

Ветеринарная вирусология, иммунология

УДК 636.4:619:578:577.2.08:51-76

doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1251rus

**ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК I329L
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ*****С.А. КАТОРКИН, Е.И. КАТОРКИНА, К.А. МИМА, И.А. ТИТОВ,
А.С. МАЛОГОЛОВКИН**

Вирус африканской чумы свиней (АЧС, African swine fever virus, ASFV) — крупный ДНК-содержащий вирус, единственный представитель семейства *Asfarviridae*. Вирус АЧС обладает разнообразными механизмами уклонения от иммунной системы хозяина, что становится препятствием для создания средств защиты от болезни. Один из способов иммунного уклонения, используемых вирусом, — мимикрия Toll-подобных рецепторов (TLR) иммуномодулирующими белками. Иммуномодулирующие белки вируса АЧС можно рассматривать как потенциально ценные инструменты для понимания патогенеза заболевания и создания средств борьбы с ним. Так, белок pI329L служит антагонистом и ингибитором сигнального пути TLR3, уменьшающим интерфероновый ответ. Белок pI329L ингибирует TLR3-опосредованную активацию NF-κB и индукцию INF-β через активацию TLR3 с его лигандом — вирусной ДНК, РНК и poly(I:C). Удаление этого белка из ASFV служит рациональным подходом к разработке ослабленной вирусвакцины. Следовательно, I329L представляет собой вирусный антагонист TLR3, что негативно отражается на интерфероновом противовирусном ответе хозяина. Целью настоящей работы было получение клеточной линии CHO (клетки яичника китайского хомячка), стабильно экспрессирующей рекомбинантный белок I329L ASFV. Нами сконструирована плаزمиды pBMN-I329-his, несущая полноразмерный ген I329L ASFV с полигистидиновой меткой (His-tag) на C-конце. При помощи электропорации и культивирования в среде с антибиотиком пурамицином была получена стабильная клеточная линия CHO-I329L-His, несущая рекомбинантную плазмиду pBMN-I329-his. Встраивание гена I329L в геном клеток выявляли в ПЦП с геноспецифическими праймерами с последующим нуклеотидным секвенированием, используя в качестве матрицы ДНК, выделенную из клеток CHO-I329L-His. С помощью иммуноблоттинга подтверждено наличие белка I329L в лизате клеток. Размер рекомбинантного белка составлял 55 кДа при расчетной молекулярной массе 35 кДа. Последовательное дегликозилирование целевого белка эндогликозидазами PNGase и Endo H приводило к увеличению его электрофоретической подвижности и детектированию спейсифических полос ~ 37 и ~ 35 кДа. Этот факт подтверждает высокую степень гликозилирования целевой молекулы, что приводит к меньшей электрофоретической подвижности. Дополнительно показано, что рекомбинантный белок I329L взаимодействовал с гипериммунными сыворотками против штамма Ставрополь 01/08 ASFV, что свидетельствовало об его аутентичности вирусному белку. Полученная стабильная клеточная линия CHO-I329L-His депонирована в музей клеточных культур Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии и может быть использована для изучения иммуномодулирующих локусов ASFV.

Ключевые слова: африканская чума свиней, ASFV, сигнальный путь TLR3, экспрессия, рекомбинантный белок pI329L, стабильная клеточная линия.

Африканская чума свиней (АЧС; возбудитель — вирус из семейства *Asfarviridae*, род *Asfivirus*, African swine fever virus, ASFV) — инфекционная болезнь диких и домашних свиней, характеризующаяся высокой летальностью и контагиозностью, сверхострым, острым, подострым и хроническим течением, передающаяся от больных животных и вирусоносителей контактным и алиментарным путем. В Российской Федерации АЧС регистрируется с 2007 года. На протяжении последних лет страна считается территорией стационарного неблагополучия по этому заболеванию (1).

Геном вируса состоит из линейной двухцепочечной ДНК (дцДНК) размером около 170 и 190 т.п.н. в зависимости от изолята. К вирусу АЧС восприимчивы все представители семейства *Suidae*. Основной резервуар вируса — мягкие клещи рода *Ornithodoros* (2). Нуклеотидные последовательности генома референтного штамма Va71V ASFV содержат 150 открытых ра-

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-16-00090).

мок считывания (open reading frame, ORF). В инфицированных ASFV клетках выявлено 95 полипептидов с молекулярной массой от 10 до 220 кДа (1). ASFV обладает разнообразными механизмами уклонения от иммунной системы хозяина, что становится основным препятствием для создания средств защиты от болезни (3). Один из используемых вирусом способов иммунного уклонения основан на мимикрии Toll-подобных рецепторов (TLR). Эти рецепторы ответственны за опознавание вирусной двухцепочечной РНК (ДНК) и активируют врожденный иммунитет (4). На сегодняшний день у млекопитающих известно 13 Toll-подобных рецепторов. Они активируются различными лигандами, в основном структурными компонентами бактерий и вирусов. Рецепторы также различаются адаптерными пептидами, с которыми связываются их цитозольные фрагменты (5).

Один из белков ASFV, участвующих в модуляции опосредованного Toll-подобным рецептором механизма защиты, — рI329L, антагонист и ингибитор сигнального пути TLR3 (6, 7). Функциональный анализ показывает, что рI329L ингибирует TLR3-опосредованную активацию NF-κB и IFN-β через активацию TLR3 с лигандом — вирусной ДНК, РНК или poly (I:C) (8, 9). Следовательно, белок I329L служит вирусным антагонистом TLR3, что негативно отражается на интерфероновом противовирусном ответе хозяина (10). В настоящее время отсутствует какая-либо информация о белке I329L ASFV, циркулирующего на территории России. Нет данных о его генетической стабильности (11, 12), а также инструментов (стабильная клеточная линия) для изучения механизма действия иммуномодулирующего белка рI329L ASFV российского происхождения.

В этой статье нами впервые предоставлены данные о рекомбинантном белке I329L — продуценте клеточной линии млекопитающих (СНО), аутентичном вирусному белку ASFV.

Цель работы — получение стабильной клеточной линии, экспрессирующей рекомбинантный белок I329L вируса африканской чумы свиней.

Методика. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности белка I329L взяты из базы данных UniProt (референсный номер E0WM90). Дизайн плазмиды рBMN-I329L-his моделировали в программе Clone Manager 7.0 («Sci-Ed Software», США). ДНК выделяли из референтного штамма Ставрополь 01/08 ASFV (Государственная коллекция ФГБУ ФИЦВиМ) (20) с помощью набора QIAamp DNA Blood, Mini Kit («Qiagen N.V.», Германия).

Постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли с использованием Phusion полимеразы («NEB», США) согласно инструкции производителя. Реакционная смесь включала 10 мкл 5× Phusion HF буфера, 1 мкл 10 мМ dNTPs, 2 мкл 10 мкМ F329his, 2 мкл 10 мкМ R329his, 1,5 мкл DMSO, 0,5 мкл Phusion DNA Polymerase, 1 мкл вирусной ДНК и 31 мкл стерильной воды. В работе использовали пару праймеров: F329his (прямой) — 5'-TATATAAAGCTTGCCACCATGCTAAGGGTTTTCATA-3', R329his (обратный) — 5'-TATATATCTAGATTATCAATGGTGGTGGTGGTGGTGC-TTCTTCTTGAACATGAA-3'. R329his содержал His-tag пептидную метку на C'-конце. Амплификацию целевого гена проводили по протоколу: предварительная денатурация 5 мин при 98 °С; денатурация 30 с при 98 °С, отжиг праймеров 30 с при 52 °С, элонгация 60 с при 72 °С (25 циклов). Амплифицированный продукт ожидаемого размера был идентифицирован в 1,3 % ТБЕ-агарозном геле с визуализацией бромистым этидием.

ДНК очищали от агарозного геля с помощью набора Gel Extraction Kit («Qiagen N.V.», Германия) согласно инструкции производителя. ПЦР-продукт I329L клонировали по сайтам эндонуклеазного расщепления HindIII

и XbaI («NEB», США) в вектор pBMN («Addgene», США), имеющий гены устойчивости к ампициллину и пурамицину. Лигирование вектора и вставки осуществляли с помощью ДНК-лигазы фага T₄ («NEB», США) в объеме 5 мкл (0,5 мкл 10× лигазного буфера, 1 мкл линейаризованного вектора pBMN, 0,5 мкл ПЦР-продукта *I329L*, 0,5 мкл ДНК лигазы T₄ и 2,5 мкл стерильной воды) при комнатной температуре в течение 1 ч.

Трансформацию клеток *Escherichia coli* штамма XL-10 Gold, генотип endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'(proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)), лигазной смесью проводили стандартным методом теплового шока. ДНК плазмид выделяли с помощью набора Plasmid Mini Kit («Qiagen N.V.», Германия). Выделенные плазмидные ДНК клонов проверяли с помощью аналитической рестрикции с использованием фланкирующих эндонуклеаз HindIII и XbaI. Точность воспроизведения последовательности клонированного фрагмента подтверждали с помощью секвенирования на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3130xl («Applied Biosystems», США).

Трансфекцию клеточной линии СНО (клетки яичника китайского хомячка) осуществляли с помощью электропорации на приборе Gene Pulse Xcell («Bio-Rad», США). Перевиваемую линию клеток СНО культивировали в шейкере-инкубаторе при 37 °С и 5 % CO₂ в среде BalanCD («Irvine», США) с добавлением 500000 ЕД пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 4 мМ L-глутамин. Жизнеспособность и количество живых клеток оценивали при окрашивании 1 % раствором трипанового синего («Gibco», США). Для этого в пробирку отбирали 20 мкл клеточной суспензии, к которой добавляли 80 мкл 1 % раствора трипанового синего (окрашивание мертвых клеток) и затем тщательно перемешивали. Результаты учитывали на автоматическом счетчике клеток NucleoCounter NC100 («ChemoMetec», Дания).

Белок *I329L* ASFV выделяли с помощью магнитных частиц Dyna-Beads His-tag («Thermo Scientific», США). Для дегликозилирования белка *I329L* использовали пептид-N-гликозидазу F (PNGаза F) («NEB», США) и эндогликозидазу H (Endo H) («NEB», США). Детекцию целевого белка осуществляли иммуноблоттингом в 12,5 % полиакриламидном геле с последующим переносом в системе Trans-Blot Turbo («Bio-Rad», США) на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США). Мембрану инкубировали с кроличьими поликлональными антителами к 6× His-tag (HRP) («Abcam», США). Для визуализации реакции применяли хемилюминесцентные реагенты («Advansta», США). Специфичность рекомбинантного белка *I329L* подтверждалась взаимодействием с гипериммунными свиными сыворотками от животных, зараженных штаммом Ставрополь 01/08 ASFV (Государственная коллекция ФГБУ ФИЦВиМ), и коммерческими антивидовыми антителами козы против IgG свиньи, мечеными пероксидазой хрена (HRP) («Santa Cruz Biotechnology», США).

Результаты. В работе использовали ДНК, экстрагированную из культуры клеток костного мозга свиней, инфицированных штаммом Ставрополь 01/08 ASFV. Полученную матрицу использовали при постановке ПЦР с геноспецифическими праймерами (F329his и R329his) для амплификации фрагмента с сайтами рестрикции и последующим клонированием в вектор pBMN. В результате получили ПЦР-продукт размером 1023 п.н. При лигировании соотношение вектора и вставки составило 1:3.

Аналитическая рестрикция по сайтам фланкирующих эндонуклеаз подтвердила наличие специфической вставки гена *I329L* (рис. 1, Б) у четырех клонов. Их верифицировали секвенированием на корректность вставки

и наличие замен или делеций. После сравнительного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей был отобран клон pBMN-I329L-his, идентичный последовательности референсного гена *I329L* штамма Georgia/wb/2007 ASFV (FR682468).

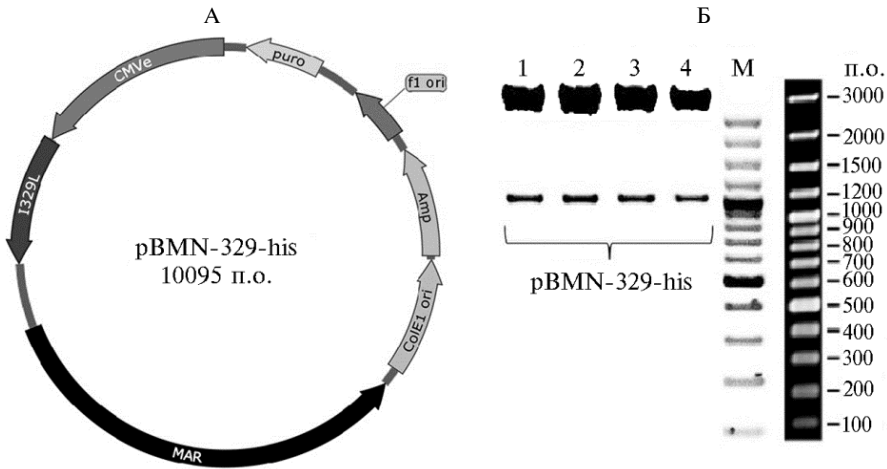


Рис. 1. Схема плазмиды pBMN-I329L-his, несущей целевой ген *I329L* вируса африканской чумы свиней (ASFV) (А), и скрининг клонов плазмиды pBMN-I329L-his с помощью аналитической рестрикции эндонуклеазами *Hind*III и *Xba*I («NEB», США) (Б): 1-4 — клоны №№ 1-4 pBMN-I329L-his, М — маркер молекулярной массы 100 bp Plus («Fermentas», США).

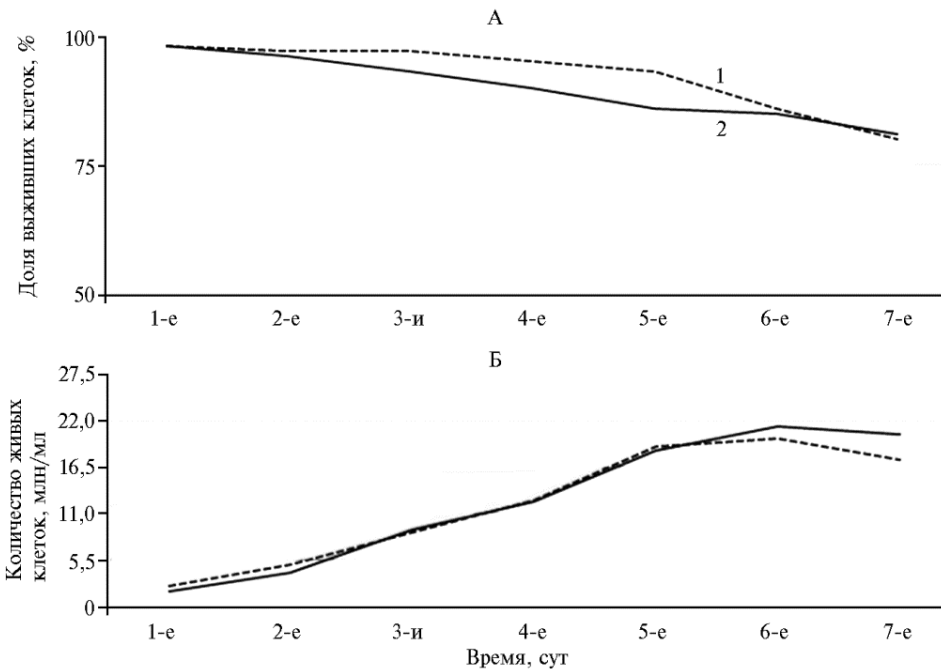


Рис. 2. Жизнеспособность (А) и скорость роста (Б) клеточной линии СНО-I329L-His (1) и исходной клеточной линии СНО (2) в процессе 7-суточного культивирования на среде BalanCD с добавлением 5 мкг/мл селективного антибиотика пурамицина («AppliChem», Германия).

При создании стабильной клеточной линии СНО-I329L-His использовали культуру клеток СНО, находящуюся в фазе логарифмического роста. Жизнеспособность клеток, трансфицированных плазмидой pBMN-I329L-his, оценивали через 24 и 48 ч в тесте с трипановым синим. Через 24 ч после трансфекции клеток СНО плазмидой pBMN-I329L-his жизнеспособность

способность клеток составила 70 %, плотность суспензии живых клеток — 1,0 млн/мл (в контрольной трансфекции без плазмиды эти показатели составили соответственно 92 % и 1,0 млн/мл). Повторный анализ клеток проводили на 48-й ч после трансфекции. При этом доля живых клеток увеличилась до 83 %, количество живых и трансфицированных плазмидой клеток — до 2,2 млн/мл; в контроле показатели возросли соответственно до 94 % и 4,0 млн/мл. Полученные данные подтвердили эффективность трансфекции клеток CHO и возможность их дальнейшей селекции в среде с пурамицином («AppliChem», Германия). Через 48 ч после трансфекции весь пул клеток перенесли в ростовую среду BalanCD с добавлением пурамицина в конечной концентрации 5 мкг/мл.

При модельном 7-суточном суспензионном культивировании мы оценили динамику жизнеспособности и концентрацию жизнеспособных трансфицированных клеток в сравнение с родительской клеточной линией CHO (рис. 2). По результатам эксперимента, 80 % порог жизнеспособности был достигнут только на 7-е сут культивирования. На протяжении 7 сут в стабильной клеточной линии CHO-I329L-His присутствовало более 80 % жизнеспособных клеток.

Интеграцию гена *I329L* ASFV в геном клеточной линии CHO подтвердили в ПЦР, используя в качестве внутреннего положительного контроля референсные праймеры для б-актина (NM_001244575.1) и цитохрома b (AB033693) клеточной линии CHO. В результате последовательности гена *I329L* были выявлены в тотальной геномной ДНК, выделенной из стабильной клеточной линии CHO-I329L-His (рис. 3, А).

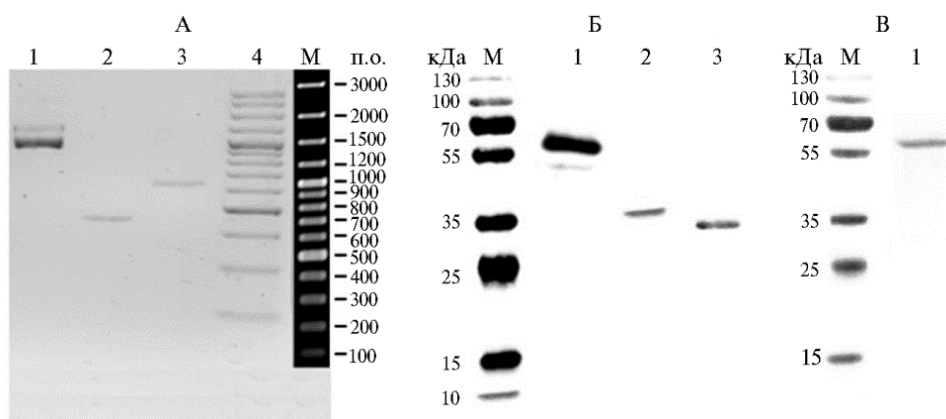


Рис. 3. Анализ интегрирования гена *I329L* вируса африканской чумы свиней (ASFV) и процента клеточной линии CHO-I329L-His методами ПЦР и иммуноблотинга.

А: Выявление гена *I329L* в геноме клеточной линии CHO-I329L-His при электрофоретическом разделении ПЦР-продуктов: 1 — амплифицированный ген *I329L* из клеток стабильной клеточной линии CHO-I329L-His; 2 — амплифицированный ген б-актина из клеток стабильной клеточной линии CHO-I329L-His; 3 — амплифицированный ген цитохрома b из клеток стабильной клеточной линии CHO-I329L-His; М — маркер молекулярной массы 100 bp Plus («Fermentas», США).

Б: Иммуноблотинг рекомбинантного белка I329L ASFV после дегликозирования эндогликозидазами EndoH и PNGaseF при использовании His-taq антител: 1 — белок I329L, выделенный на магнитных частицах DynaBeads His-tag («Thermo Scientific», США); 2 — белок I329L, обработанный эндогликозидазой EndoH («NEB», США); 3 — белок I329L, обработанный эндогликозидазой PNGase F («NEB», США); М — маркер молекулярной массы Page Prestained Ruler («Fermentas», США).

В: Иммуноблотинг рекомбинантного белка I329L, связанного с гипериммунной сывороткой против ASFV: 1 — белок I329L, выделенный на магнитных частицах DynaBeads His-tag («Thermo Scientific», США); М — маркер молекулярной массы Page Prestained Ruler («Fermentas», США).

Анализ экспрессии целевого белка I329L ASFV проводили с помощью иммуноблоттинга с использованием специфических антител к His-tag, находящемуся на С-конце молекулы. Для этого клетки (5×10), отобранные от стабильной клеточной линии, подвергали лизису с последующим концентрированием на магнитных частицах DynaBeads His-Tag. Иммуноблоттинг подтвердил продукцию белка I329L в стабильной клеточной линии СНО-I329L-His. Однако по результатам анализа можно сделать вывод, что продукт экспрессии белка I329L, размер которого находился в пределах 55-60 кДа (см. рис. 3, Б), не соответствовал расчетной молекулярной массе (35 кДа). Этот факт можно объяснить высокой степенью гликозилирования белка I329L, что снижает электрофоретическую подвижность молекулы. Полученные данные также подтверждаются биоинформатическим анализом (установлено наличие 9 сайтов N-гликозилирования) (15, 17). Дополнительно можно наблюдать слабую полосу с молекулярной массой 35 кДа (см. рис. 3, Б), наличие которой может объяснять трансляцию белка с одного из трех стартовых кодонов (ATG) в его экстраклеточной области (17, 18). Следует отметить, что на электрофореграмме также наблюдались следы протеолизного расщепления целевого белка.

В результате обработки рекомбинантного белка I329L эндогликозидазой Endo H или PNG-азой F его молекулярная масса уменьшалась до ~37 (Endo H) и ~35 кДа (PNGазой F), следовательно, исходно экспрессируемый белок I329L был высокогликозилированным (см. рис. 3, Б). Кроме того, молекулярная масса I329L, обработанного PNGазой F, оказалась ниже, чем после расщепления эндогликозидазой Endo H, что указывало на присутствие небольшого количества сложных гликанов.

При анализе связывания I329L с гипериммунной сывороткой от животных, зараженных штаммом Ставрополь 01/08, с помощью иммуноблоттинга наблюдали образование иммунных комплексов I329L с поликлональными антителами к ASFV (см. рис. 3, В).

Таким образом, мы получили стабильную клеточную линию СНО-I329L-His, экспрессирующую рекомбинантный полноразмерный трансмембранный белок I329L вируса африканской чумы свиней ASFV. Клеточная линия СНО-I329L-His обладает схожими фенотипическими и ростовыми свойствами с родительской линией СНО. Рекомбинантный белок I329L ASFV не токсичен для клеток СНО. Встройка гена *I329L* в геном клеток СНО подтверждена методом ПЦР и с помощью анализа экспрессии целевого белка. Выявлено наличие гликозилированных форм белка I329L ASFV. По результатам анализа связывания I329L с гипериммунной сывороткой против ASFV показана его антигенная специфичность. Клеточная линия СНО-I329L-His представляет собой уникальную модель для изучения взаимодействия ASFV с клеткой и создания дефектных рекомбинантных ASFV в качестве кандидатных вакцин. Стабильная клеточная линия СНО-I329L-His депонирована в музей клеточных культур Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии. Культура клеток может быть использована для изучения механизмов действия иммуномодулирующих белков и позволит получить новые данные о биологических свойствах ASFV.

ЛИТЕРАТУРА

1. Середа А.Д., Колбасов Д.В. Белки вируса африканской чумы свиней. Научный журнал Кубанского ГАУ, 2012, 77(3).

2. Gogin A., Gerasimov V., Malogolovkin A., Kolbasov D. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. *Virus Res.*, 2013, 173(1): 198-203.
3. Колбасов Д.В., Балышев В.М., Середва А.Д. Итоги разработки живых вакцин против африканской чумы свиней. *Ветеринария*, 2014, 8: 3-8.
4. Iwasaki A., Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, 2004, 5(10): 987-995 (doi: 10.1038/ni1112).
5. Yamashita M., Chattopadhyay S., Fensterl V., Zhang Y., Sen G.C. TRIF-independent branch of TLR3 signaling. *J. Immunol.*, 2012, 188(6): 2825-2833 (doi: 10.4049/jimmunol.1103220).
6. Jin M.S., Lee J.O. Structures of TLR-ligand complexes. *Immunity*, 2008, 29(2): 182-191 (doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.007).
7. Rodriguez J.M., Salas M.L., Vinuela E. Genes homologous to ubiquitin-conjugating proteins and eukaryotic transcription factor SII in African swine fever virus. *Virology*, 1992, 186(1): 40-52 (doi: 10.1016/0042-6822(92)90059-X).
8. De Oliveira V.L., Almeida S.C., Soares H.R., Crespo A., Marshall-Clarke S., Parkhouse R.M. A novel TLR3 inhibitor encoded by African swine fever virus (ASFV). *Arch. Virol.*, 2011, 156(4): 597-609 (doi: 10.1007/s00705-010-0894-7).
9. Bell J.K., Askins J., Hall P.R., Davies D.R., Segal D.M. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *PNAS*, 2006, 103: 8792-8797 (doi: 10.1073/pnas.0603245103).
10. de Oliveira V.L., Almeida S.C.P., Soares H.R., Crespo A., Marshall-Clarke S., Parkhouse R.M.E. A novel TLR3 inhibitor encoded by African swine fever virus (ASFV). *Arch. Virol.*, 2011, 156(4): 597-609 (doi: 10.1007/s00705-010-0894-7).
11. Goller K.V., Malogolovkin A.S., Katorkin S., Kolbasov D., Titov I., Höper D., Beer M., Keil G.M., Portugal R., Blome S. Tandem repeat insertion in African swine fever virus, Russia, 2012. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, 21(4): 731-732 (doi: 10.3201/eid2104.141792).
12. Malogolovkin A., Burmakina G., Titov I., Sereda A., Gogin A., Baryshnikova E., Kolbasov D. Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, 21(2): 312-315 (doi: 10.3201/eid2102.140649).
13. Takeuchi O., Hemmi H., Akira S. Interferon response induced by Toll-like receptor signaling. *J. Endotoxin. Res.*, 2004, 10: 252-256.
14. O'Neill L.A., Bowie A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 2007, 7(5): 353-364 (doi: 10.1038/nri2079).
15. Barton G.M., Medzhitov R. Toll-like receptor signalling pathways. *Science*, 2003, 300: 1524-1525 (doi: 10.1126/science.1085536).
16. Brikos C., O'Neill L.A. Signalling of toll-like receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2008, 183: 21-50.
17. Watters T.M., Kenny E.F., O'Neill L.A. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol. Cell Biol.*, 2007, 85(6): 411-419 (doi: 10.1038/sj.icb.7100095).
18. Yamamoto M., Sato S., Mori K., Hoshino K., Takeuchi O., Takeda K., Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.*, 2002, 169(12): 6668-6672 (doi: 10.4049/jimmunol.169.12.6668).
19. Kawai T., Akira S. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem.*, 2007, 141(2): 137-145 (doi: 10.1093/jb/mvm032).
20. Балышев В.М., Колбасов Д.В., Куриннов В.В., Калантаенко Ю.Ф., Цыбанов С.Ж., Жуков А.Н., Васильев А.П. Штамм Ставрополь 01/08 вируса африканской чумы свиней для вирусологических, молекулярно-генетических и мониторинговых исследований. Патент РФ № 2439152. Оpubл. 10.01.2012. Бюл. № 1.
21. Frączyk M., Woźniakowski G., Kowalczyk A., Bocian Ł., Kozak E., Niemczuk K., Pejsak Z. Evolution of African swine fever virus genes related to evasion of host immune response. *Vet. Microbiol.*, 2016, 25(193): 133-44 (doi: 10.1016/j.vetmic.2016.08.018).
22. Колбасов Д.В., Балышев В.М., Середва А.Д. Итоги разработки живых вакцин против африканской чумы свиней. *Ветеринария*, 2014, 8: 3-8.
23. Lien E., Ingalls R.R. Toll-like receptors. *Crit. Care Med.*, 2002, 30(1): S1-S11 (doi: 10.1097/00003246-200201001-00001).
24. Середва А.Д., Балышев В.М. Антигенное разнообразие вируса африканской чумы свиней. *Вопросы вирусологии*, 2011, 4: 38-42.
25. Chapman D.A., Tcherepanov V., Upton C., Dixon L.K. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J. Gen. Virol.*, 2008, 89(2): 397-408 (doi: 10.1099/vir.0.83343-0).
26. Jia N., Ou Y., Pejsak Z., Zhang Y., Zhang J. Roles of African swine fever virus

structural proteins in viral infection. J. Vet. Res. 2017, 61(2): 135-143 (doi: 10.1515/jvetres-2017-0017).

27. Sanna G., Dei Giudici S., Bacciu D., Angioi P.P., Giammarioli M., De Mia G.M., Oggiano A. Improved strategy for molecular characterization of African swine fever viruses from Sardinia, based on analysis of p30, CD2V and I73R/I329L variable regions. Transbound. Emerg. Dis., 2017, 64(4): 1280-1286 (doi: 10.1111/tbed.12504).

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии,

601125 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1, e-mail: mima89@ya.ru, Amalogolovkin@vniivvm.ru

Поступила в редакцию 8 июля 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 6, pp. 1251-1258

OBTAINING A STABLE CELL LINE EXPRESSING RECOMBINANT I329L PROTEIN OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS

S.A. Katorkin, E.I. Katorkina, K.A. Mima, I.A. Titov, A.S. Malogolovkin

Federal Research Center for Virology and Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 1, ul. Akademika Bakuleva, pos. Vol'ginskii, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601125 Russia, e-mail e-mail mima89@ya.ru, Amalogolovkin@vniivvm.ru (corresponding author)

ORCID:

Katorkin S.A. orcid.org/0000-0001-7473-6692

Katorkina E.I. orcid.org/0000-0003-3329-0182

Mima K.A. orcid.org/0000-0001-7184-6968

Titov I.A. orcid.org/0000-0002-5821-8980

Malogolovkin A.S. orcid.org/0000-0003-1352-1780

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation (grant № 16-16-00090)

Received July 8, 2017

doi: 10.15389/agrobiologia.2017.6.1251eng

Abstract

The African swine fever virus (ASFV), a large DNA virus with icosahedral morphology, is the only representative of the family *Asfarviridae*. ASFV has a wide list of mechanisms for evading the host's immune system. This fact hinders the development the vaccines against ASF. One of the approaches used by the virus in immune evasion is the mimicry of Toll-like receptors (TLR) by immunomodulating proteins. ASFV immunomodulatory proteins are the most valuable tools for the understanding of the pathogenesis of the disease and to create a means of combating the disease. One such ASFV protein is pI329L, the antagonist and TLR3 signaling inhibitor, which reduces the interferon response of the body. Protein pI329L inhibits TLR3-mediated activation of NF- κ B and induction of INF- β through the activation of TLR3 with its ligand — viral DNA, RNA and poly (I:C). Removing this protein from ASFV particles is a rational approach to developing a weakened virus vaccine. Therefore, I329L is characterized as a viral TLR3 antagonist, which negatively affects interferon antiviral response of the host. Purpose of the work was to obtain a CHO cell line stably expressing a TLR3 antagonist, the recombinant I329L protein of ASFV. Here, we designed the plasmid pBMN-I329-his, carrying the full-length I329L gene with 6xHis-tag at the C-terminus. By electroporation with plasmid pBMN-I329-his of the CHO cell line and further stabilization on a selective antibiotic (5 μ g/ml puromycin), a stable CHO-I329L-His cell line was derived. The insertion of the I329L gene into the genome of the cell was confirmed by PCR using primers of the specific gene, followed by nucleotide sequencing, using as the template DNA isolated from the cells CHO-I329L-His. Western Blot confirmed the presence of I329L protein in the cell lysates of CHO-I329L-His. As a result of the analysis it was established that the size of the recombinant protein was 55 kDa compared to calculated 35 kDa. The sequential deglycosylation of endoglycosidases PNGase and Endo H of the target protein resulted in an increase in its electrophoretic mobility and detection of specific bands of ~ 37 and ~ 35 kDa. This fact confirms the high degree of glycosylation of the target molecule, which leads to a lower electrophoretic mobility. Additionally, the recombinant I329L protein was recognized by hyperimmune sera against the ASFV, which indicated its authenticity. The obtained stable cell line CHO-I329L-His is deposited in the cell culture museum of Federal Research Center for Virology and Microbiology and can be used to study the mechanisms of action of immunomodulating proteins, such as pI329L of the ASFV, and, therefore, to get deeper insight of the African swine fever virus biology.

Keywords: African swine fever, ASFV, TLR3 signalling, protein expression, recombinant pI329L, stable cell line.