

**МАЛ ШАРУАШЫЛЫҒЫ ЖӘНЕ ВЕТЕРИНАРИЯ
ЖИВОТНОВОДСТВО И ВЕТЕРИНАРИЯ
STOCK-RAISING AND VETERINARY**

МРНТИ 68.41.05

DOI <https://doi.org/10.37884/3-2022/01>

А.У. Исабек, О.В. Червякова, А.К. Наханов, К.Т. Султанкулова*

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
пгт. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область, Казахстан
isabekova__aisha@mail.ru*, ovch@mail.ru, aziz_nk@mail.ru, sultankul70@mail.ru*

**ПОЛУЧЕНИЕ ВЕКТОРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ПЕРВОЙ
СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА ТИПА А**

Аннотация

На данный момент значительную обеспокоенность вызывает распространение в мире эпизоотий вируса гриппа птиц. Вирус гриппа обладает наиболее высокой генетической вариабельностью и вероятностью появления новых штаммов, способных создавать большие эпидемии. Эволюция вируса гриппа протекает очень быстро, следовательно, первоочередной задачей исследователей является антигенное картирование подтипов гемагглютинина, а также выявления особенностей антигенной структуры. Рентгеновская кристаллография является часто используемым методом при определении трехмерной структуры белка.

Целью данных исследований являлось получение векторных конструкций для экспрессии белка первой субъединицы вируса гриппа типа А для дальнейшей экспрессии в бактериальной системе.

В результате проведенных исследований были синтезированы специфические праймеры для амплификации гена первой субъединицы гемагглютинина. При дизайне олигонуклеотидов для наибольшей специфичности учитывали все критерии, предъявляемые праймерам для ПЦР. Для праймеров были выбраны эндонуклеазы рестрикции NcoI и XhoI, сайты которых отсутствуют в последовательности самого гена и присутствуют в мультиклональном участке плазмиды. Также в ходе проведенных исследований была получена генетическая конструкция для экспрессии белка первой субъединицы гемагглютинина в клетках *E.coli*. Полученный рекомбинантный белок будет использован для дальнейших работ по кристаллографии и трехмерному моделированию белка.

Ключевые слова: *вирус гриппа птиц, гемагглютинин, праймеры, плазмидная ДНК, экспрессия, рекомбинантный белок, кристаллография.*

Введение

Вирус птичьего гриппа является одним из смертельно опасных патогенов. Данным вирусом заражаются многие виды диких и домашних птиц, большое количество различных видов млекопитающих и человек. Вирусы гриппа А представляют собой оболочечные РНК-вирусы, принадлежащие к семейству *Orthomyxoviridae*. С конца 2003 года H5N1 достиг эпизоотического уровня у домашней птицы в ряде азиатских стран, включая Китай, Вьетнам, Таиланд, Корею, Индонезию, Японию и Камбоджу, и теперь распространился на популяции диких птиц [1, 2].

Вирусы гриппа А существуют во многих различных средах и используют различные виды хозяев. Экология этих вирусов сильно варьируется в зависимости от их взаимодействия друг с другом (реассортировка, конкуренция), с их хозяевами (иммунитет, доступность рецепторов, температура хозяина) и с окружающей средой (температура окружающей среды, влажность, состав осадка, соленость). воды, рН). Сегментированный геном вирусов гриппа А дает эволюционные преимущества, а вирусы гриппа А обладают большой способностью

эволюционировать с помощью двух разных механизмов: антигенного дрейфа и сдвига. Все пандемии в двадцатом веке были птичьего происхождения [3, 4].

Белковый слой матрикса включает в себе вирусный геном, состоящий из восьми сегментов одноцепочечной РНК, окруженной нуклеопротеинами. Эти восемь сегментов генома кодируют десять вирусных белков, в том числе три субъединицы, PA, PB1 и PB2, вирусспецифической РНК-полимеразы, два поверхностных гликопротеина, гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA), нуклеопротеин (NP), матрикс белок (M), белок M2 протонного канала, который транслируется со сплайсированной мРНК M, и два неструктурных белка NS1 и NS2, которые являются продуктами двух альтернативно сплайсированных восьми вирусных мРНК [5, 6].

Ключевым звеном в проникновении вируса является поверхностный гликопротеин HA, который содержит сайт связывания с рецептором хозяина, позволяющий вирусной частице прикрепляться к определенным клеткам-хозяевам. Поскольку HA представляет собой поверхностный гликопротеин на вирусной частице, он легко распознается антителами хозяина, когда вирус гриппа заражает хозяина. Гемагглютинин синтезируется в качестве одноцепочечного предшественника (HA0) в эндоплазматической сети, где он собирается в виде тримера, а затем экспортируется на поверхность клетки через аппарат Гольджи. На клеточной поверхности HA0 расщепляется специфическими протеазами-хозяевами на HA1 и HA2 [7-11].

Вирус гриппа постоянно меняется, и важно следить за молекулярной эволюцией циркулирующих штаммов, чтобы регулярно обновлять состав вакцины, разрабатывать новые препараты против гриппа [12, 13]. Знание пространственной структуры белка дает возможность определения механизма работы, направленной разработки профилактических препаратов. Определение пространственной структуры белка (трехмерное моделирование) является бурно развивающейся отраслью современной науки [14, 15].

Целью данной работы является получение векторных конструкций для экспрессии белка первой субъединицы вируса гриппа типа А для дальнейшей экспрессии в бактериальной системе.

Методы исследования

В качестве объекта исследования в работе был использован штамм А/курица/СКО/5/05 (H5N1) вируса гриппа птиц А/Н5, который был получен из коллекции микроорганизмов НИИПББ.

Конструирование праймеров. Для поиска последовательности гена HA, к которому необходимо подобрать праймеры, использовали биоинформационную базу данных NCBI. Для конструирования праймеров и оптимизации условий проведения ПЦР использовали программу «Vector NTI 10».

Конструированные праймеры синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов Synthesizer H-16 (производство Германия) согласно инструкции, прилагаемой к прибору. Элюирование синтезированных праймеров с колонок проводили концентрированным раствором аммиака. Затем праймеры высушивали на ротационном испарителе и очищали спиртовым переосаждением. В реакциях амплификации для наработки ПЦР продукта использовали 20 пМ концентрации праймеров.

Выделение РНК. Вирусную РНК выделяли набором «QIAprep Viral RNA kit» фирмы Qiagen.

Амплификация гена HA. Амплификацию проводили на амплификаторе фирмы Applied Biosystem GenAmp 9700.

Для постановки ПЦР использовали набор «SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity DNA Polymerase» (Invitrogen). Состав реакционной смеси: вода-17,5 мкл; 2x буфер-25,0 мкл; праймер прямой-1,0 мкл; праймер обратный-1,0 мкл; фермент-0,50 мкл; РНК вируса-5,0 мкл. Конечный объем-50 мкл.

Аmplифицированные ПЦР продукты анализировали в 1% агарозном геле с дальнейшей детекцией на трансиллюминаторе Gel Chemi Doc («Bio-Rad» США). Полученные результаты были визуализированы и зарегистрированы с помощью программы «Quantity One».

Получение векторных конструкций методом клонирования

Аmplифицированную нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок первой субъединицы гемагглютинаина (HA1) клонировали в экспрессирующий вектор pET28b(+) (Novagen) по сайтам NcoI - XhoI. Корректность полученной конструкции подтверждали секвенированием. Полученный рекомбинантный вектор pET28/Inf-SKO-HA1 трансформировали в компетентные клетки *E. coli* штамм ER2566 (NEB)

Секвенирование ДНК

Секвенирование ДНК проводили методом дидеоксисеквенирования с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов (метод Сенгера) на автоматическом 16-капиллярном секвенаторе Genetic Analyser 3130 xl, Applied Biosystems.

Определение нуклеотидной последовательности выделенных плазмидных ДНК проводили на приборе ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, USA) с использованием наборов “Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit”.

Результаты и обсуждения

Наиболее важным при определении трехмерной структуры белка является первоначальная наработка гена, который кодирует аминокислотную последовательность исследуемого белка. Важной составляющей при проведении ПЦР является конструирование праймеров, которые должны быть специфичными и обеспечивать достаточную точность реакции. Нами синтезированные праймеры отвечают всем общепринятым рекомендациям, которые используются при конструировании праймеров. Для получения нуклеотидной последовательности гена HA1 необходимо правильно подобрать праймеры, которые содержали бы на концах последовательность ферментов рестрикции по которой в дальнейшем будет осуществляться вырезание гена и его лигирование с плазмидой.

Характеристика праймеров представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Последовательность синтезированных праймеров

| Участок гена | Название | Последовательность | Рестрик таза | Размер продукта |
|---------------------------------------|-------------|----------------------------|--------------|-----------------|
| Последовательность первой субъединицы | HA1 FP NcoI | GTGCCATGGGTGATCAGATTTGC | NcoI | 1000 п.о. |
| | HA1 RP XhoI | CGTCTCGAGTCACTCTTTTCTTCTTC | XhoI | |
| Примечание: п.о.- пар оснований | | | | |

Как видно из таблицы 1, были сконструирована и синтезирована пара праймеров для наработки нуклеотидной последовательности первой субъединицы. Были выбраны эндонуклеазы рестрикции NcoI и XhoI, сайты которых отсутствуют в последовательности самого гена и присутствуют в мультиклональном участке плазмиды.

Ген HA1 амплифицирован с помощью ранее синтезированных специфических праймеров – HA1 FP NcoI и HA1 RP XhoI. Температурно-временные режимы: 2 мин при температуре 94 °С; 35 циклов – 95 °С в течение 30 с, 50 °С в течение 30 с, 72 °С в течение 3 мин, 72 °С в течение 7 мин. Результаты амплификации первой субъединицы гемагглютинаина представлены на рисунке 1. Согласно электрофоретическому профилю результатов ПЦР размеры полученных ПЦР-продуктов соответствуют ранее теоритически рассчитанному

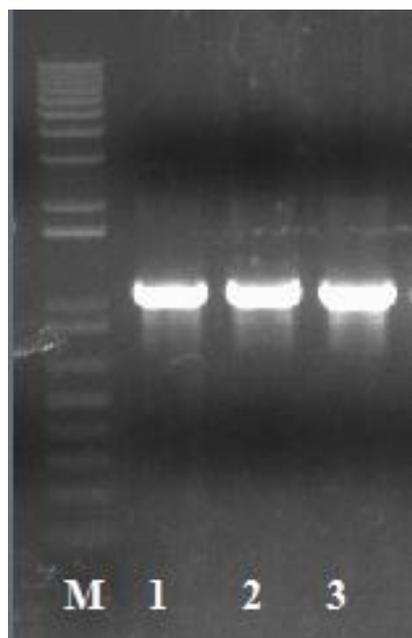


Рисунок 1 - Электрофореграмма ПЦР фрагментов гена HA1
M - маркер (1 kb, Invitrogen); 1-3 результаты амплификации гена HA1 штамма
А/курица/СКО/5/05 (H5N1)

Рекомбинантная плазмида, которая была получена в результате лигирования включала нуклеотидную последовательность белка HA1 под контролем промотора T7. На N- и C-концах аминокислотная последовательность имеет гистидиновые таги His6 (рис. 2).

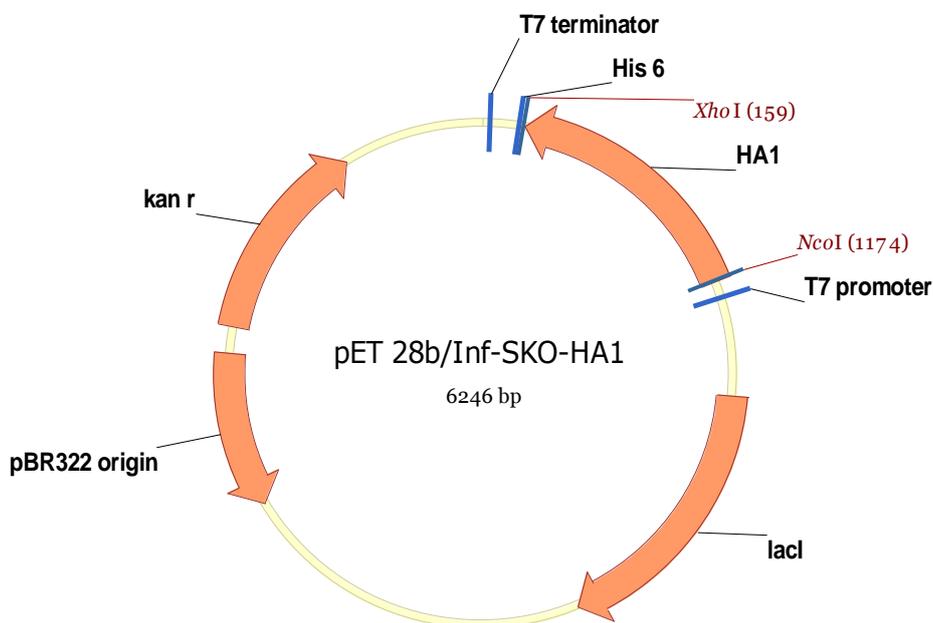


Рисунок 2 – Карта плазмиды pET28/Inf-SKO-HA1
pBR322 origin- сайт начала репликации, kan r - ген устойчивости к канамицину, lacI-ген репрессора лактозного оперона, T7 promoter – промотор фага T7, T7 terminator – терминатор транскрипции фага T7, HA1 – встроенный рекомбинантный ген HA1, His6 – последовательность кодирующая гексагистидиновый таг

В настоящий момент наиболее эффективным и самым широко распространенным методом очистки белков является метод аффинной хроматографии.

Металл-аффинная хроматография является высокоспецифичным и надежным методом очистки рекомбинантных белков вследствие относительно высокого сродства и специфичности некоторых металлов к эпитопу, содержащему шесть или более остатков гистидина. При создании генетической конструкции для экспрессии целевого гена в состав нуклеотидной последовательности нами были включены участки, кодирующие гексагистидиновые таги (Рисунок 2). Это позволит использовать для очистки целевого белка метод металл-аффинной хроматографии. Очистка белков, содержащих в своей структуре таги, достаточно проста, и можно сэкономить много времени благодаря высокой специфичности метки рекомбинантного белка и лиганда иммобилизованного на хроматографическом сорбенте. Чистота выделенного с помощью аффинной хроматографии белка может достигать 95% [16].

Выводы

Таким образом, в результате проведенной нами работы были синтезированы специфические праймеры для амплификации гена HA1. При дизайне олигонуклеотидов для наибольшей специфичности учитывали все критерии, предъявляемые праймерам для ПЦР. Также в ходе проведенных исследований была получена генетическая конструкция для экспрессии белка HA1 в клетках *E.coli*. Полученная векторная конструкция позволит проводить очистку белка методом металл-аффинной хроматографии. Очистка данным методом позволит получить очищенный препарат с чистотой выделения до 95%.

Благодарность

Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования научных исследований «Изучение процесса патогенеза вируса гриппа при изменении антигенной структуры, путем трехмерного моделирования белков» (2018-2020), № AP05I32243

Список литературы

1. Всемирная организация здравоохранения. Руководство по лабораторной диагностике и вирусологическому надзору за гриппом . Всемирная организация здравоохранения , Женева, Швейцария
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1
2. Lyons D., Lauring A. Mutation and Epistasis in Influenza Virus Evolution // Viruses. - 2018. –Vol. 10. – P. 401-407 DOI: <https://doi.org/10.3390/v10080407>
3. Visher E., Whitefield S.E., McCrone J.T., Fitzsimmons W., Lauring A.S. The Mutational Robustness of Influenza A Virus // PLoS Pathog. – 2016. – Vol. 12, No 8. – P. 56-58 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005856>
4. Swayne D.E., Suarez D.L. Highly pathogenic avian influenza // Rev. Sci. Tech. – 2000. Vol. 19. – P. 463–482 DOI: <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1230>
5. Lvov D.K., Kaverin N.V. Avian influenza in Northern Eurasia / D.K. Lvov, N.V Kaverin // In: Klenk H.D., Matrosovich M., Steh J., eds. Monographs in Virology. Volume 27: Avian Influenza. Basel, Switzerland: Karger; 2008: 41—58
6. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignat'eva A.V. Antigenic structure of influenza A virus hemagglutinin / N.V.Kaverin, I.A.Rudneva // Voprosy virusologii. 2012; Suppl. 1: 148—58
7. Stevens J., Blixt O., Tumpey T.M., Taubenberger J.K., Paulson J.C., Wilson I.A. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus // Science. – 2006. – Vol. 312. – P. 404–410 DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1124513>
8. Khurana S., Verma S., Verma N., Crevar C.J., Carter D.M., Manischewitz J., King L.R., Ross T.M., Golding H. Bacterial HA1 vaccine against pandemic H5N1 influenza virus: evidence of oligomerization, hemagglutination, and crossprotective immunity in ferrets // J. Virol. – 2011. Vol. 85. – P. 1246–1256 DOI: <https://doi.org/10.1128%2FJVI.02107-10>

9. Harper S et al. Influenza // *Clinics in Laboratory Medicine*. – 2002. – Vol. 22, No. 4. – P. 863-882
10. Kido H., Yokogoshi Y., Sakai K., Tashiro M., Kishino Y., Fukutomi A Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein // *J. Biol. Chem.* – 1992. – P. 13573-13267 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42250-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42250-8)
11. Skehel J. J., Wiley D. C., Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin // *Annu. Rev. Biochem.* – 2000. Vol. 69. – P. 520-531 DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.531>
12. Nelson M.I., Holmes E.C. The evolution of epidemic influenza // *Nat Rev Genet.* – 2007. Vol. 8. – P. 196–205 DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2053>
13. Nobusawa E., Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses // *J Virol.* – 2006. Vol. 80. – P. 3675–3678 DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.80.7.3675-3678.2006>
14. Хельте Х.Д., Зиппль В., Роньян Д., Фолькерс Г. Молекулярное моделирование. Теория и практика. - М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.
15. Levinthal C., Molecular Model-Building by Computer // *Scientific American*. – 1966. Vol. 214. – P. 42–52
16. Hochuli E. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber // *Biotechnology*. – 1988. V. 6. – P. 1321–1325 DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>

References

1. Vsemirnaya organizatsiya zdravookhraneniya. Rukovodstvo po laboratornoj diagnostike i virusologicheskomu nadzoru za grippom . Vsemirnaya organizatsiya zdravookhraneniya, ZHeneva, Shvejtsariya
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1
2. Lyons D., Lauring A. Mutation and Epistasis in Influenza Virus Evolution // *Viruses*. – 2018. –Vol. 10. – P. 401-407 DOI: <https://doi.org/10.3390/v10080407>
3. Visher E., Whitefield S.E., McCrone J.T., Fitzsimmons W., Lauring A.S. The Mutational Robustness of Influenza A Virus // *PLoS Pathog.* – 2016. – Vol. 12, No 8. – P. 56-58 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005856>
4. Swayne D.E., Suarez D.L. Highly pathogenic avian influenza // *Rev. Sci. Tech.* – 2000. Vol. 19. – P. 463–482 DOI: <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1230>
5. Lvov D.K., Kaverin N.V. Avian influenza in Northern Eurasia / D.K. Lvov, N.V Kaverin // In: Klenk H.D., Matrosovich M., Steh J., eds. Monographs in Virology. Volume 27: Avian Influenza. Basel, Switzerland: Karger; 2008: 41—58
6. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignat'eva A.V. Antigenic structure of influenza A virus hemagglutinin / N.V.Kaverin, I.A.Rudneva // *Voprosy virusologii*. 2012; Suppl. 1: 148—58
7. Stevens J., Blixt O., Tumpey T.M., Taubenberger J.K., Paulson J.C., Wilson I.A. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus // *Science*. – 2006. – Vol. 312. – P. 404–410 DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1124513>
8. Khurana S., Verma S., Verma N., Crevar C.J., Carter D.M., Manischewitz J., King L.R., Ross T.M., Golding H. Bacterial HA1 vaccine against pandemic H5N1 influenza virus: evidence of oligomerization, hemagglutination, and crossprotective immunity in ferrets // *J. Virol.* – 2011. Vol. 85. – P. 1246–1256 DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02107-10>
9. Harper S et al. Influenza // *Clinics in Laboratory Medicine*. – 2002. – Vol. 22, No. 4. – P. 863-882
10. Kido H., Yokogoshi Y., Sakai K., Tashiro M., Kishino Y., Fukutomi A Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A

possible activator of the viral fusion glycoprotein // J. Biol. Chem. – 1992. – P. 13573-13267 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42250-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42250-8)

11. Skehel J. J., Wiley D. C., Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin // Annu. Rev. Biochem. – 2000. Vol. 69. – P. 520-531 DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.531>

12. Nelson M.I., Holmes E.C. The evolution of epidemic influenza // Nat Rev Genet. – 2007. Vol. 8. – P. 196–205 DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2053>

13. Nobusawa E., Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses // J Virol. – 2006. Vol. 80. – P. 3675–3678 DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.80.7.3675-3678.2006>

14. KHyol'te KH.D., Zippl' V., Ron'yan D., Fol'kers G. Molekulyarnoe modelirovanie. Teoriya i praktika/ KH.D. KHyol'te, V. Zippl', D. Ron'yan, G. Fol'kers // M: BINOM. Laboratoriya znanij, 2015

15. Levinthal C., Molecular Model-Building by Computer // Scientific American. – 1966. Vol. 214. – P. 42–52

16. Hochuli E. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber // *Biotechnology*. – 1988. V. 6. – P. 1321–1325 DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>

А.У. Исабек*, О.В. Червякова, А.К. Наханов, К.Т. Султанкулова

*Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты
қтқ Гвардейский, Қордай ауданы, Жамбыл облысы, Қазақстан*

isabekova__aisha@mail.ru, ovch@mail.ru, aziz_nk@mail.ru, sultankul70@mail.ru*

ТҰМАУ ВИРУСЫНЫҢ ГЕМАГГЛЮТИНИНІҢ БІРІНШІ БӨЛІГІНІҢ АҚУЫЗЫН ЭКСПРЕССИЯЛАУ ҮШІН ВЕКТОРЛЫҚ КОНСТРУКЦИЯЛАРДЫ АЛУ

Аңдатпа

Қазіргі уақытта құс тұмауының вирусының эпизоотиясының бүкіл әлемде таралуы өте үлкен алаңдаушылық тудырады. Тұмау вирусы аса жоғары генетикалық өзгергіштікке ие. Жаңа штаммдардың пайда болуы үлкен эпидемия тудыру мүмкіншілігі өте жоғары болып табылады. Тұмау вирусының эволюциясы өте тез жүреді, сол себептен қазіргі таңда зерттеушілердің басты міндеті тұмау вирусының гемагглютининнің түрлерін антигендік карталардыру, сонымен қатар антигендік құрылымының сипаттамаларын анықтау болып табылады. Рентгендік кристаллография әдісі ақуыздың құрылымын анықтауда жиі қолданылатын әдіс болып саналады.

Жұмыстың мақсаты - *Escherichia coli* жасушаларының негізінде бактериалды экспрессия әдісін қолдана отырып тұмау вирусының гемагглютининнің бірінші бөлігінің рекомбинантты ақуызын алу үшін векторлық конструкцияларды әзірлеу болып табылады.

Зерттеулер нәтижесінде гемагглютининнің бірінші бөлігінің генін күшейтуге арналған арнайы праймерлер синтезделді. Олигонуклеотидтерді жоғары спецификалық болуы үшін жобалау кезінде ПТР үшін праймерлердің барлық критерийлері ескерілді. Праймерлер үшін NcoI және XhoI рестрикциялық эндонуклеазалар таңдалды, олардың сайттары геннің өз тізбегінде жоқ және плазмиданың мультиклоналды аймағында болады. Сондай-ақ, зерттеулер барысында *E. coli* жасушаларында гемагглютининнің бірінші бөлігінің ақуызының экспрессиясы үшін векторлық конструкция алынды. Алынған рекомбинантты ақуыз кристаллография және ақуызды үш өлшемді модельдеу бойынша одан әрі жұмыс үшін пайдаланылады.

Кілт сөздер: құс тұмауы вирусы, гемагглютинин, праймерлер, плазмидалық ДНҚ, экспрессия, рекомбинантты ақуыз, кристаллография.

A.U. Issabek, O.V. Chervyakova, A.K. Nakhanov, K.T. Sultankulova*

Research Institute for Biological Safety Problems

Gvardeyskiy, Kordai district, Zhambyl region, Kazakhstan

isabekova__aisha@mail.ru, ovch@mail.ru, aziz_nk@mail.ru, sultankul70@mail.ru*

OBTAINING VECTOR CONSTRUCTS FOR THE EXPRESSION OF THE FIRST SUBUNIT OF HEMAGGLUTININ INFLUENZA VIRUS TYPE

Abstract

At the moment, there is considerable concern about the spread in the world of epizootics of the avian influenza virus. Influenza virus has the highest genetic variability and the likelihood of new strains that can create large epidemics. The evolution of the influenza virus proceeds very quickly, therefore, the paramount task of the researchers is antigenic mapping of hemagglutinin subtypes, as well as identifying the characteristics of the antigenic structure. X-ray crystallography is a commonly used method for determining the three-dimensional structure of a protein.

The purpose of these studies was to obtain vector constructs for the expression of the protein of the first subunit of influenza A virus for further expression in the bacterial system.

As a result of the studies, specific primers for amplification of the first subunit of hemagglutinin gene were synthesized. When designing oligonucleotides for the greatest specificity, all the criteria for primers for PCR were taken into account. The restriction endonucleases NcoI and XhoI were chosen for primers, the sites of which are absent in the sequence of the gene itself and are present in the multiclonal region of the plasmid. Also, in the course of the studies, a genetic construct was obtained for the expression of the first subunit of hemagglutinin protein in E. coli cells. The obtained recombinant protein will be used for further work on crystallography and three-dimensional modeling of the protein.

Key words: avian influenza virus, hemagglutinin, primers, plasmid DNA, expression, recombinant protein, crystallography.