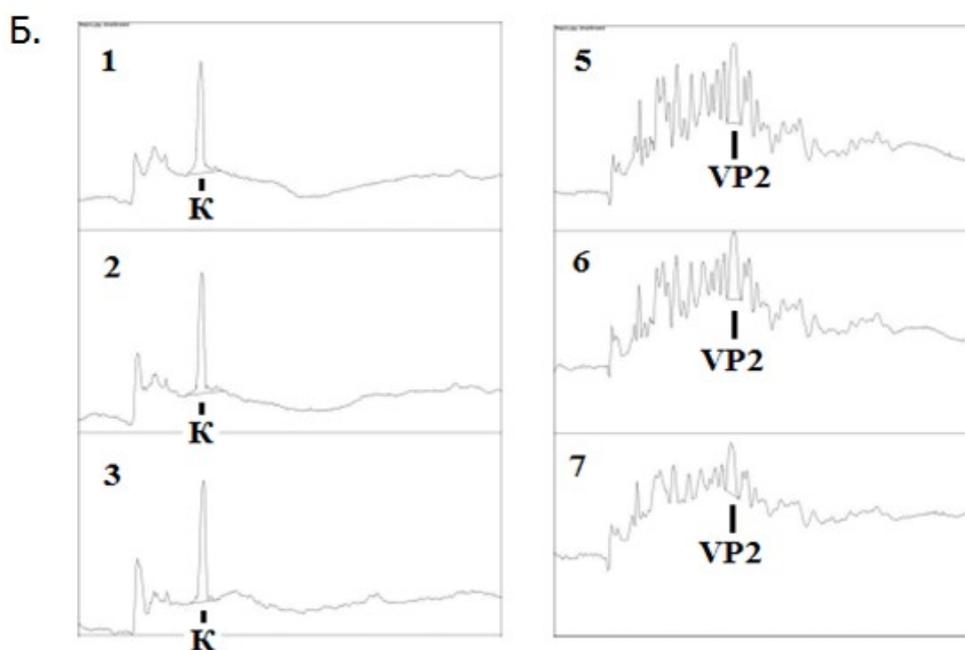
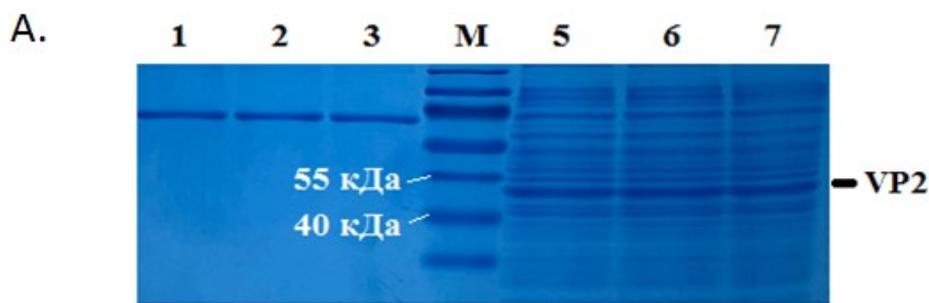


Рисунок 1 – А. Электрофореграммы 1-3) пробы контрольного белка кональбумина (78 кДа, 100 мкг/мл), 5-6) пробы клеточных лизатов, содержащие рекомбинантный белок VP2 размером (48 кДа), М – маркермолекулярного веса белков. Б. Денситограммы, полученные в результате анализа дорожек на электрофореграмме. Отмечены пики, соответствующие контрольному белку и рекомбинантному VP2. Сравнение площадей пиков в программе ImageJ позволило определить концентрацию VP2 в лизате (90 мкг/мл).

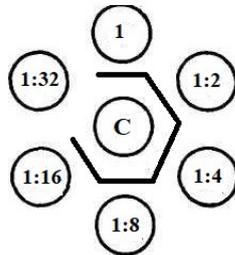
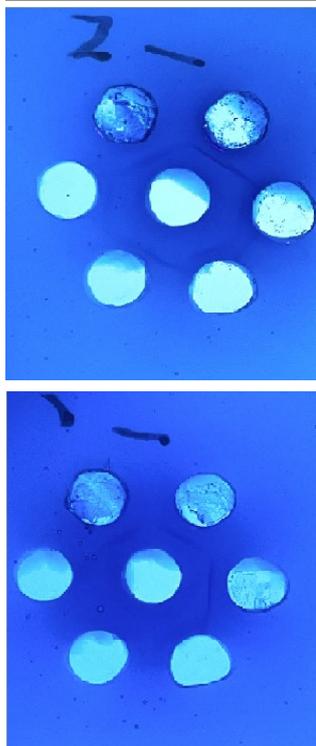


Рисунок 2 – РДП – в центре положительная сыворотка на ИББ в разведении 1:8, по бокам рекомбинантный белок VP2 в разведении с цельного до 1:32.

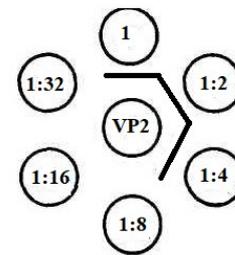


Рисунок 3. РДП – в центре рекомбинантный белок VP2 в разведении 1:8, по бокам сыворотка цыплят на 14 день после вакцинации в разведении с цельного до 1:32.

Полосы преципитации на Рисунке 2 подтверждают специфичность белка VP2 в РДП к антителам на вирус ИББ. Так как данный белок можно использовать не только для диагностики живых вакцин, но и рекомбинантных, то нами был проведен дополнительный эксперимент с вакцинацией десяти 30-дневных птиц свободных от антител к вирусу ИББ и контрольной группы. Образцы для иммунизации готовились с использованием адьюванта (гель гидроокиси алюминия 6%), антигена VP2 (титр в РДП 1:16) и изотонического раствора натрия хлорида. Иммунизацию цыплят проводили путем подкожного введения 0,3 см³.

Образцы крови собирали на 14 день после вакцинации. Антигенную активность в сыворотках оценивали по титрам антител с помощью реакции диффузионной преципитации (Рис. 3).

Из рисунка видно, что после вакцинации на 14 день средний титр антител к белку VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни у птиц составлял 1:4 в

РДП. По данным Джавадова Э.Д., цельный титр антител в реакции диффузионной преципитации является защитным при ИББ [2]. Полос преципитации не было обнаружено при использовании сывороток от контрольной группы.

ВЫВОДЫ/ CONCLUSION

На базе ФГБОУ ВО СПбГУВМ проведены опыты по использованию белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни в реакции диффузионной преципитации. Рекомбинантный белок VP2 синтезированный в *E. coli* обладает специфичностью в реакции диффузионной преципитации с куриными антителами, полученными после вакцинации против инфекционной бурсальной болезни (как после применения живой вакцины, так и рекомбинантной против ИББ). Было показано, что РДП с использованием диагностической сывороткой в титре 1:8 можно использовать для идентификации и подсчета концентрации рекомбинантного белка VP2. Также были получены результаты по использованию белка VP2 в разведе-

нии 1:8 в качестве антигена в реакции диффузионной преципитации. На 14 день после вакцинации птиц образцом рекомбинантной вакцины средний титр антител составил 1:4 в РДП. Все контрольные отрицательные сыворотки не образовывали полос преципитации, что также подтверждает специфичность данного белка. Важно отметить, что для РДП использовался клеточный лизат, а не очищенный рекомбинантный белок VP2, что позволяет существенно сократить затраты на производство.

Использование рекомбинантных антигенов в качестве компонентов диагностических наборов может удешевить производство наборов и, в конечном итоге, снизить затраты на ветеринарные услуги для птиц. Синтез рекомбинантных белков в *E. coli* является простой и дешевой процедурой, которая позволяет получать большое количество рекомбинантного белка за минимальное время.

DIFFUSION PRECIPITATION REACTION USING RECOMBINANT VP2 PROTEIN OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS

Veretennikov V.V.^{1*} – Candidate of Veterinarian Sciences, Assistant of the Department of Epizootology named after V.P. Urban; **Rumyantsev A.M.**² – Candidate of Biological Sciences, Researcher at the Department of Genetics and Biotechnology; **Dzhavadov E.D.**¹ – Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Epizootology named after V.P. Urban; **Tarlavin N.V.** – Candidate of Veterinarian Sciences, assistant of the Department of Epizootology named after V.P. Urban; **Kraskov D.A.**¹ – 2nd year postgraduate student of the Department of Epizootology named after V.P. Urban; **Ishtuganova V.V.**² – student at the Department of Genetics and Biotechnology.

¹ St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

² St. Petersburg State University

*vlad.veretennikov.96@mail.ru

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation Grant No. 24-26-20116, <https://rscf.ru/project/24-26-20116/> and the St. Petersburg Science Foundation.

ABSTRACT

Infectious bursal disease (IBD) is a highly contagious, immunosuppressive viral disease of young birds that causes significant economic losses to the poultry industry worldwide. Vaccination is the most important measure to control IBD. Vector vaccines against this disease (Vaxxitek HVT + IBD, VECTORMUNE® HVT-IBD) are used more and more often in industrial poultry farming. Their peculiarity is the synthesis of VP2 protein of IBD virus, which is the main protective antigen in this disease. Unfortunately, in the Russian Federation there are no domestic kits for the determination of postvaccinal antibody titers for these vaccines, so the development of domestic serologic kits for the VP2 protein of IBD virus is an urgent area of research today. The aim of the present work was to investigate the specificity of recombinant VP2 protein synthesized in a bacterial expression system in diffusion precipitation reaction (DPR). As a result of this research, *Escherichia coli* strains that synthesize full-length VP2 protein at a concentration of 90 µg/mL were obtained on the basis of FSBEI HE SPbSUVM and FSBEI HE SPbSU. This protein was used as antigen in RDP in diagnostic dilution 1:8 with positive serum of 10 Lohmann Brown cross chickens with antibody titer for IBD virus in ELISA (1:10 000). The precipitation bands in agar gel were shown and the synthesized VP2 protein was found to be specific. The data obtained indicate the effective use of recombinant antigens as components of diagnostic kits.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Веретенников, В. В. Идентификация вируса инфекционной бурсальной болезни методом диффузной преципитации / В. В. Веретенников // Материалы 73-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГАВМ,

Санкт-Петербург, 08–17 апреля 2019 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, 2019. – С. 47-48.

2. Джавадов, Э. Вирусные болезни: диагностика и профилактика / Э. Джавадов // Животноводство России. – 2015. – № S1. – С. 7-10.

3. Jackwood DJ, Henderson KS, Jackwood RJ (1996) Enzyme-linked immunosorbent assay-based detection of antibodies to antigenic subtypes of infectious bursal disease viruses of chickens. *Clin Diagn Lab Immunol* 3(4):456–463

4. Martinez-Torrecuadrada JL, Lazaro B, Rodriguez JF, Casal JI (2000) Antigenic properties and diagnostic potential of baculovirus-expressed infectious bursal disease virus proteins VPX and VP3. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:645–651.

5. Синтез рекомбинантных белков вируса инфекционной бурсальной болезни в бактериальной системе / В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин, Э. Д. Джавадов, А. М. Румянцев // Ветеринарный фармакологический вестник. – 2022. – № 4(21). – С. 22–29. – DOI 10.17238/issn2541-8203.2022.4.22.

6. А. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981.

7. B. Schneider, C., Rasband, W. & Eliceiri, K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675 (2012). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

8. Сравнение чувствительности РДП и ИФА при обнаружении антигена вируса инфекционного энцефаломиелита птиц и специфических антител к нему / А. Э. Меньщикова, В. Н. Ирза, Н. В. Беляева [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2007. – Т. 5. – С. 361-366.

REFERENCES

1. Veretennikov, V. V. Identification of in-

fectious bursal disease virus by the method of diffuse precipitation / V. V. Veretennikov // Proceedings of the 73rd International Scientific Conference of Young Scientists and Students of SPbGAVM, St. Petersburg, April 08-17, 2019. - St. Petersburg: St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, 2019. - C. 47-48.

2. Dzhavadov, E. Viral diseases: diagnosis and prevention / E. Javadov // Livestock of Russia. - 2015. - № S1. - C. 7-10.

3. Jackwood DJ, Henderson KS, Jackwood RJ (1996) Enzyme-linked immunosorbent assay-based detection of antibodies to antigenic subtypes of infectious bursal disease viruses of chickens. *Clin Diagn Lab Immunol* 3(4):456-463

4. Martinez-Torrecuadrada JL, Lazaro B, Rodriguez JF, Casal JI (2000) Antigenic properties and diagnostic potential of baculovirus-expressed infectious bursal disease virus proteins VPX and VP3. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:645-651. <https://doi.org/10.1128/cdli.7.4.645-651.2000>

5. Synthesis of recombinant proteins of infectious bursal disease virus in a bacterial system / V. V. Veretennikov, N. V. Tarlavin, E. D. Javadov, A. M. Rumyantsev // Veterinary Pharmacological Bulletin. - 2022. - No 4(21). - C. 22-29. - DOI 10.17238/issn2541-8203.2022.4.22.

6. A. Osterman L. A. Methods of Protein and Nucleic Acid Research: Electrophoresis and Ultracentrifugation (practical manual). Moscow: Nauka, 1981.

7. B. Schneider, C., Rasband, W. & Eliceiri, K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675 (2012). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

8. Comparison of sensitivity of RDP and ELISA in the detection of avian infectious encephalomyelitis virus antigen and specific antibodies to it / A. E. Mentshchikova, V. N. Irza, N. V. Belyaeva [et al.] // Proceedings of the Federal Center for Animal Health Protection. - 2007. - VOL. 5. - P. 361-366.