

## Створення ДНК-вакцини проти класичної чуми свиней

Я. О. Похоленко, Т. А. Рубан, О. М. Сухорада, О. М. Дерябін<sup>1</sup>,  
Т. Г. Титок, В. А. Кордюм

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

<sup>1</sup> Інститут ветеринарної медицини УААН  
Вул. Донецька, 30, Київ, 03151, Україна

iyana5000@ukr.net

---

*Розробка ДНК-вакцини проти класичної чуми свиней (КЧС) є перспективним напрямком, оскільки в цьому разі є можливим створити марковану вакцину завдяки використанню лише частини молекули протективного антигену та забезпечити ефективну індукцію як гуморальної, так і клітинної імунної відповіді. В ході проведеного дослідження створено рекомбінантну конструкцію, яка несе фрагмент гена E2 ВКЧС у складі еукаріотної експресійної касети, та показано, що із сконструйованої рекомбінантної плазмиди рTR-ВКпе<sup>+</sup> у клітинах лінії СНО-К1 експресується фрагмент білка E2 ВКЧС. Зроблено припущення, що відбувається посттрансляційна модифікація зазначеного фрагмента. Отримана ДНК-вакцина здатна індукувати продукцію специфічних до фрагмента E2 ВКЧС антитіл у мишей.*

---

*Ключові слова: вірус класичної чуми свиней (ВКЧС), ДНК-вакцина, E2 глікопротеїн ВКЧС, імунізація, гуморальна імунна відповідь.*

---

Вступ. Класична чума свиней (КЧС) — небезпечне інфекційне захворювання, віднесене до списку А Міжнародного епізоотичного бюро (Office International des Epizooties, OIE, Paris), яке спричиняє значні втрати у тваринництві багатьох країн світу. Великою проблемою є переживання вірусу КЧС у популяції диких кабанів, що є постійним потенційним джерелом інфекції.

На сьогодні існують два методи боротьби з КЧС: перший — це повна елімінація інфікованого та потенційно інфікованого поголів'я і заборона вакцинації тварин, а другий — введення інактивованих, рекомбінантних і живих вакцин, лапінізованих та отриманих у культурі клітин. І хоча обидва ці методи широко застосовують, вони мають

певні вади, серед яких стосовно першого методу слід зазначити суттєві економічні збитки, що їх завдає елімінація поголів'я. А одним із основних недоліків традиційних вакцин, які використовують для профілактики КЧС, є неможливість диференціації поствакцинального та постінфекційного імунітетів. А саме це питання є вкрай важливим, оскільки захворювання можуть спричинити слабівірулентні штами вірусу класичної чуми свиней (ВКЧС), які призводять до появи атипичних форм хвороби, до імунної толерантності та довготривалого, безсимптомного вірусоносійства і, таким чином, можуть викликати зараження ширшого кола тварин. З огляду на це надзвичайної актуальності набуває проблема розробки нових типів вакцин і діагностичних систем, за допомогою яких можна буде серологічно відрізнити вакцинованих тварин від інфікованих польовими штамми.

Одним із перспективних напрямків сучасної вакцинології є створення ДНК-вакцин, яке базується на принципово новому підході до вакцинації, коли в організм безпосередньо вводять не білковий антиген, а ДНК, яка його кодує. ДНК-вакцини відповідають основним вимогам, які висуваються регуляторними органами країн Європейського союзу до вакцин проти КЧС [1]. По-перше, оскільки до організму вводиться лише ген основного протективного антигену, то забезпечується неможливість реверсії вакцинного штаму. По-друге, спрощується виробництво та зберігання вакцин, бо немає потреби в безпосередній роботі з патогеном та підтриманні холододового ланцюга і, отже, зменшується вартість препарату та ін. Також варто зазначити, що як і в разі рекомбінантних вакцин, існує можливість створення маркованої вакцини за рахунок використання лише частини гена, що кодує цільовий антиген.

Зважаючи на це, метою нашої роботи було створення модельної ДНК-вакцини, яка несе ген протективного антигену ВКЧС, та дослідження можливості індукції гуморальної імунної відповіді у мишей при імунізації одержаною рекомбінантною конструкцією.

Матеріали і методи. Використано штами *Escherichia coli* Sure<sup>®</sup>2 (*e14* (*McrA*) $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) *171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5* (*Kan*<sup>r</sup>) *urvC* [*F'* *proAB lacI<sup>q</sup>ZAM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>*]) («Stratagene», США), BL21 (DE3) (*F dmc ompT hsdS*(*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal  $\lambda$*  (DE3)) («Stratagene»), плазмиди: *pTR-UF*, люб'язно надана С. Золотухінін (U. F. Gene Therapy Center Vector Core Lab), *pET24ap-csfc@rev*, одержана від О. Г. Дерябіної (неопубліковані дані), *pEGFP-C1* — від фірми «ClonTech» (США); ендонуклеази рестрикції, Т4-ДНК-лігазу фірми МВІ «Fermentas» (Литва). ДНК гідролізували відповідно до рекомендацій фірми-виробника. Переключування фрагментів ДНК здійснювали відповідно до методик, описаних у [2]. Клітини *E. coli* трансформували плазмідною ДНК з використанням хлористого кальцію [3]. Плазмідну ДНК для імунізації виділяли з клітин *E. coli* (штам Sure<sup>®</sup>2) методом лужного лізису з подальшою депротейнізацією фенолом і хлороформом, як описано [2].*

Експресія фрагмента *E2* ВКЧС у клітинах *BL* (DE3). Бактеріальну культуру вирощували на поживному середовищі LB («Amersham Biosciences», США) [2], яке містило канаміцин у кінцевій кон-

центрації 50 мкг/мл. Для індукції синтезу цільового продукту вносили розчин ізопропіл- $\beta$ -D-тіога-лактозиду (ІПТГ, МВІ «Fermentas») до кінцевої концентрації 1 мМ. Клітини вирощували при температурі 37 °С до оптичної густини 2,5, після чого в середовище вносили ІПТГ та продовжували культивування штаму-продуцента при цій же температурі протягом 12 год.

Електрофорез білків здійснювали за методом Лемлі та ін. [8] у 13 %-му ПААГ за присутності 1 % SDS з наступним фарбуванням розчином кумасі R-250.

Трансфекція клітин лінії *CHO-K1* (клітини яєчника китайського хом'яка). Культуру *CHO-K1* одержано з Російської колекції клітинних культур (Санкт-Петербург). Клітини цієї лінії є епітеліо-подібними за морфологією. Каріотип: 2n = 22 з можливими варіаціями в межах 16—22 хромосом. Модальне число хромосом складає 20. Кількість маркерів при диференціальному фарбуванні — 12 [4]. Клітини лінії *CHO-K1* вирощували на поживному середовищі такого складу: 90 % середовища F10 («Sigma»), 10 % ембріональної телячої сироватки («Геном», Україна), 100 Од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (Київмедпрепарат, Україна). Сироватку перед застосуванням інактивували, прогріваючи її протягом 30 хв за температури 56—60 °С. Для пересіву клітини знімали з поверхні скла 0,25 %-м розчином трипсину та 0,02 %-м розчином Версену (Біотестлабораторія, Україна) у співвідношенні 1:1 та розсівали у співвідношенні (1:4)—(1:15). Клітини культивували при температурі 37 °С в атмосфері, яка містила 5 % CO<sub>2</sub>.

Трансфекцію здійснювали хімічним методом з використанням синтетичного полімеру поліетиленіміну у розгалуженій формі з молекулярною масою 25 кДа («Aldrich», США) [5].

Контрольні клітини трансфікували плазмідною *pEGFP-C1*. Через 72 год клітини знімали з поверхні скла, осаджували центрифугуванням протягом 20 хв при 2 тис. об/хв. Супернатант видаляли, а осад клітин ресуспендували у 50 мкл буфера PBS, рН 7,4, та заморожували при температурі -20 °С.

Одержання гіперімунної сироватки свині до рекомбінантного *E2* ВКЧС. Рекомбінантний *E2* ВКЧС для імунізації отримували, як описано в [6]. Підсвинка віком 4 місяці і масою 30 кг, клінічно здорового, невакцинованого, одержаного від невакцинованої проти КЧС свиноматки імунізували двічі

з інтервалом у два тижні рекомбінантним білком E2 ВКЧС дозою 3 мг за імунізацію, внутрішньом'язово з ад'ювантом — мантонідом ISA-25 (Serpic), 20 % за об'ємом. Кров для одержання сироватки відбирали через два тижні після другої імунізації. Сироватку отримували за стандартною методикою [7].

*Визначення експресії фрагмента E2 ВКЧС у клітинах СНО-K1 методом імуноблотингу.* Імуноблотинг проводили за стандартною методикою [8]. Першими антитілами слугувала гіперімунна сироватка свині, одержана, як описано вище, в робочому розведенні 1:1000, другими — антитіла до імуноглобулінів свині («Sigma»), кон'юговані з пероксидазою хрому у робочому розведенні 1:400.

*Імунізація.* Для імунізації використано самиць мишей лінії BALB/c (розведення ІМБІГ НАН України) у віці 2—2,5 міс. Тварин утримували на стандартному раціоні. Всі маніпуляції з тваринами здійснювали із застосуванням седативних та анестезуючих препаратів, згідно з ветеринарним законодавством. Різним групам тварин тричі вводили внутрішньом'язово в квадрицепс чи біцепс з інтервалом у два тижні по 100 мкг плазмідної ДНК, розчиненої в 150 мкл фізіологічного розчину. Через 10 діб після останньої імунізації у тварин брали кров для одержання сироватки ретроорбітальною пункцією.

*ELISA.* Титр IgG у досліджуваних сироватках оцінювали за допомогою ELISA. Рекомбінантний E2 ВКЧС одержували, як описано в [6]. Антиген у кінцевій концентрації 0,01 мг/мл в об'ємі 100 мкл сорбували на полістиролових планшетах («Titertek», Велика Британія) протягом 18 год. Після цього надлишок антигену відмивали буфером PBS, рН 7,4, що містить 0,05 % твін-20 («Amersham Biosciences»). Сироватки та антимишачий кон'югат з пероксидазою хрому (BD «Biosciences») наносили у PBS, рН 7,4, що містив 0,05 % твін-20 та 1 % знежиреного молока, в об'ємі 100 мкл. Сироватки з антигеном інкубували протягом 60 хв при температурі 37 °С. Відмивали тричі та наносили антимишачий кон'югат з пероксидазою хрому (BD «Biosciences») в об'ємі 100 мкл у розведенні 1:1000. Інкубацію проводили протягом 90 хв (37 °С), після чого відмивали п'ять разів та наносили розчин ТМВ («Sigma») з пероксидом водню у кінцевій концентрації 0,015 % та інкубували упродовж 20 хв (37 °С). Реакцію зупиняли додаванням 1 N розчину сірчаної кислоти та вимірювали OD<sub>450</sub>.

Результати оцінювали з використанням критерію Ст'юдента [9].

*Результати і обговорення.* Антигеном для створення ДНК-вакцини було обрано E2 (gp55) глікопротеїн ВКЧС, що, як відомо з літератури, є найімуногеннішим білком даного вірусу. Раніше показано, що імунна відповідь на E2 достатня для захисту тварин від зараження ВКЧС [10]. Цей глікопротеїн використали в ряді робіт, присвячених створенню ДНК-вакцини проти КЧС, проте у переважній більшості з них працювали з повнорозмірним E2, що ускладнює створення діагностичної системи, яка б відрізняла вакциновану тварину від інфікованої, оскільки, як зазначалося вище, E2 є найімуногеннішим білком ВКЧС [11—13]. І хоча в роботах [14, 15] для створення ДНК-вакцини використано фрагменти E2 та показано їхню імуногенність, автори перевіряли лише фрагменти без сигнальної послідовності та без трансмембранного домену, у той час як усі антигенні детермінанти зберігалися такими, як у білка дикого типу.

Згідно із запропонованою в роботі [10] антигенною структурою E2 ВКЧС, він має чотири основні антигенні детермінанти (A, B, C і D), які знаходяться на двох субодиницях. І, таким чином, якщо взяти лише частину молекули, що містить основні протективні детермінанти, то можна створити одночасно і ДНК-вакцину, і, використавши іншу частину молекули, — діагностичну систему, здатну диференціювати поствакцинальний та постінфекційний імунітети. У нашій роботі ми використали ту частину E2, що кодується *SacI-EcoRI* фрагментом гена. Дана ділянка кодує одну антигенну субодиницю з епітопами A та D. Епітоп A поділяється на три субдомени — A1, A2 та A3. З літературних даних відомо, що антитіла до субдомену A1 є віруснейтралізуючими, а A2 субдомен — висококонсервативний у більш ніж 90 штаммах ВКЧС.

Отже, використання цього білка для розробки вакцини надасть можливість виконати одну з основних вимог, які висувають до вакцинних препаратів — здатність забезпечити захист вакцинованої особини від максимально можливої кількості штамів патогену. *SacI-EcoRI* фрагмент кодує частину гена структурного білка оболонки E2 вірулентного штаму Ші-Минь отримано Кириленко та ін. [16]. Штам Ші-Минь протягом декількох десятиліть використовують як позитивний конт-

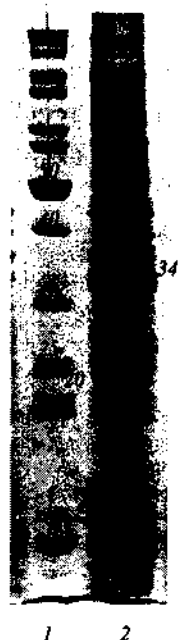


Рис. 1. Електрофореграма зразка клітин *E. coli* штаму BL (DE3), які містять плазмиду *pET24ap-csfc@rev*, культивованих при температурі 37 °С після індукції протягом 12 год (2). На гель нанесено зразок у кількості, еквівалентній 20 мкл клітинної суспензії (1 — маркер Page Ruler™ Protein ladder, MBI «Fermentas»)

рольний антиген при діагностиці та оцінці імунологічних властивостей вакцин проти КЧС.

Також показано, що вищезазначений фрагмент E2, синтезований у клітинах *E. coli*, здатний викликати імунну відповідь у підсвинків та захистити їх від летальної інфекції при подальшому контрольному зараженні високовірулентним штамом ВКЧС Вашингтон [6].

Як джерело фрагмента гена E2 ВКЧС використано плазмиду *pET24ap-csfc@rev*, яка містить *SacI-EcoRI* фрагмент гена E2 ВКЧС штаму Ші-Минь під регуляцією T7 промотора. Проте перед тим як провести переклонування, ми перевірили функціональність цільового гена експресією у клітинах *E. coli*. Для цього плазмідною ДНК трансформували клітини *E. coli* штаму BL (DE3) та в одержаних клонах перевіряли експресію фрагмента E2, як зазначено у «Матеріалах і методах». Одержану після 12-год індукції суспензію клітин аналізували за допомогою гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі за денатурувальних умов. З наведеної на рис. 1 електрофореграми можна зробити висновок, що фрагмент E2 з молекулярною масою 34 кДа експресується в клітинах *E. coli*.

Для переклонування використали фрагмент, одержаний гідролізом *pET24ap-csfc@rev* за сайтами впізнавання рестриктазами *XbaI* і *XhoI* та вектора за сайтами *XbaI* і *Sall* з подальшим лігуванням та трансформацією компетентних клітин *E. coli* штаму Sure<sup>®</sup>2. Таким чином отримано рекомбінантну

конструкцію *pTR-BKneo<sup>-</sup>* (рис. 2). Вона містить фрагмент гена E2 глікопротеїну ВКЧС, що знаходиться під регуляцією сильного нетканиноспецифічного ехансера/промотору надранніх генів цитомегаловірусу людини [17, 18], розташований між інвертованими термінальними повторами аденоасоційованого вірусу людини, за наявності яких у ДНК-вакцині, як показано в роботах [19, 20], спостерігається значне посилення гуморальної та клітинної імунної відповіді на ДНК-вакцинацію.

Для перевірки експресії фрагмента E2 ВКЧС у культурі еукаріотних клітин обрано клітини лінії СНО-K1. Трансфекцію проводили з використанням поліетиленіміну в розгалуженій формі з молекулярною масою 25 кДа, як описано в «Матеріалах і методах».

Контрольні клітини трансфікували *pEGFP-C1*. На третю добу після трансфекції клітини знімали з поверхні скла сумішню розчинів трипсину та Версену і концентрували центрифугуванням. Експресію E2 визначали методом імуноблотингу. Першими антитілами слугувала гіперімунна сироватка свині, одержана після вакцинації рекомбінантною вакциною проти КЧС. Негативним контролем був лізат клітин лінії СНО-K1, трансфікованих плазмідною *pEGFP-C1*, а позитивним — рекомбінантний фрагмент E2, одержаний у клітинах *E. coli*.

У результаті дослідження показано, що в клітинах, трансфікованих *pTR-BKneo<sup>-</sup>*, експресується фрагмент E2 ВКЧС (рис. 3). Однак проведений аналіз виявив, що молекулярна маса білка, який детектується, складає близько 50 кДа, у той час як молекулярна маса білка, одержаного в клітинах *E. coli*, становить лише 34 кДа. Різницю в молекулярній масі можна пояснити тим, що в клітинах СНО-K1 білок глікозилюється, а, згідно з літературними даними, саме на частині, яка кодується *SacI-EcoRI* фрагментом гена E2, розташовані всі п'ять сайтів глікозилювання [10], що є на молекулі E2. Слід також зазначити, що хоча розрахункова молекулярна маса повнорозмірного E2 становить 41 кДа, зрілий глікопротеїд має молекулярну масу 55 кДа [21]. Отже, 14 кДа припадає на глікозилювання. Таким чином, молекулярна маса фрагмента, використаного в нашій роботі становить 48 кДа. Відмінність у 2 кДа може бути спричинена як роздільною здатністю гелю, так і різницею в глікозилюванні клітин свині та СНО-K1 (клітини яєчника китайського хом'яка).

Таким чином, у ході проведеного дослідження

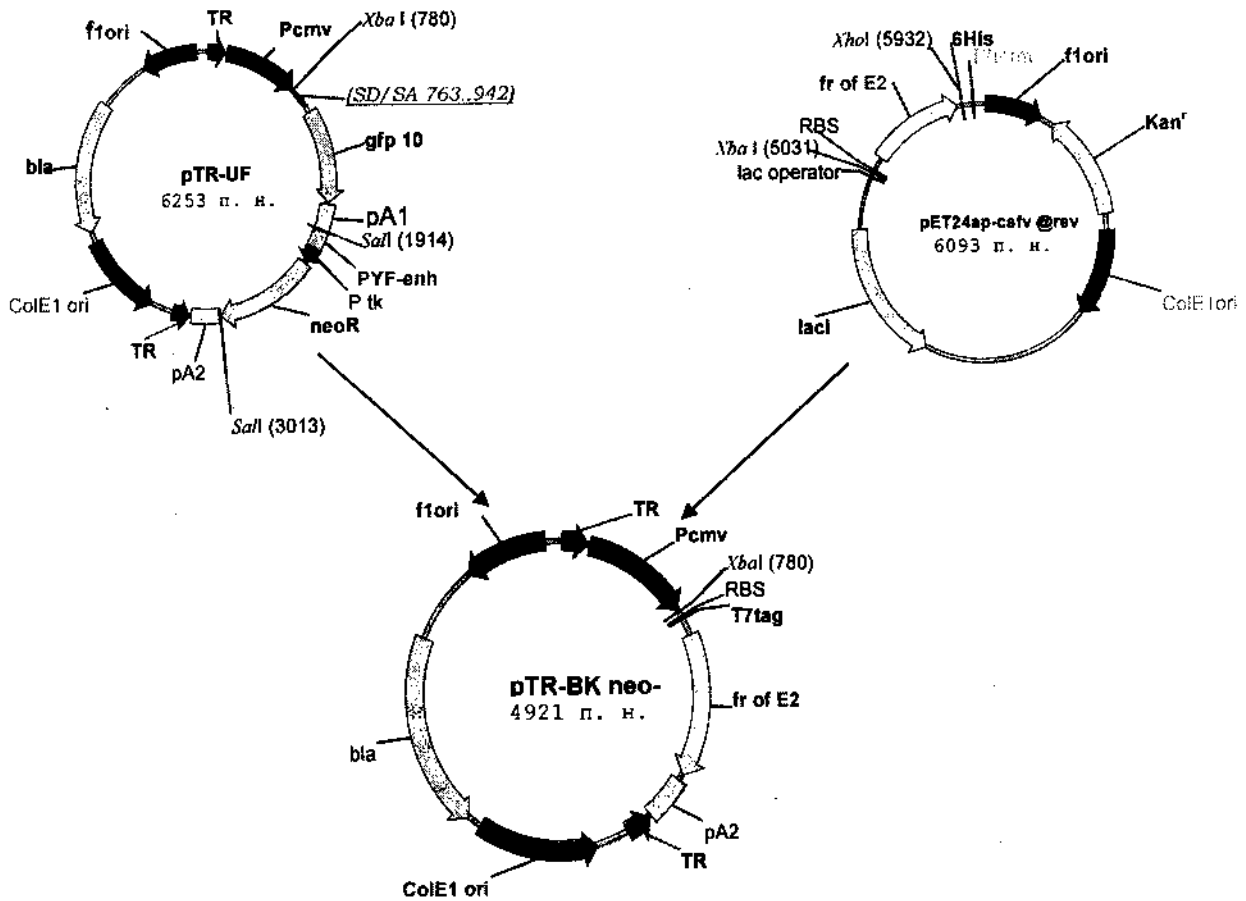


Рис. 2. Схема конструювання рекомбінантної плазмиди *pTR-BKneo<sup>-</sup>*. *TR* — інвертовані термінальні повтори AAV-2; *Pcmv* — ехансер/промотор надранніх генів цитомегаловірусу людини; *fr of E2* — *SacI-EcoRI* фрагмент гена E2 ВКЧС; *pA1* та *pA2* — сигнали подіагенілювання; *bla* — ген β-лактамази; *gfp10* — ген зеленого флуоресцентного білка; *neoR* — ген неоміцинфосфотрансферази; *ColE1 ori* — ориджин реплікації; *Kan<sup>r</sup>* — ген стійкості до канаміцину

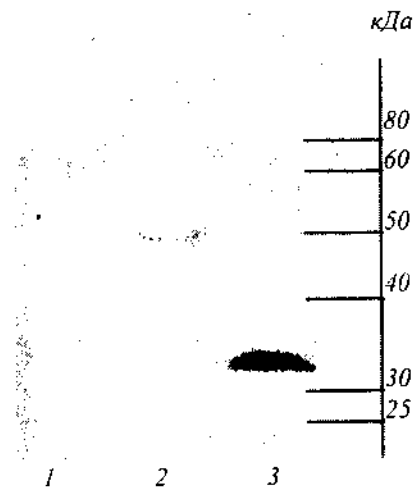


Рис. 3. Визначення транзиторної експресії фрагмента E2 ВКЧС у клітинах лінії CHO-K1 методом імуноблотингу: 1 — лізат контрольних клітин, трансфікованих *pEGFP-C1*; 2 — лізат клітин, трансфікованих *pTR-BKneo<sup>-</sup>*; 3 — рекомбінантний E2 ВКЧС, напрацьований у клітинах *E. coli*

продемонстровано, що із введеної у клітини лінії CHO-K1 рекомбінантної конструкції *pTR-BKneo<sup>-</sup>* експресується фрагмент E2 ВКЧС. Виходячи з отриманих даних можна зробити припущення, що відбувається його посттрансляційна модифікація, а саме — глікозилування.

Для перевірки можливості індукції гуморальної імунної відповіді при вакцинації створеною ДНК-вакциною мишей імунізували за схемою, описаною в розділі «Матеріали і методи». Оскільки в нашій попередній роботі [22] зазначено, що ефективність індукції гуморальної імунної відповіді на ДНК-вакцинацію залежить від місця введення, плазмідну ДНК ін'єктували в біцепс чи квадрицепс. Тваринам контрольної групи вводили вихідний вектор *pTR-UFneo<sup>-</sup>*, а дослідній групи — створену рекомбінантну конструкцію *pTR-BKneo<sup>-</sup>*. Наявність ан-

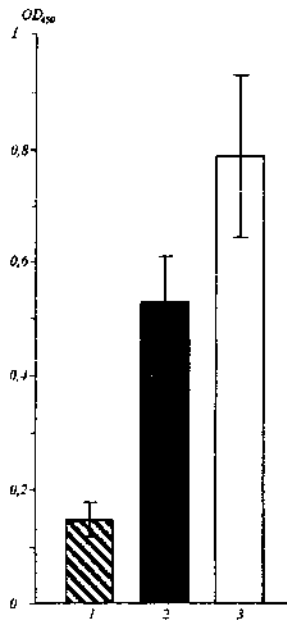


Рис. 4. Результати імуноферментного аналізу сироваток крові мишей після третьої імунізації: 1 — контрольні тварини, яким вводили *pTR-UFneo*; 2, 3 — тварини, імунізовані плазмідною *pTR-BKneo*, яку вводили в біцепс і квадрицепс відповідно. Дані наведено при використанні сироваток у робочому розведенні 1:800

титіл, специфічних до фрагмента E2, визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу через 10 діб після останньої, третьої імунізації. Результати проведеного аналізу наведено на рис. 4. Як можна бачити, імунізація *pTR-BKneo* призвела до індукції гуморальної імунної відповіді на E2 незалежно від місця введення ( $p < 0,01$ ). Причому ефективність індукції статистично вірогідно не розрізнялася ( $p < 0,05$ ). На відміну від цих даних, у нашій попередній роботі [22], де модельним антигеном слугувала  $\beta$ -галактозидаза *E. coli*, було продемонстровано, що ефективність індукції гуморальної імунної відповіді залежить від місця введення препарату плазмідної ДНК. Так, введення препарату в біцепс індукувало продукцію специфічних до  $\beta$ -галактозидази антитіл, а в квадрицепс — ні. Ми припустили, що знайдену різницю можна пояснити як відмінністю антигенів, так і різною ефективністю трансфекції міоцитів різними плазмідами. В останньому випадку значну роль може відігравати розмір введеної векторної конструкції. Варто зазначити, що модельна ДНК-вакцина, яка несе ген  $\beta$ -галактозидази *E. coli*, майже на 2,5 тис. п. н. більша за *pTR-BKneo*.

В літературі існують відомості, що розмір молекули є досить суттєвим при проникненні молекули ДНК крізь цитоплазматичну мембрану міоцитів [23]. Не слід відкидати також імовірність впливу гідростатичного тиску, оскільки в разі введення у біцепс він більший, аніж при введенні у квадрицепс. Збільшення тиску може спричинити форму-

вання тимчасових невеликих пор у мембранах клітини [24], крізь які буде проходити плазмідна ДНК, що в свою чергу підвищує ефективність трансфекції клітин. І ця ефективність зростатиме із зменшенням розміру молекули.

**Висновки.** Таким чином, у представленій роботі вперше створено рекомбінантну конструкцію, яка несе *SacI-EcoRI* фрагмент гена E2 ВКЧС у складі еукаріотної експресійної касети, та показано, що зі створеної рекомбінантної плазмиди *pTR-BKneo* після введення її у клітини лінії CHO-K1 експресується фрагмент E2 ВКЧС. Ми припускаємо, що відбувається його посттрансляційна модифікація. Створена ДНК-вакцина здатна індукувати продукцію специфічних до фрагмента E2 ВКЧС антитіл у мишей, причому ступінь індукції гуморальної імунної відповіді не варіює значно в залежності від місця внутрішньом'язового введення.

І. А. Похолоенко, Т. О. Рубан, О. М. Сухорада, О. М. Дерябин, Т. Г. Тютюк, В. А. Кордюм

The development of DNA-vaccine against classical swine fever

#### Summary

The development of a DNA-vaccine against classical swine fever (CSF) is a perspective direction, because it gives an opportunity to develop a marker vaccine due to use of a part of protective antigen molecule, and to induce effectively both cellular and humoral immune response. In this study a recombinant plasmid, containing the fragment of E2 gene of CFS virus (CSFV) in eukaryotic expression vector, has been developed. It has been demonstrated that the fragment of E2 protein of CSFV is expressed in CHO-K1 cells from the developed recombinant plasmid *pTR-BKneo*, and we suggest that the protein possesses the post-translational modifications. The data obtained are in favor of the created model DNA-vaccine able to induce humoral immune response to fragment of E2 protein of CSFV.

**Keywords:** CSFV, DNA-vaccine, E2 glycoprotein of CSFV, immunization, humoral immune response.

Я. А. Похолоенко, Т. А. Рубан, Е. М. Сухорада, О. Н. Дерябин, Т. Г. Тютюк, В. А. Кордюм

Создание ДНК-вакцины против классической чумы свиней

#### Резюме

Разработка ДНК-вакцины против классической чумы свиней (КЧС) представляет собой перспективное направление, поскольку именно в этом случае возможно создать маркированную вакцину благодаря использованию только части молекулы протективного антигена и обеспечить эффективную индукцию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. В ходе проведенного исследования создана рекомбинантная конструкция, несущая фрагмент гена E2 ВКЧС в составе эукаріотной экспрессионной касеты, и показано, что с полученной рекомбінантної плазмиди *pTR-BKneo* в клетках лінії CHO-K1 експресується фрагмент E2 ВКЧС. Сделано предположение о том, что проходит посттрансляционная модификация этого фрагмента. Созданная модельная ДНК-

вакцина способна индуцировать продукцию специфических к фрагменту E2 ВКЧС антител у мышей.

Ключевые слова: вирус классической чумы свиней (ВКЧС), ДНК-вакцина, E2 гликопротеид ВКЧС, иммунизация, гуморальный иммунный ответ.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Dong X. N., Chen Y.-H. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines // *Vaccine*.—2006.—25.—P. 205—230.
- Sambrook J., Fritsch E. E., Maniatis T. Molecular cloning.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—625 p.
- Current protocols in molecular biology / Eds F. M. Ausubel.—New York: J. Willey & Sons, 1997.—Vol. 1.—P. 1.8.1.—1.8.3.
- Catalogue Russian cell culture collection (RCCC).—St. Petersburg; OMSK, 1999.—33 p.
- Топорова Е. К., Новикова С. Н., Лихачева Л. И., Сухорада Е. М., Рубан Т. А., Козел Ю. Н., Иродов Д. М., Кордюм В. А. Невирусная доставка гена *араА1* человека в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo* // *Биополимеры і клітина*.—2004.—20, № 1—2.—С. 25—32.
- Дерябин О. М., Дерябина О. Г., Кулінич Р. М., Резнік В. С. Протективні властивості рекомбінантного білка E2 вірусу класичної чуми свиней, експресованого в *E. coli* // *Вісн. Білоцерківськ. держ. аграр. ун-ту*.—2005.—Вип. 31.—С. 151—158.
- Методы исследований в иммунологии / Под ред. И. Лефковитса, Б. Пернса.—М.: Мир, 1981.—Ч. 1.—486 с.
- Bollag D. M., Rozycki D. M., Edelstein S. J. Protein methods.—New York, 1996.—415 p.
- Фишер Р. А. Статистические методы для исследователей.—М.: Госстатиздат, 1958.—268 с.
- van Rijn P. A., Miedema G. K. W., Wensvoort G., van Gennip H. G. P., Moormann R. J. M. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus // *J. Virol.*—1994.—68.—P. 3934—3942.
- Andrew M. E., Morrissy C. J., Lenghaus C., Oke P. G., Sproat K. W., Hodgson A. L. M., Johnson M. A., Coupar B. E. H. Protection of pigs against classical swine fever with DNA-delivered gp55 // *Vaccine*.—2000.—18.—P. 1932—1938.
- Hammond J. M., Jansen E. S., Morrissy C. J., Goff W. V., Meehan C. G., Williamson M. M., Lenghaus C., Sproat K. W., Andrew M. E., Coupar B. E. H., Johnson M. A. A prime-boost vaccination strategy using naked DNA followed by recombinant porcine adenovirus protects pigs from classical swine // *Vet. Microbiol.*—2001.—80.—P. 101—119.
- Wienhold D., Armengol E., Maroquardt A., Maroquardt C., Voigt H., Buttner M., Saalmuller A., Pfaff E. Immunomodulatory effect of plasmids co-expressing cytokines in classical swine fever virus subunit gp55/E2-DNA vaccination // *Vet. Res.*—2005.—36.—P. 571—587.
- Makowska-Daniel I., Collins R. A., Pejsak Z. Evaluation of genetic vaccine against classical swine fever // *Vaccine*.—2001.—19.—P. 2480—2484.
- Yu X., Tu C., Li H., Hu R., Chen C., Li Z., Zhang M., Yin Z. DNA-mediated protection against classical swine fever virus // *Vaccine*.—2001.—19.—P. 1520—1525.
- Кириленко С. Д., Дерябин О. М., Кириленко О. Л., Дерябина О. Г., Бусол В. О. Клонування та надекспресія гена структурного білка E1 штама Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней в *Escherichia coli* // *Биополимеры и клетка*.—1996.—12, № 5.—С. 93—99.
- Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Hasler K., Fleckenstein B., Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus // *Cell*.—1985.—41.—P. 521—530.
- Foelckling M. K., Hofstetter H. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors // *Gene*.—1986.—45.—P. 101—105.
- Xin K. Q., Ooki T., Jounai N., Mizukami H., Hamajima K., Kojima Y., Ohba K., Toda Y., Hirai S., Klinman D. M., Ozawa K., Okuda K. A DNA vaccine containing inverted terminal repeats from adeno-associated virus increases immunity to HIV // *J. Gene Med.*—2003.—5.—P. 438—445.
- Chikhlikar P., de Arruda B. L., Agrawal S., Byrne B., Guggino W., August J. T., Marques E. T. Inverted terminal repeat sequences of adeno-associated virus enhance the antibody and CD8<sup>+</sup> responses to a HIV-1 p55Gag/LAMP DNA vaccine chimera // *Virology*.—2004.—323.—P. 220—232.
- Rumenapf T., Unger G., Strauss J. H., Thiel H.-J. Processing of the envelop glycoproteins of Pestiviruses // *J. Virol.*—1993.—67.—P. 3288—3294.
- Похоленко Я. О., Туток Т. Г., Сухорада О. М., Рубан Т. А. Конструювання та дослідження модельної ДНК-вакцини // *Биополимеры і клітина*.—2005.—21, № 3.—С. 270—274.
- Wolff J. A., Dowty M. E., Jiao S., Repetto G., Begr R. K., Ludtke J. J., Williams P., Slauterback D. B. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle // *J. Cell Sci.*—1992.—103.—P. 1249—1259.
- Budker V., Budker T., Zhang G., Subbotin V., Loomis A., Wolff J. A. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells *in vivo* by a receptor-mediated process // *J. Gene Med.*—2000.—2.—P. 76—88.

УДК 577.21 + 577.27:615.375:578.833.3

Надійшла до редакції 25.12.06