

УДК 619:616.98:578.828.11-
078:578.74:575.116.12:636.22/.28

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ
АНТИГЕНОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Шаповалова О.В.

**Национальный фармацевтический университет,
г. Харьков, Украина
e-mail: biotechnology.nuph@gmail.com**

Проблема эффективной диагностики лейкоза крупного рогатого скота на сегодня остается актуальной как в странах, где регистрируется лейкоз, так и на свободных от заболевания территориях. На международном и государственном уровне соответствующими нормативными документами Международного эпизоотического бюро (МЭБ), Европейского сообщества (ЕС) и ветеринарным законодательством различных стран в качестве основных диагностических тестов регламентируется применение реакции иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментного анализа (ИФА), которые позволяют выявлять инфицированных животных по наличию антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) как в сыворотке крови, так и в пробах молока [1, 2, 3].

Эффективность этих диагностических методов определяется качеством применяемых тест-систем, что напрямую зависит от специфичности используемых в них антигенов вируса. Традиционно с целью диагностики заболевания используются культуральные антигены возбудителя, нарабатываемые в хронически инфицированной перевиваемой культуре клеток FLK-BLV. Альтернативой этим препаратам являются рекомбинантные антигены ВЛКРС, которые имеют определенные преимущества, так как являются более активными и дешевыми.

Целью работы было проведение анализа теоретических и практических подходов при разработке рекомбинантных антигенов возбудителя лейкоза крупного рогатого скота, изложенных в литературных источниках по проблеме конструирования и применения антигенов вируса лейкоза крупного рогатого скота с диагностической целью.

Анализ данных литературы свидетельствует, что в последние десятилетия рекомбинантные белки широко применяются при серологических исследованиях ретровирусов, в том числе и ВЛКРС. Разработаны многочисленные протоколы, позволяющие изучать экспрессию иммунодоминантных антигенов вируса р24 и гр51 в гетерологичных трансформированных системах (*Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, вирус осповакцины, бакуловирусы), а также очищать целевые продукты.

Первые исследования в данном направлении были начаты в конце 80-х годов прошлого века.

Объектом научных разработок первоначально служили клетки дрожжей рода *Saccharomyces*. Были сконструированы экспрессирующие плазмиды, в составе которых находились последовательности, кодирующие антигены гр51 или (гр51+ гр30) вируса лейкоза, и дрожжевые промоторы РН05 и РГК. При исследовании методом вестерн-блоттинга и радиоиммуноанализа в экспрессируемом продукте показано наличие 4 антигенных детерминант. Полученный рекомбинантный антиген был частично гликозилирован и обнаруживался внутри дрожжевых клеток [4].

Другой группой исследователей в аналогичной экспрессирующей системе был получен частично гликозилированный внутриклеточный антиген гр51 [5]. Его выход и реактивность в ИФА были низкими, но при иммунизации кроликов препарат индуцировал синтез высокого уровня антител к нативному гр51, хотя эти антитела и не обладали вируснейтрализующей способностью.

Система экспрессии белка р24 в дрожжевых клетках позволила получить устойчивый к протеолизу антиген, который накапливался внутриклеточно и составлял до 10% выявляемого белка [6].

Первые публикации о конструировании гетерогенных систем, экспрессирующих антигены ВЛКРС на основе бактериальных клеток, появились в 1989 г. Авторы исследовали возможность экспрессии гена *gag* клетками *E. coli*. Фрагмент ДНК, кодирующий белок р24, встраивали в экспрессирующий вектор рORF1. Полученный бактериальный рекомбинантный антиген выявлялся сывороткой инфицированных ВЛКРС коров и моноклональными антителами (МАТ) против нативного белка р24 в иммунологических реакциях [7].

Создание конструкций с использованием шести экспрессирующих плазмид, содержащих фрагменты гена *env* ВЛКРС длиной 1.224 bp, позволило в цельноклеточном экстракте трансформированных *E. coli* обнаружить полипептиды, два из которых, имевших молекулярную массу 150-160 kDa и 60 kDa, реагировали с сывороткой от естественно инфицированных животных и МАТ против гр51 [8].

Разработанная немецкими учеными бактериальная конструкция, содержащая плазмиды, полученные с использованием векторов рЕХ, которые кодировали группу протеинов ВЛКРС – р24, р12, гр30 и различные участки гр51, экспрессировала гибридные белки с молекулярной массой более 117 kDa, распознаваемые МАТ против эпитопов гр51 и р24. При применении другого вектора фрагмент ДНК, кодирующий гр51, при экспрессии был гибридизован с 100 аминокислотами MS2 полимеразы и реагировал с МАТ против гр51 [9]. Синтезируемый в бактериальной системе гибридный протеин, содержащий β-галактозидазу и около 70% р24, был испытан в ИФА для детекции антител против вируса лейкоза. Он выявлял 97% образцов из пула позитивных полевых сывороток. [10]. Белки р24 и фрагменты гр51, связанные с MS2 полимеразой, уровень экспрессии

которых составлял 3-25% от общего белка клеток, выявлялись в иммунологических реакциях с сывороткой кроликов и коров против ВЛКРС, а также МАТ [11].

Для получения рекомбинантных антигенов ВЛКРС, которые могут применяться с диагностической или профилактической целью, обычно используют участки ДНК, выделенные из клеток культуры FLK-BLV или из лимфоцитов естественно инфицированного вирусом крупного рогатого скота (КРС). Антигены, полученные в различных экспрессирующих системах, активно изучают в качестве компонентов иммунологических диагностических реакций – иммуноблоттинга, РИД и ИФА.

Так, гибридный белок с молекулярной массой 38 кДа, продуцируемый трансформированными клетками *E. coli*, выявлялся в иммуноблоттинге с МАТ против р24 и сыворотками крови от коров и овец, инфицированных ВЛКРС. Полученный клон *E. coli* содержал плазмиду рТ7His-р24 и после индукции изопропил-1-тио-D-галактозидом (IPTG) экспрессировал гибридный белок тиоредоксин-6хHis-р24, для очистки которого применяли метод металл-хелатной аффинной хроматографии с конечным выходом 55 мг/дм³ [12].

Другим подходом к усовершенствованию серологической диагностики лейкоза с применением рекомбинантного белка р24 является опыт по получению поликлональных антител к его компонентам, применение которых в качестве первичных иммобилизованных антител в ИФА было успешно апробировано [13]. Гибридный капсидный белок ВЛКРС был получен в бактериальной экспрессирующей системе с использованием плазмиды рGEX. При этом полученный протеин был связан с С-терминальным участком глутатион S-трансферазы (GST). После экспрессии очистка GST-меченного целевого продукта с высоким выходом включала процедуры аффинной хроматографии на иммобилизованном глутатионовом матриксе и расщепления с помощью тромбина. При создании гибридной конструкции фрагмент, кодирующий ген *gag*, был выделен из клеток FLK-BLV. Экспрессирующая плаزمиды рGEX/р24 была получена в трансформированных клетках *E. coli* DH5αF'IQ. Экспрессия гибридного белка происходила в культуре трансформированных бактериальных клеток *E. coli* DH5α после IPTG-индукции. После промывания, лизиса, ультразвукового разрушения клеток, добавления ингибитора протеаз PMSF очистку рекомбинантного р24 проводили на глутатион-агарозе 4В и последующей обработки 20% тромбином КРС. При этом выход белка составил 7 мг/см³, аго антигенные свойства были подтверждены в вестерн-блоттинге с анти-р24-МАТ.

С целью получения анти-GST-поликлональных антител в бактериальной системе нарабатывали рекомбинантный GST-меченный белок, который вводили цыплятам, сыворотку крови которых после 9 циклов иммунизации использовали в ИФА.

Полученные антитела против GST служили первичными антителами в реакции. Такая модификация сендвич-ИФА универсальна и позволяет проводить быстрый качественный и количественный скрининг способности различных трансформированных бактериальных клонов экспрессировать гибридные GST-меченные протеины.

При диагностическом выявлении специфических антител против р24 ВЛКРС данный метод с использованием антител птиц имеет преимущества, поскольку иммобилизованные анти-GST-поликлональные антитела связываются с С-терминальным участком рекомбинантного GST-меченного р24, а его иммунодоминантные эпитопы, расположенные на N-конце молекулы, остаются свободными и могут выявляться в реакции с испытуемыми сыворотками (вторичными антителами). Таким образом, имеет место максимально доступная для антител презентация антигена, а также исключается возможность развития перекрестных реакций со вторичными антителами из сыворотки крови млекопитающих. Разработанная модификация ИФА характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, а также может быть адаптирована для разнообразных белковых антигенов.

Н. Momtaz и соавт. получен рекомбинантный белок рЕТ-28(а)-р24 в бактериальной системе *E. coli* BL21(DE3) с использованием фрагмента гена *gag*, амплифицированного из ДНК провируса ВЛКРС, изолированного из лимфоцитов инфицированной коровы, вектора клонирования рTZ57R/T, вектора экспрессии рЕТ-28(а), индукции с помощью IPTG и очистки методом металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA колонке. Экспрессия белка подтверждена методом гель-электрофореза и иммуноблоттинга, что послужило основанием его применения для выявления антител против антигена р24 у инфицированных и вакцинированных животных [14].

На основе рекомбинантного антигена р24 был разработан непрямой ИФА-тест (г-р24-ELISA) для выявления антител у КРС. Данная разработка базировалась на применении фрагмента генома провируса ВЛКРС, выделенного из опухоли бельгийского скота [15]. Амплифицированный фрагмент ДНК провируса клонировали в вектор экспрессии рBADThio/ТОРО, которым трансформировали клетки *E. coli* TOP10. Отобранные после трансформации ампициллин-устойчивые клоны р24/Thio-ТОРО выращивали в селективной среде Лурия-Бертани (LB) с добавлением ампициллина и арабинозы для индукции экспрессии целевого белка. Полученный рекомбинантный р24 очищали в нативных условиях с использованием никель-хелатной аффинной хроматографии. Сравнительные исследования выделенного антигена при тестировании более 700 проб сыворотки крови КРС в ИФА показали хорошую повторяемость и воспроизводимость результатов, а также более высокую аналитическую чувствительность метода по сравнению с РИД. Полученные результаты позволили авторам

рекомендовать новую тест-систему для скрининга ВЛКРС-инфекции в Аргентине.

D. Qualley был разработан протокол клонирования, экспрессии и очистки полноразмерного белка р24 ВЛКРС, как модельного объекта при изучении иммунодоминантных белков дельтатретовирусов. Процедура включала трансформацию клеток *E. coli* NovaBlue, получение клонов, содержащих ДНК, кодирующую белок Gag ВЛКРС, и экспрессирующей плазмиды, которую встраивали в клетки *E. coli* Rosetta-2(DE3)pLysS. Клетки-продуценты рекомбинантного белка выращивали в среде LB с добавлением 100 мкг/см³ ампициллина и 34 мкг/см³ хлорамфеникола с последующей индукцией экспрессии с помощью IPTG в конечной концентрации 1мМ. Дальнейшие манипуляции предусматривали этапы замораживания, осаждения и лизиса клеток, удаления нуклеиновых кислот и преципитирования белка насыщенным раствором сульфата аммония и полиэтиленгликолем. Конечную очистку рекомбинантного продукта проводили методом металл-аффинной хроматографии, при этом элюирующий буфер содержал различные концентрации имидазола. Полученные фракции белка Gag распределяли по молекулярному весу с использованием мембранных фильтров и метода гель-фильтрации, определяли в них содержание белка и проводили анализ их конформационной способности по сравнению с белками других ретровирусов [16].

Известно, что основную роль в обеспечении биологических свойств поверхностных белков ВЛКРС играет их гликозилирование. Для распознавания экспрессируемого в *E. coli* рекомбинантного антигена gp51 ВЛКРС в иммунологических реакциях его конформационные эпитопы (F, G, H), расположенные на N-конце молекулы, должны быть точно гликозилированы. Напротив, считается, что функционирование последовательностных эпитопов gp51, расположенных на C-конце молекулы, не зависит от посттранскрипционного гликозилирования [17, 18, 19].

Для решения проблемы получения иммунологически активных рекомбинантных гликопротеинов, подобных естественным по структуре и свойствам, была предложена экспрессирующая система на основе эукариотических клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом (Baculovirus Expression Vector Systems, BEVS). Линии клеток насекомых обычно используются для получения рекомбинантных белков с высоким выходом, что трудно достичь в других экспрессирующих системах. Кроме того, в результате посттрансляционных модификаций полипептидных цепей, включающих гликозилирование, экспрессируемые в клетках насекомых белки имеют правильную биологически активную структуру.

В системе клеток насекомых вида *Spodoptera frugiperda* Sf-21, зараженных бакуловирусом, несущим фрагменты нуклеиновой кислоты вируса лейкоза, была экспрессирована конструкция gp51-p30 ВЛКРС и проведены исследования лизатов инфицированных

клеток на наличие рекомбинантных продуктов и их иммунологическую реактивность. Авторы установили, что полученный рекомбинантный гликопротеин содержал углеводные остатки, включающие N-ацетилглюкозамин, маннозу, галактозу и сиаловую кислоту, аналогичные нативным компонентам гликопротеина ВЛКРС. Была изучена кинетика процесса транскрипции и трансляции гликопротеина, а также подобраны реагенты и условия для его извлечения из трансформированных клеток [20].

Рекомбинантный антиген gp51, проявляющий активность и специфичность в реакциях вестерн-блоттинга, ИФА и РИД, был получен группой A. Giuserpe в экспрессирующей системе клеток Sf-21 [21]. При конструировании экспрессирующей плазмиды pCRgp51 геномную ДНК экстрагировали из клеток FLK-BLV. В качестве рекомбинантного трансферного вектора применяли созданную конструкцию pB4gp51, которой совместно с линейной вирусной ДНК Vac-N Blue ко-трансфицировали клетки Sf-21. В результате был сконструирован несущий ген *env* рекомбинантный бакуловирус Vac-rgp51, который и служил источником рекомбинантного гликопротеина rgp51 ВЛКРС. Были получены различные фракции целевого гликопротеина с молекулярной массой 32 кДа и 48-50 кДа. Хотя степень и правильность их гликозилирования отличалась от нативного гликопротеина ВЛКРС, их антигенные свойства в ИФА не были изменены. При этом антиген экскретировался в культуральную жидкость. Авторы объясняют способность созданной ими экспрессирующей системы продуцировать экскретируемый гликопротеин наличием сигнальной последовательности из 33 аминокислот, расположенных на N-конце молекулы. Экспрессия гликопротеина в секретируемой форме, отсутствие белковой и вирусной контаминации при выращивании клеток насекомых в бессывороточной среде, а также возможность получения антигена в больших количествах свидетельствует о преимуществах данного метода его наработки. ИФА с выделенным антигеном rgp51 проявил высокую чувствительность и специфичность, обладал высокой воспроизводимостью при исследовании как индивидуальных образцов, так и пула проб полевых сывороток, и был предложен для мониторинга инфекции ВЛКРС.

Рекомбинантный гликопротеин ВЛКРС, продуцируемый системой BEVS, был также предложен как альтернатива культуральному антигену для РИД [22]. Поверхностный гликопротеин ВЛКРС (gp51/gp30_T), состоящий из gp51 и gp30, лишённого C-терминального трансмембранного домена, получали с использованием клеток насекомых линий Sf-9 и Hi-five под контролем бакуловирусного промотора. Экспрессируемый рекомбинантный gp51/gp30_T содержал сигнальный пептид (аминокислоты 1-409), имел молекулярную массу 62 кДа и секретирувался в культуральную жидкость. Сконцентрированный по предложенной методике препарат обладал специфической активностью в реакциях

иммунофлюоресценции, ИФА и вестерн-блоттинга с соответствующими МАТ и ВЛКРС-специфической сывороткой крови телят. РИД, разработанная с полученным антигеном, при исследовании полевых проб сывороток показала более высокую чувствительность и специфичность, чем традиционная реакция с культуральным антигеном, при этом результаты РИД были подтверждены данными ПЦР и ИФА с коммерческими тест-системами.

Известно, что методы, применяемые для очистки рекомбинантного протеина gp51, продуцируемого в бакуловирусной системе, могут быть мало эффективными из-за образования агрегатов белка. Это может быть обусловлено его неполным гликозилированием. Чтобы избежать данных артефактов, было предложено получение редуцированной формы рекомбинантного гликопротеина, а также использование двух методов аффинной хроматографии - как раздельное применение методов иммобилизующей металл-аффинной хроматографии (ИМАС) и Strep-Tactin аффинной хроматографии, так и их последовательное использование. При этом метод одношаговой металл-аффинной хроматографии в отношении гексагистидин-содержащего белка успешно дополнялся альтернативным методом высокоселективного связывания стрептавидина с гибридными белками Strep-tagII. При этом очистка происходила в физиологически толерантных условиях с сохранением биологических свойств конечных продуктов. В применении к гликопротеидам ВЛКРС были проведены исследования по получению на клетках Sf-21 двух секретируемых рекомбинантных антигенов - $\Delta_{175-268}gp51-His$ и $\Delta_{175-268}gp51-STH$, которые не содержали С-концевые эпитопы А, В, В', D, D', но имели конформационные эпитопы антигена. Для этого были сконструированы рекомбинантные бакуловирусы, экспрессирующие первые 174 аминокислоты на N-конце молекулы gp51, а на С-конце - 6xHis tag и Strep-II/6xHis tag соответственно. Очистку и концентрирование белков проводили методами ИМАС на Ni-NTA-матрикс и Strep-Tactin-хроматографии с Strep-Tactin-матриksom в экспериментально отработанной последовательности. В результате был достигнут выход рекомбинантного белка на уровне 59-64%. При этом он сохранял функциональность после нескольких циклов замораживания-оттаивания и проявлял специфическую активность в ИФА [23].

Для иммунодиагностики лейкоза КРС также был предложен рекомбинантный белок p24, экспрессируемый в культуре клеток насекомых Sf-21. Молекулярные особенности полученной конструкции - наличие последовательностей гексагистидина и эпитопа V5 (пептида из 14 аминокислот, полученного из белков Р и V парамиксовируса обезьян SV5) - облегчали выявление и очистку целевого антигена. Источником геномного материала для создания гибридного бакуловируса служил 642 bp фрагмент ДНК клеток FLK-BLV, соответствующий гену gag ВЛКРС. Промежуточные этапы создания гибридного

антигена включали использование коммерчески доступного вектора экспрессии AcMNPV для создания рекомбинантного бакуловируса p24RBV, что исключило необходимость применения рекомбинантных клеток бактерий. Также были использованы вставки генов *HSV1tk* и *lacZ*, в результате чего в присутствии ганцикловира экспрессия нетрансформированного бакуловируса ингибировалась, а степень чистоты вируса контролировалась по наличию β -галактозидазы. Очистку рекомбинантного антигена проводили методом одношаговой металл-аффинной хроматографии. Его специфичность была подтверждена с помощью вестерн-блоттинга с МАТ против белка p24 и сыворотками крови инфицированных и свободных от ВЛКРС коров. На основании этих результатов был предложен быстрый, чувствительный и специфичный in-house ИФА-тест с применением полученного рекомбинантного антигена gp24 [24].

Направление исследований по созданию рекомбинантного антигена для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммунодиффузии включает работы Горбатенко С.К. и соавторов, которыми были проведены эксперименты по разработке метода создания генно-инженерного препарата, содержащего основные антигены вируса (p24 и gp51), с использованием бактериальной экспрессирующей системы [25].

Работа проводилась поэтапно, включая разработку рекомбинантной бактериальной конструкции, экспрессирующей антигена p24 и gp51 вируса лейкоза, выделения, очистки рекомбинантного антигена и определения его активности в РИД. Данные о топографии таргетного гена в геноме были получены с помощью баз данных национального центра биотехнологической информации (NCBI). Расчет праймеров проводили с помощью компьютерных программ Clone Manager 7.0 и Amplifx 1.1. Клонирование целевого гена, подготовку химически компетентных клеток *E. coli*, трансформацию и экспрессию генов проводили по J. F. Sambrook [26].

Для получения трансформированного клона бактерий была сконструирована рекомбинантная плаزمида pUC19- EcoRI- colprom-SmaI-полилинкер-VamHI - env- EcoRI-gag - HindIII - pUC19, которая содержала нуклеотидные последовательности полнофункциональных генов *env* и *gag* ВЛКРС. Полученной конструкцией трансформировали клетки *E. coli* HB101, в результате чего был отобран положительный клон *E. coli* HB101-2, для которого эффективность встраивания фьюжн-последовательности участков, кодирующих gp51 и p24 ВЛКРС, была подтверждена при проведении скрининга с помощью специально созданных олигонуклеотидов.

Клон *E. coli* HB101-2 выращивали на мясо-пептонном бульоне с добавлением экстракта дрожжей и NaCl до конечной концентрации 5 г/дм³ и 10 г/дм³ соответственно. Культивирование проводили в

течение 18 часов при температуре 37°C на шейкер-аппарате с режимом встряхивания (100-120) об/мин. Экспрессию антигенов ВЛВРХ стимулировали добавлением 1 мМ IPTG.

Для выделения антигена бактериальную массу подвергали двукратному замораживанию-оттаиванию, разрушению ультразвуком при максимальной мощности в режиме 15x20 секунд с последующей фильтрацией через мембраны с диаметром пор (0,1-0,22) мкм.

Активность и специфичность изготовленного антигена определяли в РИД с использованием контрольных положительной и отрицательной диагностических лейкозных сывороток, сыворотки эмбрионов КРС по унифицированной методике по сравнению со стандартизированным культуральным антигеном ВЛКРС. Результаты изучения активности и специфичности полученного антигена (АГ-IPTG) в РИД показали, что полученный рекомбинантный антиген был активным, но недостаточно специфичным в РИД, поскольку образовывал две линии преципитации с контрольной положительной сывороткой и положительно реагировал с отрицательной диагностической лейкозной сывороткой.

Авторы предположили, что выявление дополнительной линии преципитации с положительной контрольной сывороткой и реакция с отрицательной контрольной сывороткой могли быть обусловлены наличием в препарате бактериальных антигенов. Поэтому для повышения специфичности полученного препарата был применен метод адсорбции коммерческой сывороткой против эшерихиоза сельскохозяйственных животных (СЭ). Для этого АГ-IPTG и нативную СЭ смешивали в равных соотношениях, выдерживали 30 мин. при температуре 24°C и осаждали центрифугированием при 2500 об./мин. в течение 30 мин.

Результаты изучения активности и специфичности полученного супернатанта в РИД показали, что после адсорбции специфичность рекомбинантного антигена эффективно повышалась, о чем судили по отсутствию дополнительных линий преципитации между адсорбированным антигеном и контрольными положительной и отрицательной диагностическими сыворотками, а также с эшерихиозной сывороткой.

Таким образом, каждая из известных гетерологических систем, экспрессирующих иммунодоминантные рекомбинантные антигены p24 и gp51 ВЛКРС, имеет ряд преимуществ и недостатков. На сегодняшний день наиболее доступной и эффективной является бактериальная экспрессирующая система, позволяющая получать активный и специфичный антигенный продукт при условии создания оптимальных векторных конструкций и использования коммерчески доступных систем для очистки методом металл-аффинной хроматографии и контроля с применением соответствующих МАТ.

Кроме того, современные научные и методические подходы при решении проблем серологической диагностики вирусных заболеваний позволили предложить альтернативу культуральным и рекомбинантным антигенам возбудителей. В отношении лейкоза КРС в этом качестве были испытаны синтетические пептиды, мимикрирующие важнейшие антигенные эпитопы ВЛКРС [27]. Технология фагового дисплея и иммунологической селекции, с использованием библиотеки фагов Ph.D. – 12TM и очищенных IgG, выделенных из сыворотки больных лейкозом животных, позволила авторам отобрать пептиды, аналогичные p24 и gp51 вируса лейкоза, специфически реагирующие в ИФА и дот-блоттинге и позволяющие распознавать противолейкозные антитела.

В заключение необходимо отметить, что многие научные разработки последних лет легли в основу создания разнообразных тест-систем для выявления антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота, которые на сегодня широко представлены на рынке диагностических препаратов. Хотя при этом большинство производителей отдают предпочтение рекомбинантным антигенам возбудителя, поисковые исследования по усовершенствованию и удешевлению способов получения различных диагностических антигенов не утрачивают актуальности.

References

1. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Electronic resource]. – 2008. - ch. 2.4.11 Enzootic Bovine Leukosis. – P. 729-738. – Access mode: <http://www.oie.int> –Title from the screen.
2. Council Directive of 11 november 1980 amending Directive 64/432/EEC with regard to enzootic bovine leukosis (80/1102/EEC).
3. Council Directive of 14 june 1988 amending Directive 64/432/EEC 88/406/EEC as regards enzootic bovine leukosis and repealing Directive 80/1102/EEC (88/406/EEC).
4. Expression of env sequences of the bovine leukemia virus (BLV) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [Text]/ S. Brantl [et al.]// *Yeast*. – 1988. - 4(1). – P. 47-59.
5. Biochemical and immunological characterization of the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in *Saccharomyces cerevisiae*[Text]/ M. Legrain[et al.]// *Gene*. – 1989. - 79(2). – P. 227-237.
6. High yield synthesis of the bovine leukemia virus (BLV) p24 major internal protein in *Saccharomyces cerevisiae* [Text]/ J. Dumont [et al.]// *Gene*. – 1989. - 79(2). – P. 219-226].
7. Zajac, V. Bacterial expression of the p24 gag protein of the bovine leukaemia virus [Text]/ V. Zajac, K. Sláviková, M. Reinerová// *Folia Biol (Praha)*. – 1989. - 35(1). – P.42-44.
8. Zajac, V. Expression of a bovine leukaemia virus envelope fusion protein in *E. coli* [Text]/ V. Zajac, K. Slavikova// *Folia Biol*. – 1989. - 35. – P.35-41.

9. Synthesis of bovine leukemia virus antigens in *Escherichia coli* [Text]/ R. Ulrich [et al.]// Arch Exp Veterinarmed. – 1990. - 44(6). – P. 909-916.
10. New ELISA test for detection of bovine leukemia virus infections in cattle, using bacterially synthesized p24 [Text]/ H. Siakkou [et al.]// Arch Exp Veterinarmed. – 1990. - 44(6). – P. 925-930.
11. Expression of bovine leukaemia virus antigens fused to MS2 polymerase in *E. coli* [Text]/ R. Ulrich [et al.]// Acta Virol. – 1991. - 35(4). – P.391-395.
12. Expression of bovine leukemia virus protein p24 in *Escherichia coli* and its use in the immunoblotting assay [Text]/ L. Bicka [et al.]// Acta Biochim Pol. – 2001. - 48(1). – P. 227-232.
13. Juliarena, M. Chicken antibodies: a useful tool for antigen capture ELISA to detect bovine leukaemia virus without cross-reaction with other mammalian antibodies [Text]/ M. Juliarena, S. Gutierrez, C. Ceriani// Vet Res Commun. – 2007. - 31(1). – P. 43-51.
14. Momtaz, H. Expression of Bovine leukemia virus p24 Protein in Bacterial Cell [Text]/ H. Momtaz, F. Hemmatzadeh, H. Keyvanfar// Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2008. - Vol. 11, Issue 20. – P. 2433-2437.
15. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA [Text]/ G. Gutierrez [et al.]// Veterinary Microbiology. – 2009. – 137. – P. 224–234.
16. Qualley, D.F. Expression, purification, and characterization of full-length bovine leukemia virus Gag protein from bacterial culture [Text]/ D.F. Qualley, B.L. Boleratz// Protein Expr Purif. – 2014. – 93. – P. 32-37.
17. Mapping of sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukaemia virus external glycoproteins expressed in *Escherichia coli* by means of anti-peptide antibodies [Text]/ J. Ban [et al.]// J Gen Virol. – 1992. - 73 (Pt 9). – P.2457-2461.
18. [Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein GP51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability][Text]/ C. Bruck [et al.]// Viriology. - 1984. - V. 136-1. — P. 20-31.
19. [Envelope glycoprotein gp51 of bovine leukemia virus is differently glycosylated in cells of various species and organ origin [Text]/ C. Altaner [et al.]// Vet Immunol Immunopathol. – 1993. - 36(2). – P. 163-177.
20. Expression of bovine leukemia virus ENV glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus [Text]/ S. Russo [et al.]// FEBS Lett. – 1998. - 436(1). – P. 11-16.
21. Expression of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein (gp51) by Recombinant Baculovirus and Its Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [Text]/ Antonio De Giuseppe [et al.]// Clin Diagn Lab Immunol. – 2004. - 11(1). – P. 147–151.
22. Agar gel immunodiffusion analysis using baculovirus-expressed recombinant bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51/gp30_T-) [Text]/ Seong In Lim [et al.]// J. Vet. Sci. – 2009. - 10(4). – P. 331-336.
23. Purification by Strep-Tactin affinity chromatography of a delete envelope gp51 protein of Bovine Leukaemia virus expressed in Sf21 insect cells [Text]/ A. De Giuseppe [et al.]// Protein J. – 2010. - 29(3). – P. 153-160.
24. Expression of p24 gag protein of bovine leukemia virus in insect cells and its use in immunodetection of the disease [Text]/ A. Larsen [et al.]// Mol Biotechnol. – 2013. - 54(2). – P. 475-483.
25. The patent for utility model № 101576 A Ukraine, IPC A61K 39/12, A61K 39/40. The method of recombinant antigen producing for the detection of antibodies against bovine leukemia virus in immunodiffusion reaction [Text] / S.K. Gorbatenko [et al.]; NSC "IECV" NAASU. - № 201501875; appl. 03/03/2015; publ. 09.25.2015, Bull. № 18. - 4 p.
26. Molecular cloning: a laboratory manual [Text] : in 3 vol. / ed.: J. F. Sambrook, D. W. Russell. — 3rd ed. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. — 2100 p.
27. Selection of ligand peptides with the ability to detect antibodies in enzootic bovine leukosis [Text]/ E.M. dos Santos [et al.]// African Journal of Biotechnology. - 2012. - Vol. 11(28). – P. 7302-7312.

UDC 619:616.98:578.828.11-078:578.74:575.116.12:636.22/28

THE THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS OF THE RECOMBINANT ANTIGENS FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE LEUKEMIA PRODUCTION

Shapovalova O.V.

Introduction. Nowadays the problem of bovine leukemia (EBL) effective diagnosis in countries where EBL is registered and the disease-free areas remains actual. The main diagnostic tests are immunodiffusion reaction (AGID) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which allow the identification of infected animals by the presence of antibodies to bovine leukemia virus (BLV) both in serum and in milk samples. The effectiveness of these methods depends on the quality of diagnostic test systems used and determined by the cultural and recombinant virus antigens specificity. EBL recombinant antigens have certain advantages as they are more active and cheap. **Purpose of the work.** The analysis of theoretical and practical approaches in the bovine leukemia virus recombinant antigens development and its diagnostic potential evaluation. The article contains data from the literature on the recombinant antigens of bovine leukemia virus construction and use. Analysis of the literature showed that the recombinant proteins are widely used in the serological diagnosis of bovine leukemia. Numerous protocols of BLV gp51 and p24 immunodominant antigens preparation has been developed in heterologous systems (*Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, vaccinia virus, baculovirus). In order to obtain recombinant antigens, the BLV provirus genome regions isolated from FLK-BLV cell culture, lymphocytes or tumor cells from naturally infected cattle are typically used. For the recombinant antigens labeled by hexahistidine or Srept II purification one-step immobilized-metal affinity chromatography IMAC and highly selective Strep-Tactin affinity chromatography methods are carried out. The end products activity and specificity are studied in the immunoblotting, ELISA and

AGID diagnostic reactions. The ukrainian scientists' publications are devoted to the clone *E. coli* HB101-2 transformed by the recombinant plasmid containing fully functional BLV *env* and *gag* genes nucleotide sequence construction. The efficiency of BLV gp51 and p24 encoding regions fusion-sequence integration was confirmed by the screening with the specially designed oligonucleotides. The recombinant antigen expression was induced by addition of IPTG. To isolate the antigen bacterial mass was destroyed by defrostation and ultrasonic disintegration in the experimentally selected modes. The activity and specificity of the antigen was determined by AGID with the use of the bovine fetal serum, positive and negative reference diagnostic serum by unified method in comparison with the standardized cultural BLV antigen in AGID. The antigen specificity was increased by adsorption with commercial anticolibacillosis serum. The antigen activity was confirmed by AGID. **Conclusions.** Nowadays the most promising BLV antigens expressing genetic constructions with *E. coli* and baculovirus. *E. coli* recombinant strains are the most available and effective using expressing system, which allows to get an active and specific antigenic product if an optimal vector constructions and commercially available systems of metal affinity chromatography purification and control with appropriate Mab are used. As an cultural and recombinant antigens alternative the mimicking critical BLV antigenic epitopes synthetic peptides were tested. In recent times many scientific works formed the basis for the bovine leukemia diagnostic test systems' creation, which are now widely available on the biotechnological products market. Although the majority of manufacturers prefer the recombinant antigens of the pathogen, pilot studies on more improved and cheaper ways to obtain different diagnostic antigens preparations shall not lose relevance. **Keywords:** bovine leukemia virus, bovine leukemia, recombinant antigens, diagnosis.