



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК 578.823:619

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.3.9

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА VP2 В КАЧЕСТВЕ СУБЪЕДИНИЧНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ

Джавадов Э.Д.- док. вет. н., Румянцев А.М. канд. биол. н., Веретенников В.В. –
асс. каф. эпизоотологии им В.П. Урбана, Тарлавин Н.В. - асс. каф. эпизоотологии им
В.П. Урбана (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

Ключевые слова: болезнь Гамборо, инфекционная бурсальная болезнь, рекомбинантные вакцины, дрожжи *P. pastoris*, белок VP2.

Key words: Gumboro disease, infectious bursal disease, recombinant vaccines, *P. pastoris* yeast, VP2 protein.



РЕФЕРАТ

Во всех регионах мира, производящих птицу, вирус инфекционной бурсальной болезни (ИББ) продолжает оставаться одной из главных проблем для птицеводов. Вирус вызывает у цыплят анемию и обезвоженность мышечной ткани, также кровоизлияния в мышцах голени, бедра, крыльев и груди. Наиболее характерные для данной болезни изменения наблюдаются в фабрициевой бурсе. В первые 2-4 дня после заражения птицы она увеличивается в 2-3 раза. Ее слизистая оболочка становится отечна, гиперемизирована, в ней обнаруживаются кровоизлияния и некротические участки. Летальность от этой болезни невысокая, но основной опасностью ИББ является вызываемое ей иммунодепрессивное состояние.

Последствиями иммуносупрессии, связанной с ИББ, является восприимчивость цыплят к условно-патогенным микроорганизмам, повышение восприимчивости к другим заболеваниям и снижении эффективности вакцинации против болезни Ньюкасла, болезни Марека, инфекционного бронхита и др. Вакцинация является наиболее важной мерой для борьбы с ИББ в полевых условиях. На сегодняшний день на птицефабриках широко применяются живые и инактивированные вакцины против инфекционной бурсальной болезни. За достаточно длинный период применения этих вакцин было найдено большое количество недостатков их использования, поэтому возросла актуальность рекомбинантных вакцин на основе вирусного белка VP2, которые считаются более безопасными и дешевыми.

Вакцинированные куры, у которых происходит синтез вируснейтрализующих антител к капсидному белку VP2, устойчивы к инфекционной бурсальной болезни.

Целью работы являлось произвести рекомбинантный белок VP2 и испытать его эффективность на цыплятах кросса Ломан Браун.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус инфекционной бурсальной болезни (ВИББ) вызывает тяжелую иммунодепрессию у цыплят, в основном в возрасте 3-6 недель [5], путем разрушения лимфоцитов в бурсе Фабрициуса (БФ). У цыплят, которые полностью восприимчивы к инфекции ИББ, болезнь вызывает ухудшение роста и увеличение смертности, а также иммуносупрессию, которая повышает восприимчивость к другим заболеваниям и снижает эффективность вакцинации против болезни Ньюкасла, болезни Марека, инфекционного бронхита и др. Пассивная защита цыплят от ВИББ достигается путем вакцинации родительского стада кур аттенуированной и инактивированной вакцинами против ИББ. Материнские антитела передаются потомству через желток и обеспечивают защиту цыплят в течение первых нескольких недель жизни. Но вакцинация живыми вакцинами имеет ряд недостатков, так как вакцинный штамм и патогенный вирус реплицируется и разрушает клетки иммунной системы птиц и вызывают иммуносупрессию [4]. А вакцинация инактивированными вакцинами является дорогой и требует больших трудозатрат.

С таким количеством недостатков, связанных с имеющимися в настоящее время живыми аттенуированными вакцинами против ИББ, поиск нового подхода для улучшения вакцины или создания новых вакцин является оправданным. В последние годы различные исследователи использовали рекомбинантную технологию для экспрессии структурных белков ВИББ в качестве субъединичных вакцин. VP2 был целевым белком для разработки субъединичных вакцин с использованием различных систем экспрессии.

Ген VP2 был экспрессирован в *Escherichia coli*, но продукты его экспрессии были признаны бесполезными для производства субъединичной вакцины против ВИББ [1,2]. Сообщалось, что VP2 может вызывать высокий уровень анти-VP2 антител у цыплят, но эти антитела не нейтрализовали ВИББ. [3]. Поэтому для нашего исследования мы использовали

дрожжевую систему экспрессии, а именно *Pichia pastoris*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника гена оболочечного гликопротеина VP2 использовали вирус инфекционной бурсальной болезни из штамма «52/70», который был выделен из патматериала.

Для наработки плазмид в работе использовали штамм бактерий *Escherichia coli* DH5 α (fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Ф80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17).

В работе использовали штаммы дрожжей *P. pastoris* X-33 (дикий тип).

Для экспрессии гена оболочечного гликопротеина VP2 в дрожжах был использован вектор pPICZ α A (рис. 1), Thermo Fisher Scientific, США), широко используемый при синтезе рекомбинантных белков в дрожжах *P. pastoris*.

Последовательность гена оболочечного гликопротеина VP2 была получена в ходе обратной транскрипции (ОТ) и последующей амплификации методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Обратная транскрипция проводилась с использованием набора «RevertAid™ First Strand cDNA» (Fermentas) по методике производителя. При этом использовали геноспецифичный обратный праймер (VP2-R). Полученная кДНК служила матрицей для проведения ПЦР. При этом использовали набор «Encyclo Plus PCR kit» (Евроген, Россия) с применением следующих праймеров:

VP2- EcoRI -F 5'-
AgaattcATGACAAACCTGCAAGATCA-3'

VP2- XbaI-R 5'- Atcta-
gaAATGCTCCTGCAATCTTCAG -3'

Праймеры содержали сайты рестрикции: EcoRI и XbaI.

Использовали следующие параметры ПЦР: 95°C – 3 минуты, а затем 30 циклов: 95°C - 30 с, 53°C - 30 с, 72°C - 90 с. ПЦР-продукт, кодирующий ген оболочечного гликопротеина VP2, был очищен методом выделения из агарозного геля с помощью набора «Eurogen Cleanup standart kit» (Евроген, Россия). Очищен-

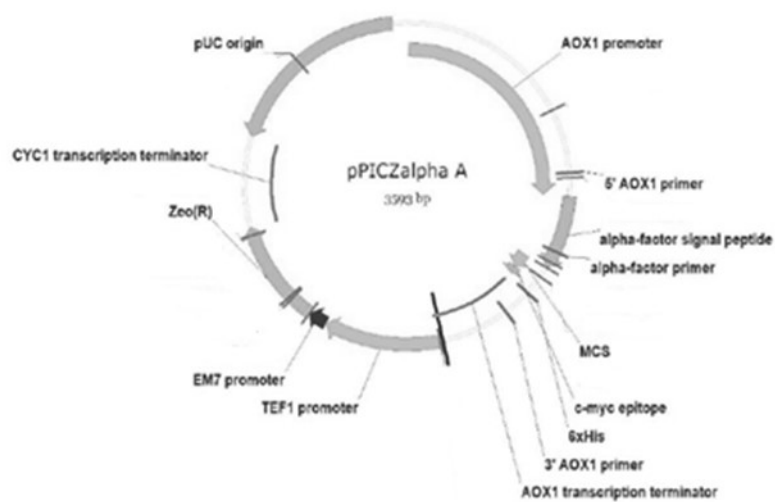


Рис. 1. Карта вектора pPICZα A (Thermo Fisher Scientific, США): pUC origin – бактериальный ориджин репликации, ZeoR - ген устойчивости к антибиотикам зеоцину, AOX1 promoter - промотора гена алкогольоксидазы дрожжей *P. pastoris* AOX1.



Рис. 2. Вакцинация цыплят подкожным методом

ный ПЦР-продукт лигировали с линейризованной плазмидой pAL2-T по методике, предложенной фирмой производителем набора Quick-TA kit (Евроген, Россия).

В качестве адьюванта использовали 6% гидроксид алюминия (ГОА), который добавляли к жидкости, содержащей рекомбинантный белок до конечной концентрации 10% от общего объема вакцины. Полученные препарат смешивали на аппарате «Vortex» в течение 10 минут и вводили животным не ранее чем через 18 часов после приготовления.

В опытах использовали цыплят яичных кроссов «Ломанн-коричневый» (Lohmann brown) суточного возраста.

Серологические исследования проводили в ИФА с использованием набора «IDEXX». Исследования проводили на цыплятах яичного направления. Были взяты 4 группы цыплят по 10 животных в каждой группе: цыплятам 1-ой группы вводили вакцину с рекомбинантным белком VP2 в концентрации 1 мг/мл в объеме 100 мкл (0,1 см³) подкожно (рис. 2); цыплятам 2-ой группы вводили вакцину с

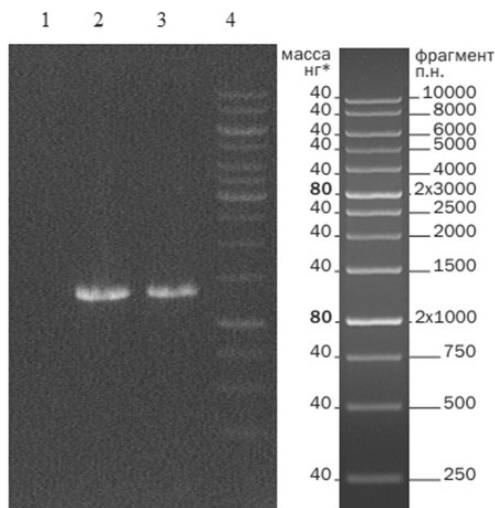


Рис. 3. Электрофореграмма результатов ПЦР-реакции с праймерами VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R. Размер полученных фрагментов соответствует теоретически ожидаемому (1339 п.н.)

Дорожка №1- отрицательный контроль
Дорожки №2- геномная ДНК штамма VP2-GS115 в качестве матрицы (клон №1)
Дорожка №3- геномная ДНК штамма VP2-GS115 в качестве матрицы (клон №2)
Дорожки №4- Ladder 1 kВ (Евроген, Россия)

рекомбинантным белком VP2 в концентрации 0,2 мг/мл в объеме 100 мкл (0,1 см³) подкожно; цыплятам 3-ой группы вводили вакцину с рекомбинантным белком VP2 в концентрации 0,04 мг/мл в объеме 100 мкл (0,1 см³) подкожно; цыплятам 4-ой группы вакцину не вводили (контрольная группа). Вакцину вводили на 14-ые сутки однократно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в вивариях на базе ФГБОУ ВО СПбГУВМ и в лаборатории кафедры генетики и биотехнологии ФГБОУ ВО СПбГУ.

Для интеграции плазмиды pPICZα-VP2 в геном дрожжей *P. pastoris* плазмиду pPICZα-VP2 линеаризовали с помощью рестриктазы PmeI. Получившимся линейным фрагментом трансформировали штамм *P. pastoris* GS115 методом элек-

тропорации. Отбор трансформантов проводился на среде YEPDS с зеоцином.

Наличие необходимой интеграции в хромосомной ДНК штамма, трансформированного плазмидой pPICZα-VP2, проверяли с помощью ПЦР с парой праймеров VP2-EcoRI-F – VP2-XbaI-R. В качестве матрицы использовали геномную ДНК полученных трансформантов. Результаты ПЦР анализа приведены на Рис. 3.

Таким образом, был получен штамм VP2-GS115 дрожжей *P. pastoris*, содержащий кассету экспрессии с геном VP2. В этой кассете кодирующая последовательность VP2 находится в единой рамке считывания с последовательностями альфа-фактора, с-трус-эпитопа и 6х гистидино-вой метки. Транскрипция этой кассеты обеспечивается за счёт работы промотора гена AOX1, индуцируемого в средах с метанолом. Добавленная к белку последовательность альфа-фактора обеспечит выделение белка клетками дрожжей в среду и будет удалена в процессе секреции. Последовательность с-трус-эпитопа позволит эффективно анализировать синтез белка с помощью Вестерн-блот гибридизации.

Для индукции синтеза рекомбинантного белка полученный штамм VP2-GS115 культивировали в среде BMGY в течение 72 часов, после чего центрифугировали и переносили клетки в среду BMMY с метанолом на 72 часа для индукции промотора AOX1. Далее среду отделяли от клеток и концентрировали. Пробы наносили на градиентный ПААГ, проводили электрофоретическое разделение белков и их перенос на нитроцеллюлозную мембрану с последующей обработкой антителами. Результаты электрофореза и вестерн-блот гибридизации приведены на Рис. 4.

Полученный штамм VP2-GS115 культивировали в среде BMGY в течение 48 часов, после чего центрифугировали и переносили клетки в среду BMMY на 72 часа для индукции промотора гена AOX1 и синтеза рекомбинантного белка. Клетки центрифугировали, после чего отбирали среду, содержащую секретированный белок. Среду концентрировали и использовали для после-

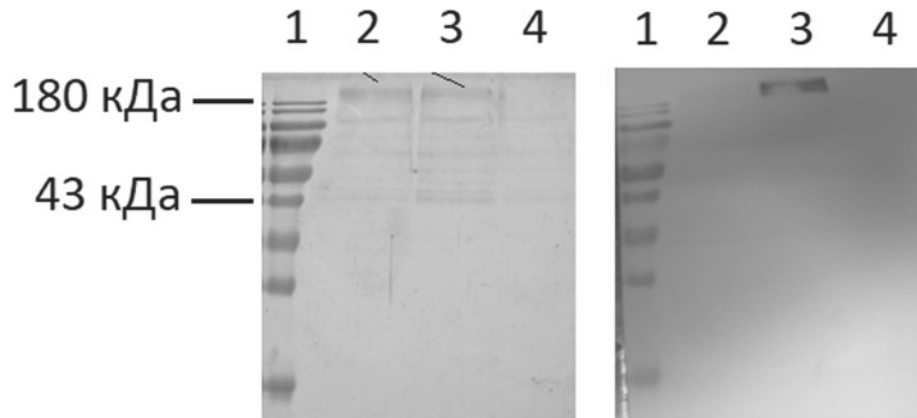


Рис. 4. Электрофореграмма (слева) и вестерн-блотинг (справа) секреторных белков. Дорожка №1- Маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Дорожка №2 - Среда от штамма VP2-GS115 выделяющего секреторный белок с VP2 с-тус эпитопом и 6xHis-меткой . Дорожка №3 Среда от штамма X-33, не синтезирующего рекомбинантных белков.

дующей иммунизации цыплят на 14 сутки.

Во всех группах сыворотку крови для выявления антител к вирусу ИББ отбирали в возрасте 1, 14 и 40 дней. Результаты можно увидеть в таблице 1.

По результатам проведенных исследований можно сказать, что иммунитет образовался только у группы №1, так как произошло увеличение титра антител при коэффициенте вариации 12,5%. В группе №2 и №3 иммунитет остался на уровне 14 дня, возможно, это связано с маленьким количеством рекомбинантного белка в вакцине. В контрольной группе титры антител почти полностью отсутствовали.

ВЫВОДЫ

В итоге проведенных исследований можно сделать вывод, что дрожжи *P. pastoris* являются хорошо отработанной системой экспрессии рекомбинантного белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни, несмотря на некоторые трудности, связанные с очисткой белка. Также, исходя из опыта на цыплятах кросса Ломан Браун можно отметить, что средний титр антител на первые сутки составлял более 5000, что свидетельствует о среднем уровне материнских антител, поэтому и титры на 14 день были не такими

высокими. Итоговые титры на 40 день показали действие вакцины только в первой группе, так они были на уровне 600, хотя в контрольной группе титры на 40 день уже опускались к 100. В дополнении стоит ответить, что в группах 2 и 3 титры были выше, чем в контрольной, но их было недостаточно, чтоб защитить птицу от ИББ, поэтому можно сделать вывод, что количество рекомбинантного белка существенно влияет на поствакцинальный иммунитет и следующие опыты нужно проводить с большими концентрациями рекомбинантного белка VP2.

Исследование выполнено при поддержке гранта ФГБОУ ВО СПбГУ М1 2020-1 «Создание нового поколения вакцинных препаратов для птиц на основе рекомбинантных антигенов и адъювантов – иммуностимуляторов»

THE USE OF RECOMBINANT PROTEIN VP2 AS A SUB-UNIT VACCINE AGAINST INFECTIOUS BURSAL DISEASE.

Dzhavadov E.D. - Doctor of veterinary sciences, **Rumyantsev A.M.** candidate of biology sciences, **Veretennikov V.V.** - Assistant of the Department of Epizootology, **N.V. Tarlavin** - Assistant of the Depart-

ment of Epizootology (St. Petersburg State University of Veterinary Medicine)
ABSTRACT

In all poultry producing regions of the world, infectious bursal disease (IBD) virus continues to be a major concern for poultry farmers. The virus causes anemic and dehydrated muscle tissue in chickens, as well as hemorrhages in the muscles of the lower leg, thigh, wings and chest. The most characteristic of this disease are observed in the fabrication bursa. In the first 2-4 days after infection of the bird, it increases 2-3 times. Its mucous membrane becomes edematous, hyperemic, hemorrhages and necrotic areas are found in it. The mortality from this disease is low, but the main danger of IBD is the immunosuppressive state it causes. The consequences of immunosuppression associated with IBD, an increase in the susceptibility of chickens to opportunistic microorganisms, an increase in susceptibility to diseases and a decrease in the effectiveness of vaccination against Newcastle disease, Marek's disease, infectious bronchitis, etc. Vaccination is the most important measure for combating IBD in the field. Today, live and inactivated vaccines against infectious bursal disease are widely used in poultry farms. A large number of disadvantages of their use have been found, therefore, the relevance of recombinant vaccines based on

the viral VP2 protein has increased, which are considered safer and cheaper.

Vaccinated chickens, in which the synthesis of virus-neutralizing antibodies to the VP2 capsid protein occurs, are resistant to infectious bursal disease.

The aim of the work was the recombinant protein VP2 and to test its effectiveness in chickens of the Lohman Brown cross.

ЛИТЕРАТУРА

1. Azad AA, Jagadish MN, Brown MA, Hudson PJ. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 1987;161:145–52
2. Azad AA, Mckern NM, Macreadie IG, Failla P, Heine HG, Chapman A, et al. Physicochemical and immunological characterization of recombinant host-protective antigen (VP2) of infectious bursal disease virus. *Vaccine* 1991;9:715–22
3. Jagadish MN, Staton VJ, Hudson PJ, Azad AA. Birnavirus precursor polyprotein is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide. *J Virol* 1988;62:1084–7
4. Kibenge FSB, Dhillon AS, Russell RG. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* 1988;69:1757–75
5. Wyeth PJ, Cullen GA. Maternally derived antibody-effect on susceptibility of chicks to infectious bursal disease. *Avian Pathol* 1976;5:253–60.