

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 636.4:619:616.98:578:577.2.08:51-76

Получение и характеристика рекомбинантных белков р17 и р54 вируса африканской чумы свиней в клетках млекопитающих

© 2017 г. К.А. МИМА*, Г.С. БУРМАКИНА, И.А. ТИТОВ, М.В. ШКАЛИКОВА, А.С. МАЛОГОЛОВКИН

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии», Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, 601125

*e-mail: mima89@ya.ru, VNIIViM@niiv.petush.elcom.ru

Поступила в редакцию 27.08.2016

Принята в печать 08.11.2016

Представлены данные по получению структурных иммунодоминантных рекомбинантных белков р17 и р54 вируса африканской чумы свиней в эукариотической системе экспрессии (клетках млекопитающих). Полноразмерные копии генов *D117L* (р17) и *E183L* (р54) клонировали в экспрессирующем векторе рGFP-N1 под контролем цитомегаловирусного промотора. Наличие рекомбинантных вставки и их ориентация подтверждены рестрикционным анализом и нуклеотидным секвенированием. Уровень продукции рекомбинантных белков и их локализация в трансфицированных клетках *COS-1* и *HEK-293T/17* определена флуоресцентной микроскопией белков р17GFP и р54GFP. Показана функциональная активность рекомбинантных белков с использованием поликлональных антител к вирусу АЧС. В результате исследований достоверно определена цитоплазматическая локализация белков р17 (*D117L*) и р54 (*E183L*), которая не изменяется в течение всего периода экспрессии. Полученные белки могут специфически взаимодействовать с антителами к вирусу АЧС, что позволяет использовать их в иммунологических реакциях.

Ключевые слова: африканская чума свиней, иммуноблоттинг, локализация, структурные белки, транзистная экспрессия.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-2-41-47

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) – крупный икосаэдрический ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Asfarviridae* [1].

АЧС является особо опасной болезнью представителей семейства *Suidae*, характеризующейся сильной лихорадкой, геморрагиями, слабостью, цианозом кожи ушных раковин, подгрудка, живота, пяточка и конечностей. Высоковирулентные штаммы вируса вызывают смертность почти в 100% случаях [2–4].

Средства специфической профилактики при АЧС не разработаны. Во многом это объясняется биологическими свойствами вируса. Полевые штаммы вируса АЧС обычно образуют гетерогенные поликлональные популяции, различающиеся по вирулентности, гемадсорбирующим и антигенным свойствам, что свидетельствует о его многотиповой вариабельности. Все это обуслов-

ливает трудность борьбы с АЧС и необходимость совершенствования противозооотических мероприятий на основе новейших научных достижений [5].

Значительный прогресс в области изучения антигенной вариабельности вируса АЧС был достигнут с использованием методов генной инженерии и молекулярной биологии [6–8]. Применение генетических конструкций с дефектными копиями отдельных генов вируса позволило охарактеризовать их функциональные свойства. На основе технологий рекомбинантных ДНК разработаны системы экспрессии вирусных генов в *E. coli*, бакуловвирусах, растениях, дрожжах и клетках млекопитающих [9–12].

Использование рекомбинантных белков вируса АЧС исключает работу с живым вирусом и инфицированными животными и позволяет изу-

Список сокращений: АЧС – африканская чума свиней; ПААГ – полиакриламидный гель; CMV (CytoMegalovirus) – цитомегаловирус; FBS (Fetal Bovine Serum) – фетальная бычья сыворотка; GFP (Green Fluorescent Protein) – зеленый флуоресцирующий белок; PBS (Phosphate-Buffered Saline) – фосфатно-солевой буфер.

чать его *in vitro*. В настоящее время известно о существовании более 120 белков вируса АЧС, многие из которых играют важную роль в формировании иммунного ответа. Изучение характеристик этих белков позволит лучше раскрыть механизмы иммунного ответа и взаимодействия вируса с клеткой хозяина, а получение рекомбинантных антигенов вируса АЧС позволит применять их в иммунологических реакциях для диагностики данного заболевания.

По данным [13, 14], белок p17 (*D117L*) вируса АЧС является иммуногенным белком, участвующим в сборке капсида вириона. Соответствующий ген экспрессируется на поздних стадиях вирусного цикла [15, 16]. Аминокислотная последовательность белка высоко консервативна [17] и не имеет значительного сходства с другими последовательностями, присутствующими в базе данных GenBank. Белок p17 является интегральным мембранным белком [18], который был обнаружен в предшественниках оболочки вируса, а также во внутриклеточных и внеклеточных зрелых частицах [19]. Предполагается, что он находится во внутренней оболочке – единственной мембранной структуре внутриклеточных частиц.

Другим структурным белком вируса является белок p54, кодируемый геном *E183L*, который также экспрессируется на поздней стадии репликации вируса и имеет важное значение для его жизнеспособности [20]. Молекулярная масса белка p54 составляет 25 кДа; он является трансмембранным белком: его N-конец находится внутри полостного пространства, а С-конец обращен в цитоплазму [21].

Таким образом, оба описанных выше белка являются трансмембранными и иммуногенными, в связи с чем вызывают интерес получение этих белков и более детальное изучение их локализации в клетке.

Цель настоящей работы состояла в получении рекомбинантных белков p17(*D117L*) и p54(*E183L*)

вируса АЧС в эукариотической системе экспрессии и исследование их распределения в клетке хозяина.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Конструирование рекомбинантных плазмид p17pGFP и p54pGFP

ДНК вируса АЧС выделяли из селезенки свиней, зараженных вирусом АЧС (штамм Ставрополь 01/08, Пб генотипа, 8 сероиммунотипа). ПЦР-амплификацию полноразмерных генов *D117L* (p17) и *E183L* (p54) проводили с использованием геноспецифических олигонуклеотидов, содержащих определенные сайты рестрикции (таблица).

Далее ПЦР-продукты подвергали электрофорезу в 1,5%-ном агарозном геле. Полосы, соответствующие по молекулярной массе интересующим генам, вырезали и очищали от агарозы при помощи набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия). Очищенные ПЦР-продукты клонировали в векторе pGEM-T-easy (Promega, США) согласно инструкции производителя. Трансформацию клеток бактериальной культуры *E.coli* Dh5α (NEB, США) осуществляли путем электропорации на приборе Gene Pulser Xcell (BioRad, США). Скрининг клонов проводили на чашках Петри с агаром, содержащим 30 ед/мл ампициллина (Applichem, Германия). Выделение плазмидной ДНК из отобранных клонов проводили с использованием набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN).

Наличие специфических вставок нуклеотидных последовательностей генов в рекомбинантных плазидах подтверждали результатами ПЦР с применением генспецифических праймеров, представленных в таблице. Для получения экспрессирующей конструкции был выбран вектор pGFP-N1, который содержит репортерный ген *EGFP*

Специфические олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Specific oligonucleotide primers used in this work

Ген	Последовательность праймера	Длина, пн	GC-состав, %	Сайт рестрикции для эндонуклеаз
<i>D117L</i> (p17)	F 3'- aattgggatcccatggactgaaacgt- 5'	28	46	<i>Bam</i> HI
	R 3'- cataaccggttgtaatgcgcaagttcag- 5'	29	48	<i>Age</i> I
<i>E183L</i> (p54)	F 3'- atctcgagctcattatggattctgaatttttc- 5'	33	33	<i>Sac</i> I
	R 3'- gactgcagaattctcaaggagttttctag- 5'	29	41	<i>Eco</i> RI

на С-конце и находится под контролем цитомегаловирусного (CMV) промотора. Нуклеотидные последовательности генов *D117L* (p17) и *E183L* (p54) переклонировали в экспрессирующем векторе по специфическим сайтам рестрикции *SacI*, *EcoRI* для p54 и *AgeI*, *BamHI* для p17. После электропорации компетентных клеток *E. coli* Dh5 α продуктами лигирования и селекции канамицин-устойчивых колоний (30 мкг/мл, Applichem, Германия) на агаре рекомбинантные плазмиды p17pGFP-N1 и p54pGFP-N1 выделяли указанным выше способом. Затем их секвенировали по генспецифическим праймерам и по праймеру для CMV-промотора, находящемуся в составе экспрессирующего вектора. Отсутствие вставок, делеций и замен в последовательностях генов *D117L* и *E183L* подтверждали методом нуклеотидного секвенирования рекомбинантных плазмид и сравнения с опубликованными последовательностями NCBI (FR682468.1, JQ771686.1).

Клеточные линии и их трансфекция

Для трансфекции использовали перевиваемые линии клеток почки зеленой африканской мартышки (*COS-1*, музей клеточных культур ГНУ ВНИИВВиМ) и клеток почки эмбриона человека (*HEK-293T/17*, музей клеточных культур ГНУ ВНИИВВиМ). Клетки выращивали на среде DMEM с добавлением 5% и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (AMRESCO, США) в инкубаторе (Sanjo, Япония) при 37°C и содержании CO₂ до 5%.

Для трансфекции липофектамино (Invitrogen, США) культуру выращивали на 6-луночной планшете до образования монослоя на 70–80% поверхности лунок. Затем среду заменяли на Opti-MEM (Gibco, США) и проводили трансфекцию плазмидной ДНК (2 мкг на лунку), согласно рекомендациям производителя липофектамина. Далее культуру инкубировали с комплексом липофектамина и плазмидной ДНК в течение 4–5 ч в инкубаторе с CO₂ при указанных выше условиях, после чего среду Opti-MEM снова заменяли на FBS.

Анализ биосинтеза рекомбинантных белков p17GFP и p54GFP

Учет и анализ продукции рекомбинантных белков проводили на основе репортерной флуоресценции белка GFP, «сшитого» с рекомбинантными белками p17 и p54. Ядра трансфицированных клеток окрашивали DAPI-субстратом (Sigma, США), и визуализацию осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS FL Auto (Invitrogen).

Анализ рекомбинантных белков p17GFP и p54GFP методом иммуноблотинга

Трансфицированные плазмидами p17pGFP-N1 и p54pGFP-N1 клетки линий *COS-1* и *HEK-293T/17* собирали через 24 ч, 48 и 96 ч после трансфекции, осаждали центрифугированием и хранили при температуре –70°C до проведения анализа.

Перед процедурой анализа клетки размораживали и лизировали в буфере, содержащем PBS, 0,02% твина-20 (Applichem) и ингибитор протеаз Protease Inhibitor Cocktail Set V (Calbiochem, США). Суспензию подвергали трехкратному замораживанию/оттаиванию, центрифугировали (9000 g), и отбирали супернатант. Для нанесения на 12%-ный ПААГ супернатант смешивали с двукратным буфером 2xLaemmli Sample Buffer (BioRad, США) в соотношении 1:1. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм (BioRad, США) с использованием системы TransBlot Turbo (BioRad). Мембраны с нанесенными на них белками обрабатывали моноклональными антителами GFP(FL) (Santa Cruz Biotechnology, США) к репортерному белку EGFP, гипериммунной сывороткой от зараженных вирусом АЧС животных (штамм вируса АЧС КК-262) и коммерческими антивидовыми конъюгатами – Goat Anti-Rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, США) и Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Swine IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусные участки, кодирующие полноразмерные белки p17 (*D117L*) и p54 (*E183L*), были амплифицированы и клонированы в экспрессирующем акцепторном векторе pGFP-N1 по сайтам рестрикции *SacI* и *EcoRI* для p54 и *AgeI* и *BamHI* для p17 (рис. 1).

Рестрикция рекомбинантных плазмид специфическими эндонуклеазами и дальнейший электрофорез рекомбинантных плазмид в 1,5%-ном агарозном геле позволили обнаружить фрагменты длиной 555 пн и 354 пн для генов, кодирующих белки p54 и p17, соответственно (рис. 2). Результаты нуклеотидного секвенирования плазмидной ДНК подтвердили правильность ориентации и точность рамки считывания рекомбинантных генов.

При помощи флуоресцентной микроскопии был проведен анализ экспрессии генов рекомбинантных белков p17GFP и p54GFP и определена их внутриклеточная локализация в трансфицированных клетках *COS-1* и *HEK-293T/17*. В связи с различной молекулярной массой эти белки могут

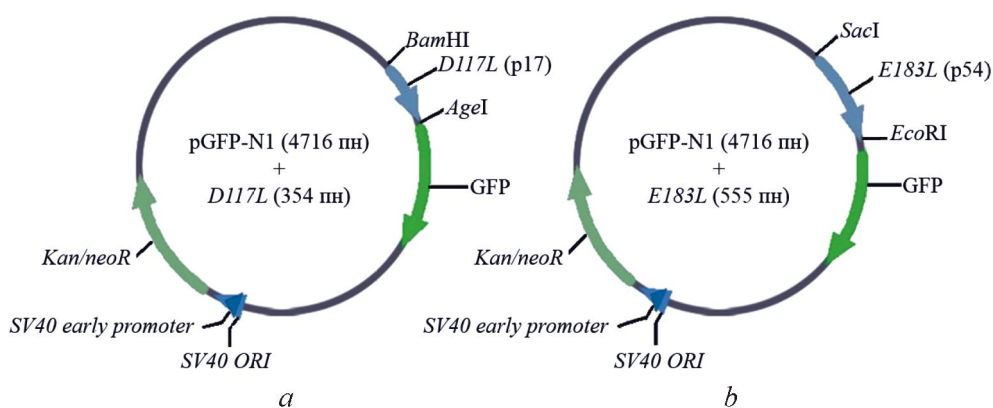


Рис. 1. Рекombинантные плазмиды, использованные в работе: *a* – pGFP-N1 со встроенным по сайтам рестрикции *AgeI* и *BamHI* геном *D117L* (p17); *b* – pGFP-N1 со встроенным по сайтам рестрикции *SacI* и *EcoRI* геном *E183L* (p54). *Kan/neoR* – ген устойчивости к антибиотикам; SV40 early promoter – ранний цитомегаловирусный промотор SV40; SV40 ORI – сайт инициации репликации

Fig. 1. Recombinant plasmids used in this work: (*a*), pGFP-N1 with gene *D117L* (p17) inserted at the restriction sites for *AgeI* и *BamHI* endonucleases; (*b*), pGFP-N1 with gene *E183L* (p54) inserted at the restriction sites for *SacI* и *EcoRI* endonucleases. *Kan/neoR*, gene of antibiotic resistance; SV40 early promoter, a CMV promoter gene; SV40 ORI, site of replication origin

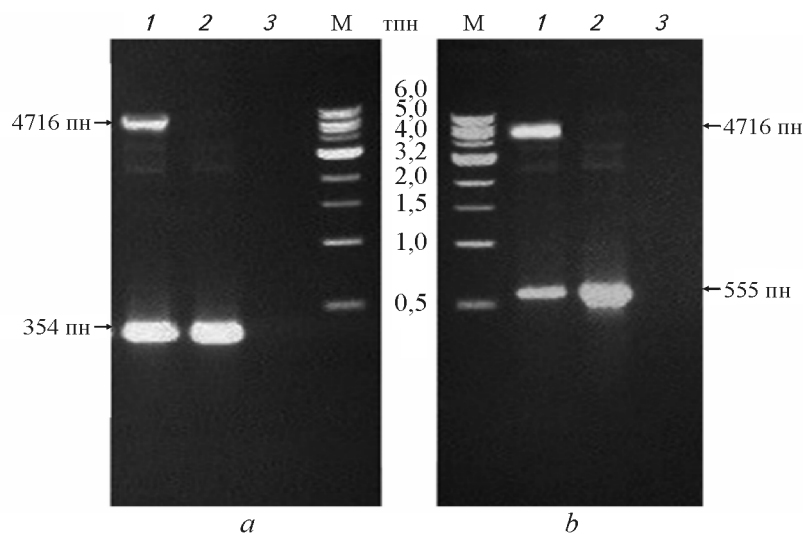


Рис. 2. Результат электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле рекombинантных плазмид после рестрикции специфическими эндонуклеазами: *a* – плазида p17pGFP-N1, обработанная рестриктазами *AgeI* и *BamHI*: 1 – плазида после рестрикции (участок ДНК размером 354 пн соответствует по длине полному гену *D117L*; участок ДНК размером 4716 пн соответствует плазмиде pGFP-N1); 2 – ПЦР-продукт длиной 354 пн, полученный при скрининге клонов p17pGFP-N1 с использованием генспецифических праймеров для гена *D117L* (см. таблицу). *b* – плазида p54pGFP-N1, обработанная рестриктазами *SacI* и *EcoRI*: 1 – плазида после рестрикции (участок ДНК размером 555 пн соответствует по длине полному гену *E183L*, участок ДНК размером 4716 пн соответствует плазмиде pGFP-N1); 2 – ПЦР-продукт длиной 555 пн, полученный при скрининге клонов p54pGFP-N1 с использованием генспецифических праймеров для гена *E183L* (см. таблицу). 3 – отрицательный контроль в ПЦР; М – маркеры молекулярной массы (NEB, США)

Fig. 2. Electrophoresis in 1.5% agarose gel of the recombinant plasmids after their restriction by specific endonucleases: (*a*), p17pGFP-N1 treated by *AgeI* и *BamHI*: (1), plasmid after restriction (a 354-bp DNA fragment corresponds in length to the full-size *D117L* gene; a 4716-bp fragment is similar with pGFP-N1); (2), a 354-bp PCR product obtained by the screening of p17pGFP-N1 clones using gene-specific primers for the *D117L* gene (see table). (*b*), p54pGFP-N1 treated by *SacI* и *EcoRI* endonucleases: (1), plasmid after restriction (a 555-bp fragment corresponds in length to the full-size *E183L* gene; a 4716-bp fragment is similar with pGFP-N1); (2), a 555-bp PCR product obtained after screening of p54pGFP-N1 clones using gene-specific primers to the *E183L* gene (see table). (3), negative control in PCR; M, markers of molecular masses (NEB, USA)

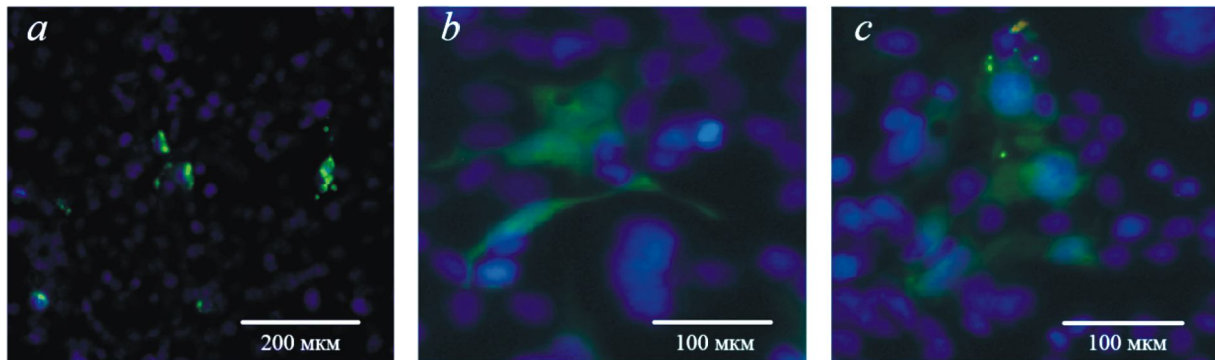


Рис. 3. Клетки *COS-1* через 24 ч после трансфекции следующими плазмидами: *a* – p17pGFP-N1; *b* – p54pGFP-N1; *c* – pGFP-N1. Зеленый цвет – флуоресценция клеток, продуцирующих белки p17GFP, p54GFP, EGFP. Голубым окрашены ядра клеток

Fig. 3. *COS-1* cells after 24 h of culturing after transfection by the following plasmids: (a), p17pGFP-N1; (b), p54pGFP-N1; and (c), pGFP-N1. Green color reflects the fluorescence of p17GFP-, p54GFP- and EGFP-producing cells. Cell nuclei are stained blue

различаться по уровню экспрессии в разное время после трансфекции, что может оказать влияние на их распределение в клетках.

В качестве контроля экспрессии мы использовали экспрессию гена репортерного белка EGFP.

Согласно флуоресцентному сигналу, локализация данного белка определялась в цитоплазме и ядрах клеток через 6–96 ч после трансфекции; при этом его локализация в клетке не менялась в зависимости от уровня экспрессии, изменялась лишь интенсивность флуоресцентного сигнала.

Локализация и продукция рекомбинантных белков наблюдались в динамике через 6 ч, 12, 24, 48, 72 и 96 ч после трансфекции. Типичные фотографии внутриклеточной локализации белков p17GFP, p54GFP и EGFP показаны на рис. 3. Белок p54GFP начинает синтезироваться на 5–6-м часу после трансфекции. Продукция белка p17GFP начинается несколько позже (6–7-й час после трансфекции). Однако к 24-му часу после трансфекции уровень биосинтеза обоих рекомбинантных белков постепенно увеличивается, достигает своего максимума через 48 ч (50% трансфицированных клеток от общего количества клеток в лунке для p17GFP и 70% для p54GFP) и далее не изменяется.

В течение всего времени экспрессии вирусных генов локализация p17GFP и p54GFP в клетке оставалась постоянной, а изменялась только интенсивность их флуоресценции. Белок p17GFP наблюдали в цитоплазме трансфицированных клеток *COS-1* и *HEK-293T/17* в виде клеточных включений, неравномерно распределенных по всей цитоплазме. В отличие от p17GFP распределение белка p54GFP по цитоплазме было равномерным (см. рис. 3).

Для подтверждения наличия в клетках *COS-1* и *HEK-293T/17* рекомбинантного белка использовали иммуноблотинг с моноклональными антителами к репортерному белку EGFP и детекцией при помощи Clarity Western ECL Substrat (BioRad) (рис. 4).

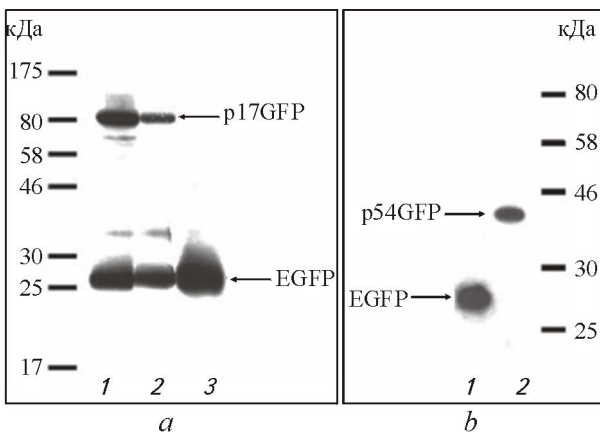


Рис. 4. Результаты иммуноблотинга лизата клеток *COS-1*, трансфицированных различными плазмидами, с первичными антителами к EGFP-белку в разных разведениях. *a*: 1 – p17pGFP-N1, антитела в разведении 1:500; 2 – p17pGFP-N1, антитела в разведении 1:1000; 3 – pGFP-N1, антитела в разведении 1:1000. *b*: 1 – pGFP-N1, антитела в разведении 1:1000; 2 – p54pGFP-N1, антитела в разведении 1:1000. Для визуализации использовали антивидовой конъюгат с пероксидазой хрена в разведении 1:5000

Fig. 4. Immunoblot of lysate of *COS-1* cells transfected by various plasmids with primary antibodies to EGFP protein in various dilutions: (a): (1), p17pGFP-N1, antibody dilution 1:500; (2), p17pGFP-N1, antibody dilution 1:1000; (3), pGFP-N1, antibody dilution 1:1000; (b), 1 – pGFP-N1, antibody dilution 1:1000; (2), p54pGFP-N1, antibody dilution 1:1000. Anti-species conjugate with horse radish peroxidase in dilution 1:5000 was used for visualization

На рис. 4, *a* (дорожка 1) с культурой клеток, трансфицированной плазмидой p17rGFP-N1, четко видны две полосы. Одна соответствует молекулярной массе белка EGFP (27 кДа), а другая – 80 кДа. Молекулярная масса в 80 кДа не соответствует предполагаемой массе белка p17GFP [22], превышая ее в два раза. Данные результаты могут говорить о посттрансляционных модификациях белка или формировании димеров. Данный вопрос требует дополнительного изучения.

На рис. 4, *b* можно отчетливо видеть две полосы, по молекулярной массе соответствующие белкам EGFP и p54GFP.

Таким образом, в данной работе установлено, что оба изученных рекомбинантных белка находятся в цитоплазме клеток. При этом характер их распределения различен: белок p54 равномерно распределен по всей цитоплазме, а p17 располагается в ней неравномерно в виде включений. Уровень экспрессии генов обоих белков не влияет на их локализацию в клетке. Данные иммуноблоттинга показывают, что оба рекомбинантных белка являются функциональными, способными к специфическому взаимодействию с сыворотками зараженных вирусом АЧС животных. Следовательно, данные рекомбинантные белки после дополнительной очистки могут применяться в иммунологических реакциях и использоваться для изучения вируса АЧС и противовирусного ответа при заболевании африканской чумой свиней.

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам лаборатории вирусологии и микробиологии ГНУ ВНИИВВиМ за помощь в проведении исследований. Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (МК-6875.2015.4) и Российского фонда фундаментальных исследований (15-34-20995). Этап исследований по клонированию генов вируса АЧС выполнен при финансовой поддержке гранта РФФИ 16-16-00090.

ЛИТЕРАТУРА

- Dixon L. K., Costa J.V., Escibano J.M., Rock D.L., et al. Family Asfarviridae. In: *Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Summers Academic Press, 2000, 159–165.
- Syurin V.N., Samuilenko A.Ya., Solov'yev B.V., and Fomina N.V. *Viral diseases of animals*. Moscow: VNITIBP, 1998, 770–777.
- Bakulov I.A., and Makarov V.V. Problems of the Modern Evolution of African Swine Fever. *Vestnik Sel'skokhozyaystvennykh Nauk* (Bull. Agric. Sci.). 1990, 3, 46–55.
- Bolotskiy I.A., Vasil'yev A.P., and Semenov V.I. African Swine Fever. *Svinoferma* (Pig Farm). 2008, 9, 43–46.
- Semenikhin A.A. African Swine Fever. *Veterinariya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh* (Veterinary of Farm Animals), 2008, 1, 15–18.
- L.K. Molecular cloning and restriction enzyme mapping of an African swine fever virus isolate from Malawi. , 1988, 69(7), 1683-1694. doi: 10.1099/0022-1317-69-7-1683
- Martins C.L., and Leitao A.C. Porcine immune responses to African swine fever virus (ASFV) infection. , 1994, 43(1–3), 99–106.
- Rodriguez, F., Alcaraz C., Eiras A., et al. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the african swinefever virus envelope protein p54. *J. Virol.*, 1994, 68, 7244–7252.
- Kopytov V. O., Tsybanov S. Zh., Kazakova A. S. et al. *Ecoli* BL21 (DE3)pLysS cell strain, pTT9/ASFVp30 clone containing recombinant plasmid with integration of part of CP204L gene of African swine fever virus encoding conformational epitope of protein p30 for producing diagnostic preparations. Patent of Russia, 2463343, C 1. 2012.
- Kazakova A.S., Sereda A.D., Strizhakova O.M. et al. Test-system for rapid diagnosis of African swine fever by immunoblotting assay with using recombinant protein p30. *Veterinariya* (Veterinary), 2014, 9, 52–56.
- Vlasova N.N., Balyshv V.M., and Kazakova A.S. Perspective of using the recombinant DNA-technology to control the spread of the African swine fever. *Procedia in Vaccinology*. 2011, 4, 92–99. doi: 10.1016/j.provac.2011.07.013
- Gallardo C., Blanco E., J.M., et al. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44(3), 950–956. doi: 10.1128/JCM.44.3.950-956.2006
- Suarez C., Gutierrez-Berzal J., Andres G., et al. African swine fever virus protein p17 is essential for the progression of viral membrane precursors toward icosahedral intermediates. , 2010, 84(15), 7487799. doi: 10.1128/JVI.00600-10
- Salas M.L., and Andres G. African swine fever virus morphogenesis. *Virus research.*, 2013, 173(1), 29?41.
- Rouiller I., Brookes S.M., Hyatt A.D., et al. African swine fever virus is wrapped by the endoplasmic reticulum. *J. Virol.*, 1998, 72(3), 2373–2387.
- Simon-Mateo C., Freije J.M, Andres G., et al. Mapping and sequence of the gene encoding protein p17, a major African swine fever virus structural protein. *Virology*, 1995, 206(2), 1140–1144.
- Chapman D.A., Tcherepanov V., Upton C., and Dixon L.K. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J. Gen.* 2008, 89(2), 397–408. doi: 10.1371/journal.pone.0142889
- Cobbold C., Whittle J.T., Wileman T. Involvement of the endoplasmic reticulum in the assembly and envelopment of African swine fever virus. *J. Virol.*, 1996, 70(12), 8382–8390.
- Rodriguez F., Alcaraz C., Eiras A., et al. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. , 1994, 68(11), 7244–7252.

20. Rodriguez F., Ley V., Gomez-Puertas P., et al. The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability. *Virus Res.*, 1996, 40(2), 161–167.
21. Rodriguez J.M., Garcia-Escudero R., Salas M.L., and Andres G. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *J. Virol.* 2004, 78(8), 1313–4299. doi: 10.1128/JVI.78.8.4299–4313.2004
22. Suarez C., Gutierrez-Berzal J., Andres G., et al. African swine fever virus protein p17 is essential for the progression of viral membrane precursors toward icosahedral intermediates. *J. Virol.*, 2010, 84(15), 7484–7499. doi: 10.1128/JVI.00600-10

Obtaining and Characteristics of p17 and p54 Proteins of African Swine Fever Virus in Mammalian Cells

K.A. MIMA*, G.S. BURMAKINA, I.A. TITOV, M.V. SHKALIKOVA, and A.S. MALOGOLOVKIN

The All-Russian Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology, 601125, Petushinskii Region, Vladimirskaya Oblast Russia

*e-mail: mima89@ya.ru, VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru

Received August 27, 2016

Accepted November 08, 2016

Abstract – The article describes the production of African swine fever virus (ASFV) structural immunogenic recombinant proteins p17 and p54 in a eukaryotic expression system (mammalian cells). Full-length copies of p17 (*D117L*) and p54 (*E183L*) genes were cloned in the expression vector pGFP-N1 under the control of the cytomegalovirus promoter. The presence of the inserts and their orientation were verified by the restriction analysis and nucleotide sequencing. The level of gene expression and recombinant proteins localization in COS-1 and HEK-293T/17 transfected cell cultures was determined by the reporter fluorescence of EGFP-fused p17GFP and p54GFP proteins. The functional activity of the recombinant proteins was confirmed by their ability to specifically interact with ASF antibodies. Our study shows that both recombinant proteins have the cytoplasmic location that remains unchanged during the whole expression period (96 hours). The recombinant ASFV proteins can interact specifically with ASFV antibodies and therefore, they can be used in immunological assays.

Key words: African swine fever, immunoblot, structural proteins, localization, transient expression.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-2-41-47

Acknowledgements – The authors are grateful to the staff of the Laboratory for Virology and Microbiology of VNIIVViM for the assistance in the investigations.

The work was performed with the financial support of the President of RF Council on Grants (MK-6875.2015.4) and Russian Fund for Basic Investigations (15-34-20995). The stage of cloning of the ASFV genes was performed with the financial support of Grant RNF 16-16-00090.