

Африканская чума свиней: протеомика, диагностика

УДК 636.4:619:616.636:578:[577.2.08+51-76]

doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.837rus

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФРАГМЕНТЫ ПРОТЕКТИВНО ЗНАЧИМЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ***А.Р. ИМАТДИНОВ, А.Д. СЕРЕДА, И.Р. ИМАТДИНОВ, А.С. КАЗАКОВА,
О.А. ДУБРОВСКАЯ, Д.В. КОЛБАСОВ**

Контроль за африканской чумой свиней (АЧС) осложняется отсутствием средств специфической профилактики. Попытки получить живые вакцины традиционными методами оказались малоперспективными, а инактивированные и субъединичные — неудачными (N. Petuska, 1965; Д.В. Колбасов с соавт., 2014; V. Makarov с соавт., 2016). Исследования формирования протективного иммунитета при АЧС позволили определить решающую роль клеточных механизмов защиты и наиболее значимые участвующие в этом вирусные белки: р30, р54, CD2v (или GP110-140) (P. Gomez-Puertas с соавт., 1998; J.M. Argilaguet с соавт., 2012; А.Д. Середина с соавт., 2015). В представляемой работе впервые созданы гибридные плазмиды, пригодные для протеомных исследований и разработки ДНК-вакцины против вируса АЧС III сероиммунотипа. Исследование выполнено с целью получения ДНК-конструкций, содержащих фрагменты генов *CP204L*, *E183L*, *EP402R* вируса АЧС аттенуированного штамма МК-200, и идентификации в трансфицированных ими эукариотических клетках соответствующих антигенно активных продуктов трансляции рекомбинантных белков рр30, рр54, рCD2v. Рекомбинантными плазмидами рСI-нео/ASFV/р30, рСI-нео/ASFV/р54 и рСI-нео/ASFV/CD2v трансфицировали культуру человеческих эмбриональных клеток почек, трансформированных геном Т-антигена вируса SV40 (НЕК293Т). Методом иммуноблоттинга в лизатах трансфицированных клеток определены и охарактеризованы по молекулярной массе экспрессированные рекомбинантные полипептиды. Среди полученных антигенно активных полипептидов одни по размеру соответствовали теоретически рассчитанным, другие — продуктам посттрансляционной модификации рекомбинантных белков. В лизатах клеток НЕК293Т, трансфицированных рСI-нео/ASFV/р30, выявлен полипептид с молекулярной массой 21,6 кДа, в содержащих рСI-нео/ASFV/р54 — мажорный полипептид 20,9 кДа и минорный 36,3 кДа, в клетках с рСI-нео/ASFV/CD2v — мажорные полипептиды с молекулярной массой 39,8 и 63,1 кДа, а также минорные 28,8 и 104,7 кДа. Полученные модели позволяют исследовать иммуногенные и протективные свойства созданных ДНК-конструкций.

Ключевые слова: африканская чума свиней, рекомбинантные гены и белки, трансфекция, антигенность.

Африканская чума свиней (АЧС) — вирусная контагиозная септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсемии, геморрагическим диатезом и высокой летальностью, может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно. При острой, наиболее распространенной форме инфекции, до 100 % животных погибают в течение 5–10 сут после начала проявления клинических признаков. Болезнь поражает диких кабанов и домашних свиней, передается от больных животных и вирусоносителей контактно, алиментарно, а также трансплацентарно (1). В юго-восточной Африке эволюция вируса АЧС происходит в процессе сальватического цикла, в который включены бородавочники и клещи рода *Ornitodoros* (2, 3). После регистрации в 2007 году вспышек АЧС в Грузии болезнь распространилась в Армению, Азербайджан, Нагорный Карабах, Иран, Абхазию, Россию, страны Прибалтики, Белоруссию, Польшу, на Украину (4–6).

Контроль за инфекцией осложняется отсутствием средств специфической профилактики. Попытки вакцинации домашних свиней аттенуированными штаммами вируса АЧС в Испании и Португалии в 1960-х годах закончились неудачно (7, 8). Позднее подтвердилось, что из-за высо-

* Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда «Создание кандидатной вакцины против африканской чумы свиней на основе химерных вирусов» № 16-16-00090.

кой вероятности реверсии и неудовлетворительных иммунобиологических характеристик многих аттенуированных штаммов живые вакцины на их основе непригодны для широкого применения (9).

Эксперименты по созданию инактивированных или субъединичных вакцин против АЧС по общепринятым технологиям также оказались неудачными ввиду их неспособности индуцировать клеточный иммунитет, который играет решающую роль в формировании защиты при АЧС (10-12). Тем не менее, исследования по разработке безопасных кандидатных защитных препаратов для временной защиты свиней, обеспечивающих их защиту в энзоотичных зонах или плановый убой на крупных свиноплеменных комплексах, продолжаются (9, 13). Показано, что иммунизация свиней рекомбинантными белками р30 и р54 или препаратом серотипоспецифического вирусного мажорного гликопротеина ГП 110-140 приводила к частичной защите животных от контрольного заражения гомологичными вирулентными изолятами (14-17).

Результаты изучения протективных свойств ДНК-конструкций, содержащих гены белков р30, р54 и CD2v (ГП 110-140), свидетельствуют о критически важной роли последнего в формировании защиты от АЧС (18, 19). Таким образом, исследование антигенных и иммуногенных характеристик продуктов экспрессии ДНК-конструкций, кодирующих гены протективно значимых белков вируса АЧС, открывает перспективы создания препаратов нового поколения против вирулентных изолятов различных сероиммунотипов. Необходимые этапы этих работ — клонирование генов в составе ДНК-конструкций, экспрессия в эукариотических системах и подтверждение получения антигенно активных продуктов трансляции (20). Полагаем, что в качестве источников вирусных генов следует использовать аттенуированные штаммы вируса АЧС, охарактеризованные по сероиммунотипу и протективным свойствам.

В представляемой работе впервые созданы гибридные плазмиды, пригодные для протеомных исследований и разработки ДНК-вакцины против вируса АЧС III сероиммунотипа.

Наша цель заключалась в получении ДНК-конструкций, содержащих фрагменты генов *CP204L*, *E183L*, *EP402R* вируса АЧС III сероиммунотипа, и идентификации в трансфицированных ими эукариотических клетках соответствующих антигенно активных продуктов трансляции рекомбинантных белков р30, р54, гCD2v.

Методика. Штаммы вируса АЧС III и VIII сероиммунотипов Мозамбик-78 (М-78) и Ставрополь 01/08 (высоковирулентные), а также штамм МК-200 и вариант Ставрополь 01/08 А₄С₂/9к (аттенуированные) депонированы в Государственной коллекции микроорганизмов (Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии — ВНИИВВиМ) (21-23).

Схемы получения антисывороток были следующими: № 1 — 2-кратное внутримышечное введение домашней свинье аттенуированного варианта Ставрополь 01/08 А₄С₂/9к в дозе 10^{3,0} ГАЕ₅₀ (0-е и 14-е сут), внутримышечное заражение вирулентным штаммом Ставрополь 01/08 в дозе 10³ ГАЕ₅₀ (на 28-е сут) и обескровливание животного (35-е сут после начала эксперимента); № 2 — отбор крови на 24-е сут после 1-кратной внутримышечной инокуляции дикому кабану аттенуированного штамма МК-200 (10^{6,5} ГАЕ₅₀); № 3 — 1-кратное внутримышечное введение домашней свинье аттенуированного штамма МК-200 в дозе 10^{6,5} ГАЕ₅₀ (0-е сут), внутримышечное заражение вирулентным штаммом М-78 в дозе 10³ ГАЕ₅₀ (на 21-е сут) и обескровливание животного (на 35-е сут после начала эксперимента).

При ПЦР в состав реакционной смеси входили праймеры, фланки-

рующие гены *CP204L*, *E183L*, *EP402R* вируса АЧС штамма МК-200. Для накопления ПЦР-продуктов использовали полученные ранее рекомбинантные плазмиды рJET1.2/p30-M200/2, рJET1.2/p54-M200/1 и рJET1.2/CD2v-M200/10. Лигирование осуществляли с применением коммерческого набора CloneJET PCR Cloning Kit согласно рекомендациям фирмы-изготовителя («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США) и описанию (24).

Компетентные клетки штамма *Escherichia coli* XL-1 трансформировали методом теплового шока в присутствии ионов Ca^{2+} (25). Из отобранных устойчивых к ампициллину трансформантов выделяли плазмиды, наличие специфических вставок подтверждали рестрикционным анализом.

Нуклеотидные последовательности полученных химерных структур, содержащих гены *CP204L*, *E183L* и *EP402R* в составе плазмид рJET1.2 и рCI-neo, определяли на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3130xl («Applied Biosystems, Inc.», США).

Линию человеческих эмбриональных клеток почки, трансформированных геном Т-антигена вируса SV40 (НЕК293Т; Коллекция культур клеток ВНИИВВиМ), трансфицировали рекомбинантными плазмидами рCI-neo/ASFV/p30/1, рCI-neo/ASFV/p54/1 и рCI-neo/ASFV/CD2v/1 кальций-фосфатным методом согласно рекомендациям (26) и культивировали после смены среды Игла MEM (ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова», Россия) от 1 до 5 сут. Трансфекцию контролировали по экспрессии GFP белка (положительный контроль — плазида рhMGFP) («Promega», США) на инвертированном флуоресцентном микроскопе Olympus MIT-2 («Olympus Corp.», Япония). Трансфицированные клетки снимали с субстрата механически, предварительно отмыв 3-кратно от сывороточных белков фосфатно-буферным раствором с рН 7,2 (ФБР), осаждали центрифугированием (3000 g, 10 мин) и замораживали при $-70^{\circ}C$. Далее 10^6 клеток лизировали в 1 см^3 RIPA-буфера (24), клеточный дебрис осаждали центрифугированием (3000 g, 20 мин) и исследовали супернатанты методом иммуноблоттинга. Электрофорез, электроперенос и иммуноблоттинг осуществили по методам U.K. Laemmle (27), J. Kyhse-Andersen (28) и J.M. Escribano, E. Tabares (29).

Для сравнения нуклеотидных последовательностей созданных химерных конструкций с опубликованными в GenBank применяли программу BLASTn (доступна на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Выравнивание и анализ проводили с помощью программ BioEdit 7.2.5 (intellectual property of Tom Hall, Freeware) и uGene 1.22 (ООО «Новосибирский центр информационных технологий УниПро»). Прогнозирование эпитопов и структурных элементов выполняли с использованием онлайн-серверов (Technical University of Denmark, <http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/>).

Специфичные олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие участки генов белков р30, р54 и CD2v

Наименование	Нуклеотидная последовательность
F-p30Domen	5'-AGTACTGTAAAGTATGATATTGTGAAATCTG-3'
R-p30Domen	5'-AAGTTTAATAACCATGAGTCTTACCACC-3'
F-p54Domen	5'-TCCTCAAGAAAGAAAAAGCTGCTGCTATTGAG-3'
R-p54Domen	5'-CAAGGAGTTTTCTAGGCTTTATGCGTATAGG-3'
F-CD2-IgHA	5'-AGTTATAATGAAACAATAATTTAAATAGTAAT-3'
R-CD2-IgHA	5'-GTGATTTCTTAATAAAAAAGAATATTGATAATA-3'

Результаты. Биоинформатический анализ трех потенциально протективных белков вируса АЧС (р30, р54 и CD2v) штамма МК-200 выявил сигнальные последовательности, транс-

мембранные регионы и возможные сайты посттрансляционных модификаций. В результате были определены внеклеточные (вневирионные) домены трансмембранных белков, которые несут в аминокислотных последовательностях наибольшее число прогнозируемых В- и Т-клеточных эпитопов.

Клонлируемый регион гена *EP402R* 49-651 п.н. (201 а.о.) исключал

нативные сигнальные и трансмембранные регионы, а также цитоплазматический домен 721-1137 п.н. Аналогичные регионы локализованы для генов *CP204L* (142-546 п.н.) и *E183L* (160-597 п.н.). Дизайн праймеров осуществляли в соответствии с дальнейшей стратегией «бесшовного» клонирования ДНК-конструкций по D.G. Gibson с соавт. (30). Нуклеотидные последовательности рассчитанных праймеров приведены в таблице.

Для повышения эффективности внутриклеточного сортировки указанных белков использовали универсальные сигнальные элементы из гетерологичных вирусов (сигнальная последовательность белка слияния F парагриппа человека 1 и трансмембранный регион белка HN вируса Сендай). Для этого ампликоны p30-Domain, p54-Domain и CD2v-IgHA были субклонированы с сигнальными последовательностями и трансмембранными регионами в плазмидный вектор pJET1.2 («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). На основании ПЦР-скрининга и рестрикционного анализа отобрали клоны, содержащие со специфическими нуклеотидными вставками. Секвенирование плазмид показало целостность рамок считывания полученных химерных последовательностей.

На следующем этапе получали ДНК-конструкции, экспрессирующие в клетках эукариот. Для этого соответствующие нуклеотидные последовательности были переклонированы в плазмидный вектор pCI-neo («Promega», США) по сайтам рестрикции *NheI* и *SmaI*. Цитомегаловирусный промотор в векторе pCI-neo обеспечивает высокую экспрессию в эукариотических системах. Карты открытых рамок считывания химерных генов приведены на рисунке 1.

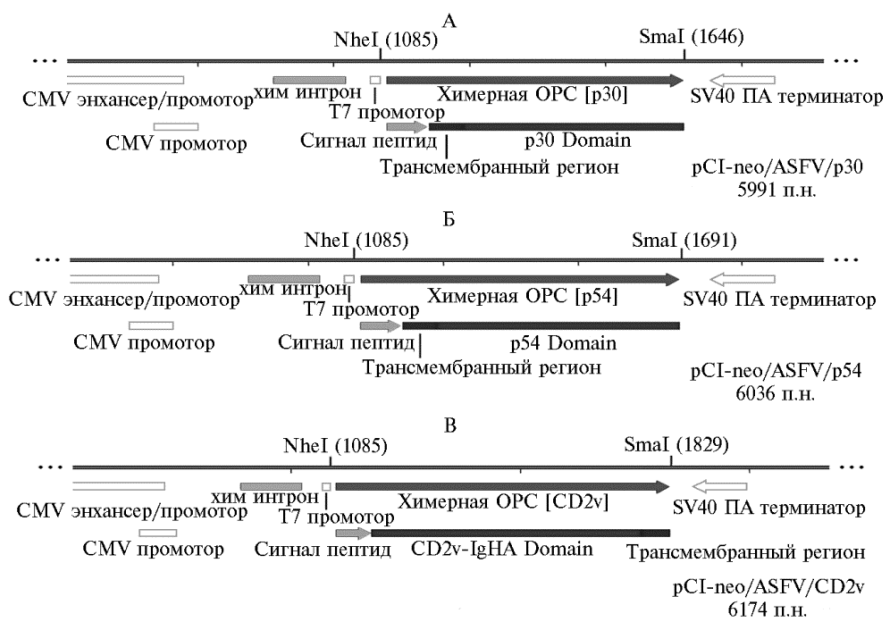


Рис. 1. Схема открытых рамок считывания для химерных генов с клонированными последовательностями фрагментов, кодирующих белки вируса африканской чумы свиней p30, p54 и CD2v, в полученных ДНК-конструкциях: А — pCI-neo/ASFV/p30, Б — pCI-neo/ASFV/p54, В — pCI-neo/ASFV/CD2v; CMV энхансер/промотор — энхансер раннего ответа промотора цитомегаловируса, CMV промотор — промотор цитомегаловируса, хим интрон — химерный интрон, Т7 промотор — промотор фага T7, SV40 ПА терминатор — сигнал полиаденилирования и терминатор из ДНК вируса SV40, Сигнал пептид — сигнальная последовательность.

Анализ полученных рекомбинантных плазмид pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 и pCI-neo/ASFV/CD2v методом ПЦР с диагностическими праймерами показал, что на этих матрицах синтезируются ампли-

коны, размеры которых соответствуют расчетным (рис. 2). Для дальнейшей работы выбрали первые клоны каждой конструкции.

Для экспрессии полученных рекомбинантных генов *in vitro* использовали перевиваемую культуру НЕК293Т (клетки почки эмбриона человека, трансформированные геном Т-антигена вируса SV40). Наличие ориджина репликации вируса SV40 в составе рСI-нео обеспечивает эписомальную репликацию плазмид. После трансфекции монослоя клеток НЕК293Т кальций-фосфатным методом (конфлюентность 80-90 %) каждой из рекомбинантных плазмид и последующего культивирования в течение 1-5 сут рассчитывали эффективность трансфекции как долю числа флуоресцирующих клеток от общего наблюдаемого при люминесцентной микроскопии. В качестве контроля аналогичные эксперименты в идентичных условиях проводили с плазмидой рhMGFP.

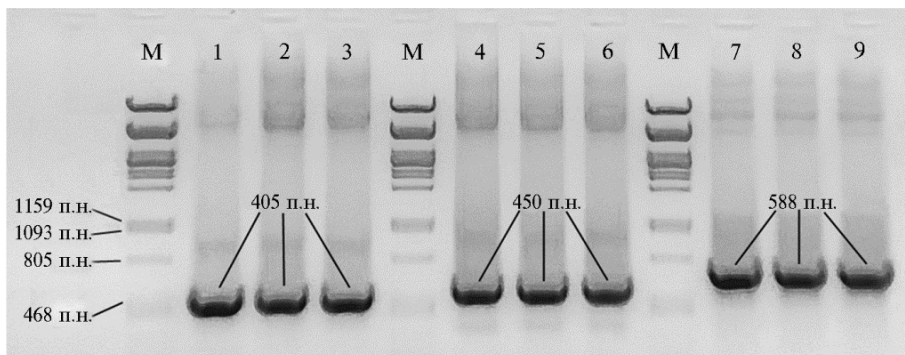


Рис. 2. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов химерных генов в 1,5 % агарозном геле при скрининге рекомбинантных плазмид: 1, 2, 3 — ампликоны р30 (в качестве матрицы использованы выделенные из *Escherichia coli* плазмиды рСI-нео/ASFV/p30); 4, 5, 6 — ампликоны р54 (в качестве матрицы использованы выделенные из *E. coli* плазмиды рСI-нео/ASFV/p54); 7, 8, 9 — ампликоны CD2v (в качестве матрицы использованы выделенные из *E. coli* плазмиды рСI-нео/ASFV/CD2v); М — Lambda DNA/PstI Marker (маркер размера фрагментов ДНК 247-11501 п.н., «GeneOn GmbH», Германия).

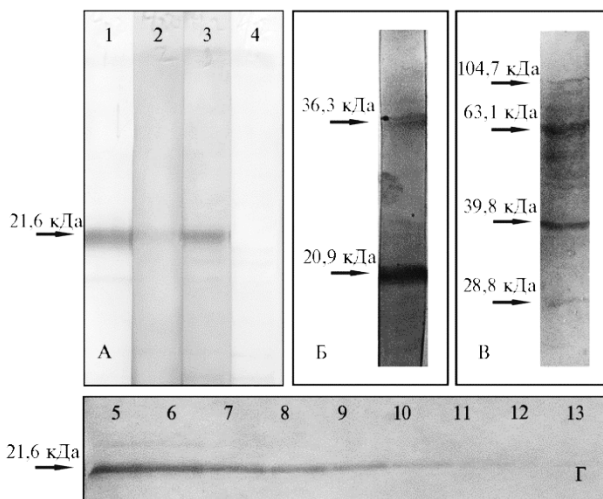


Рис. 3. Иммуноблоттинг, демонстрирующий трансляцию рекомбинантных белков gp30 (А), gp54 (Б) и gp CD2v (В) в трансфицированных плазмидами рСI-нео/ASFV/p30/1, рСI-нео/ASFV/p54, рСI-нео/ASFV/CD2v клетках НЕК293Т и антигенную активность gp30 (Г): 1-4 — номера антисывороток, 5-13 — разведения лизата клеток НЕК293Т (от 1:2 до 1:512 с 2-кратным шагом), экспрессирующих gp30. Слева стрелками указано местоположение и молекулярные массы вирусоспецифических полипептидов.

белка gp30, синтезированного в клетках НЕК293Т, трансфицированных плазмидой рСI-нео/ASFV/p30/1. По данным иммуноблоттинга с антителами АЧС-позитивных антисывороток крови домашних свиней и дикого кабана (разведение 1:20), его молекулярная масса составляет 21,6 кДа. С

сывороткой крови от интактной свиньи вирусспецифических антигенов мы не выявили. Иммуноблоттинг белков лизата из нетрансфицированных клеток НЕК293Т со всеми антисыворотками дал отрицательные результаты (данные не приведены). Титрование лизата клеток НЕК293Т, трансфицированных плазмидой рСІ-нео/ASFV/р30/1 (от 1:2 до 1:512 с 2-кратным шагом) (см. рис. 3, Г), выявило антигенную активность вплоть до разведения 1:128, что свидетельствует о высокой экспрессии рр30.

Методом иммуноблоттинга с использованием антисыворотки № 3 в лизате трансфицированных рСІ-нео/ASFV/р54 клеток НЕК293Т было показано присутствие мажорного полипептида с молекулярной массой 20,9 кДа и минорного — с массой 36,3 кДа (см. рис. 3, Б), а при трансфекции рСІ-нео/ASFV/CD2v выявлялись мажорные полипептиды 39,8 и 63,1 кДа и минорные 28,8 и 104,7 кДа (см. рис. 3, В).

Расчетные молекулярные массы немодифицированных рекомбинантных белков составили 21,6 кДа (рр30), 18,7 кДа, (рр54) и 28,6 кДа (rCD2v). По результатам иммуноблоттинга, фактически молекулярные массы полученных нами рекомбинантных полипептидов соответствовали или были близки с расчетными: для рр30 — 21,6 кДа, для рр54 — 20,9 кДа и 36,3 кДа (вероятно, димер рр54). По данным Р. Gómez-Puertas с соавт. (16) и F. Rodriguez с соавт. (31), масса мономера полноразмерного р54 — 24–28 кДа. В трансфицированных рСІ-нео/ASFV/CD2v клетках НЕК293Т транслированные вирусспецифические полипептиды имели молекулярные массы 28,8; 39,8; 63,1 и 104,7 кДа. Первый из них по размеру соответствовал расчетной немодифицированной молекуле rCD2v. Остальные, по-видимому, представляли собой формы, в разной степени модифицированные в процессе гликозилирования. Эти результаты соответствуют данным L.C. Gotley и L.K. Dixon (32), которые в клетках Vero, трансфицированных плазмидой SV5CD2vHA, идентифицировали полипептиды рекомбинантного CD2v с молекулярными массами 26, 63, 89 и 104 кДа. Под действием ингибитора гликозилирования туникамицина или эндогликозидаз D и F авторы дополнительно выявляли полипептиды размером 42 и 47 кДа (32).

Таким образом, получены ДНК-конструкции с фрагментами генов вируса африканской чумы свиней (АЧС) *CP204L*, *E183L*, *EP402R*. Методом иммуноблоттинга с использованием АЧС-специфических антисывороток показана антигенная активность полипептидов, экспрессируемых в результате трансфекции культуры клеток НЕК293Т рекомбинантными плазмидами рСІ-нео/ASFV/р30, рСІ-нео/ASFV/р54 и рСІ-нео/ASFV/CD2v с нуклеотидными последовательностями для рекомбинантных белков (соответственно рр30, рр54 и ррCD2v). На следующем этапе предстоит определить иммуногенные свойства рекомбинантных плазмид и усовершенствовать полученные генные конструкции для создания соответствующих протективных форм.

Авторы выражают благодарность профессору В.М. Бальшеву, д-ру С.П. Живодерову и д-ру И.А. Титову (ВНИИВВиМ) за помощь в выполнении работы.

ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии,
601125 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н,
пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1,
e_mail: almazlcf@yandex.ru

Поступила в редакцию
30 августа 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 6, pp. 837–844

EXPRESSION OF RECOMBINANT GENES ENCODING FRAGMENTS
OF THE PROTECTIVE IMPORTANT PROTEINS OF AFRICAN SWINE

FEVER VIRUS IN EUCARYOTIC CELLS

A.R. Imatdinov, A.D. Sereda, I.R. Imatdinov, A.S. Kazakova, O.A. Dubrovskaya,
D.V. Kolbasov

All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 1, ul. Akademi-
mika Bakuleva, pos. Vol'ginskii, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601125 Russia, e-mail almazlcf@yandex.ru

Acknowledgements:

We thank Prof. V.M. Balyshev, Dr S.P. Zhivoderov and Dr I.A. Titov for assistance in carrying out the work.

Supported by Russian Science Foundation (the research project «Design of African swine fever virus candidate vac-
cine based on chimeric viruses», contract No 16-16-00090)

Received August 30, 2016

doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.837eng

Abstract

Control of African swine fever (ASF) is complicated by the lack of specific prevention medications. The attempts to obtain live attenuated vaccines by conventional methods were not promising, and the inactivated or subunit vaccines have not been developed so far (N.J. Petiska, 1965; D.V. Kolbasov et al., 2014; V. Makarov et al., 2016). The investigation of protective immune response against ASF virus (ASFV) enabled determination of a critical role of cellular defense mechanisms and the most important viral proteins p30, p54 and CD2v (or gp 110-140) involved (P. Gomez-Puertas et al., 1998; J.M. Argilaguuet et al., 2012; A.D. Sereda et al., 2015). In view to develop a DNA vaccine against ASFV seroimmunotype 3 we have constructed a set of hybrid plasmids containing fragments of ASFV genes *CP204L*, *E183L* and *EP402R* from attenuated strain MK-200 (pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 and pCI-neo/ASFV/CD2v). To study expression of the antigenically active polypeptide products for recombinant proteins rp30, rp54 and rCD2v in the eukaryotic cells, we transfected human embryonic kidney cells HEK293T, which stably express the SV40 large T antigen, with recombinant plasmids pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 and pCI-neo/ASFV/CD2v. By immunoblotting, the polypeptides of the expressed recombinant proteins were identified in the HEK293T cell lysates and characterized for their molecular weights. Regarding size, some antigenically active recombinant polypeptides were as calculated, whereas the other ones apparently resulted from post translational modification. We identified a 21.6 kDa polypeptide after pCI-neo/ASFV/p30 transfection, a major (20.9 kDa) and a minor (36.3 kDa) polypeptides after pCI-neo/ASFV/p54 transfection, and, finally, major polypeptides of 39.8 kDa and 63.1 kDa, together with minor polypeptides of 28.8 kDa and 104.7 kDa when pCI-neo/ASFV/CD2v transfected. These genetic constructions will be helpful to investigate antigenic, immunogenic and protective properties of ASFV recombinant proteins rp30, rp54 and rCD2v.

Keywords: African swine fever, recombinant genes and proteins, transfection, antigenicity.

REFERENCES

1. Sanchez-Vizcaino J.M., Mur L., Gomez-Villamandos J.C., Carrasco L. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J. Comp. Pathol.*, 2015, 152(1): 9-21 (doi: 10.1016/j.jcpa.2014.09.003).
2. Makarov V.V., Sukharev O.I., Tsvetnova I.V. *Veterinarnaya praktika*, 2013, 1(60): 6-16 (in Russ.).
3. Kolbasov D.V., Sereda A.D. *Veterinariya*, 2013, 1: 19-23 (in Russ.).
4. Rowlands R.J., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., Volsoo W., Dwarka R., Onashvili T., Albina E., Dixon L.K. African swine fever virus isolate Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008, 14(12): 1870-1874 (doi: 10.3201/eid1412.080591).
5. 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 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.12.007).
6. Śmietanka K., Woźniakowski G., Kozak E., Niemczuk K., Frączyk M., Bocian Ł., Kowalczyk A., Pejsak Z. African swine fever epidemic, Poland, 2014-2015. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, 22(7): 1201-1207 (doi: 10.3201/eid2207.151708).
7. Petisca N.J. Quelques aspects morphologiques a la suite de la vaccination contre la peste porcine Africaine (Virose L) au Portugal. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 1965, 63: 199-237.
8. Vigarío I.D., Terrinha A.M., Nunes J.F.M. Antigenic relationships among strains of African swine fever virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 1974, 45(3): 272-277 (doi: 10.1007/BF01249690).
9. Kolbasov D.V., Balyshev V.M., Sereda A.D. *Veterinariya*, 2014, 8: 3-8 (in Russ.).
10. Makarov V., Nedosekov V., Sereda A., Matvienko N. Immunological conception of African swine fever. *Zoology and Ecology*, 2016, 26(3): 236-243 (doi: 10.1080/21658005.2016.1182822).
11. Takamatsu H.H., Denyer M.S., Lacasta A., Stirling C.M.A., Argilaguuet J.M., Netherton C.L., Oura C.A.L., Martins C., Rodriguez F. Cellular immunity in

- ASFV responses. *Virus Res.*, 2013, 173(1): 110-121 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.11.009).
12. Oura C.A.L., Denyer M.S., Takamatsu H., Parkhouse R.M.E. In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J. Gen. Virol.*, 2005, 86(9): 2445-2450 (doi: 10.1099/vir.0.81038-0).
 13. King K., Chapman D., Argilagué J.M., Fishbourne E., Hutet E., Cariolet R., Hutchings G., Oura C.A.L., Netherton C.L., Moffat K., Taylor G., Le Potier M.F., Dixon L.K., Takamatsu H.H. Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunization. *Vaccine*, 2011, 29(28): 4593-4600 (doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.052).
 14. Bachmann M.F., Kundig T.M., Freer G., Li Y., Kang C.Y., Bishop D.H., Hengartner H., Zinkerna R.M. Induction of protective cytotoxic T cells with viral proteins. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24: 2228-2236 (doi: 10.1002/eji.1830240944).
 15. Gomez-Puerta P., Rodriguez F., Oviedo J.M., Ramiro-Ibanez F., Ruiz-Gonzalvo F., Escribano J.M. Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *Virology*, 1996, 70(8): 5689-5694.
 16. Gómez-Puertas P., Rodríguez F., Oviedo J.M., Brun A., Alonso C., Escribano J.M. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, 1998, 243: 461-471 (doi: 10.1006/viro.1998.9068).
 17. Sereda A.D. *Aktual'nye voprosy veterinarnoi biologii*, 2013, 4(20): 31-35 (in Russ.).
 18. Argilagué J.M., Perez-Martin E., Nofrarias M., Gallardo C., Accensi F., Lacasta A., Mora M., Ballester M., Galindo-Cardiel I., Lopez-Soria S., Escribano J.M., Reche P.A., Rodríguez F. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS ONE*, 2012, 7(9): e40942 (doi: 10.1371/journal.pone.0040942).
 19. Sereda A.D., Kazakova A.S., Imatdinov A.R., Kolbasov D.V. Humoral and cell immune mechanisms under African swine fever (review). *Agricultural Biology*, 2015, 50(6): 709-718 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.709eng) (in Engl.).
 20. Mima K.A., Burmakina G.S., Titov I.A., Malogolovkin A.S. African swine fever virus glycoproteins p54 and CD2v in the context of immune response modulation: bioinformatic analysis of genetic variability and heterogeneity. *Agricultural Biology*, 2015, 50(6): 785-793 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.785eng) (in Engl.).
 21. Sereda A.D., Balyshev V.M. *Voprosy virusologii*, 2011, 4: 38-42 (in Russ.).
 22. 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).
 23. Balysheva V.I., Prudnikova E.Yu., Gal'nbek T.V., Balyshev V.M. *Voprosy virusologii*, 2015, 2: 43-47 (in Russ.).
 24. Green M.R., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2012.
 25. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, 1982.
 26. Graham F.L., van der Eb A.J. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 1973, 54(2): 536-539 (doi: 10.1016/0042-6822(73)90163-3).
 27. Laemmle U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, 227: 680-685 (doi: 10.1038/227680a0).
 28. Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1984, 10(3/4): 203-209.
 29. Escribano J.M., Tabares E. Proteins specified by African swine fever virus. V. Identification of immediate early, early and late proteins. *Arch. Virol.*, 1987, 92: 221-238.
 30. Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C.A. III, Smith H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 2009, 6: 343-345 (doi: 10.1038/nmeth.1318).
 31. Rodríguez F., Alcaraz S., Yanez R.J., Rodríguez J.M., Alonso C., Rodríguez J.F., Escribano J.M. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. *J. Virol.*, 1994, 68(11): 7244-7252.
 32. Goatley L.C., Dixon L.K. Processing and localization of the African swine fever virus CD2v transmembrane protein. *J. Virol.*, 2011, 85(7): 3294-3305 (doi: 10.1128/jvi.01994-10).