

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ



ӨНЕРТАБЫСҚА
ПАТЕНТ

АСТАНА



(19) **ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ**

ӨНЕРТАБЫСҚА

(11) **№ 32951**

(12) **ПАТЕНТ**

(54) **АТАУЫ:** Қой шешегіне қарсы суббірлік вакциналарды құрастыруда және диагностикалық тест-жүйелерді жасақтауда қолданылатын қой шешегі вирусының рекомбинантты белоктарын SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 түзетін рекомбинантты плазмидалы ДНҚ рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM, Escherichia coli T7 бактериясының штамдары - вирустың рекомбинантты белоктарының SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 продуценттері және қой шешегі вирусының рекомбинантты белоктары SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141

(73) **ПАТЕНТ ИЕЛЕНУШІСІ:** Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің "Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты" шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорыны (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЛАР):** Червякова Ольга Викторовна (KZ); Тайлакова Эльмира Талгатовна (KZ); Строчков Виталий Михайлович (KZ); Зайцев Валентин Лукьянович (KZ); Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна (KZ); Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ)

(21) **Өтінім №** 2017/0127.1

(22) **Өтінім берілген күн:** 16.02.2017

25.06.2018 Қазақстан Республикасы Өнертабыстардың мемлекеттік тізілімінде тіркелді.

Патентті күшінде ұстау ақысы уақытылы төленген жағдайда, патенттің күші Қазақстан Республикасының бүкіл аумағында қолданылады.

**Қазақстан Республикасының
Әділет вице-министрі**

Н. Пан

Өзгерістер енгізу туралы мәліметтер осы патентке қосымша түрінде жеке паракта келтіріледі

003824



(19) **МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

(12) **ПАТЕНТ**

(11) **№ 32951**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(54) **НАЗВАНИЕ:** Рекомбинантные плазмидные ДНК pET/SPPV060ΔTM, pET/SPPV095, pET/SPPV117, pET/SPPV122ΔTM, pET/SPPV141ΔTM, обеспечивающие синтез рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, штаммы бактерий Escherichia coli T7 – продуценты рекомбинантных вирусных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141, и рекомбинантные белки вируса оспы овец SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 для создания диагностических тест-систем и конструирования субъединичных вакцин против оспы овец

(73) **ПАТЕНТООБЛАДАТЕЛЬ:** Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЫ):** Червякова Ольга Викторовна (KZ); Тайлакова Эльмира Талгатовна (KZ); Строчков Виталий Михайлович (KZ); Зайцев Валентин Лукьянович (KZ); Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна (KZ); Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайулы (KZ)

(21) **Заявка № 2017/0127.1**

(22) **Дата подачи заявки: 16.02.2017**

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан 25.06.2018.

Действие патента распространяется на всю территорию Республики Казахстан при условии своевременной оплаты поддержания патента в силе.

**Вице-министр юстиции
Республики Казахстан**

Н. Пан

Сведения о внесении изменений приводятся на отдельном листе в виде приложения к настоящему патенту



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 32951

(51) A61K 39/12 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/33 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2017/0127.1

(22) 16.02.2017

(45) 23.07.2018, бюл. №27

(72) Червякова Ольга Викторовна; Тайлакова Эльмира Талгатовна; Строчков Виталий Михайлович; Зайцев Валентин Лукьянович; Султанкулова Кулайсан Турлыбаевна; Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич; Сансызбай Абылай Рысбайулы

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) Орлова Е.С. Совершенствование методов диагностики оспы овец и оспы коз: Автореферат. Дисс...канд. Биол.наук, Владимир, 2007.с.1-23.

RU 2511037 C2, 10.04.2014

RU 2112038 C1, 27.05.1998

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПЛАЗМИДНЫЕ ДНК pET/SPPV060ΔTM, pET/SPPV095, pET/SPPV117, pET/SPPV122ΔTM, pET/SPPV141ΔTM, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ СИНТЕЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ, ШТАММЫ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI T7 – ПРОДУЦЕНТЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141, И РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 ДЛЯ СОЗДАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ И КОНСТРУИРОВАНИЯ СУБЪЕДИНИЧНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ОСПЫ ОВЕЦ

(57) Изобретение относится к биотехнологии и касается получения генетических конструкций, обеспечивающих синтез в клетках Escherichia coli рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец.

Представлены рекомбинантные плазмидные ДНК pET/SPPV060ΔTM, pET/SPPV095, pET/SPPV117, pET/SPPV122ΔTM, pET/SPPV141ΔTM, обеспечивающие экспрессию рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец и содержащие в соответствии с физическими и генетическими картами плазмид, приведенными на фиг. 2: плазмидный вектор pET26b(+), фрагмент, кодирующий олигопептид LENNNNNH, фрагмент размером 564 п.о., кодирующий фрагмент белка SPPV060 вируса оспы овец с 1 по 188 аминокислотные остатки, фрагмент размером 483 п.о., кодирующий белок SPPV095 вируса оспы овец, или фрагмент размером 447 п.о., кодирующий белок SPPV117 вируса оспы овец, или фрагмент размером 384 п.о., кодирующий фрагмент белка SPPV122 вируса оспы овец с 68 по 195 аминокислотные остатки, или фрагмент размером 534 п.о., кодирующий фрагмент белка SPPV141 вируса оспы овец с 6 по 184 аминокислотные остатки (фиг.1, а-д); Штаммы бактерий E.coli T7/pET/SPPV060ΔTM, T7/pET/SPPV095, T7/pET/SPPV117, T7/pET/SPPV122ΔTM, T7/pET/SPPV141ΔTM, - продуценты рекомбинантных вирусных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141, содержащие соответственно рекомбинантные плазмидные ДНК pET/SPPV060ΔTM, pET/SPPV095, pET/SPPV117, pET/SPPV122ΔTM, pET/SPPV141ΔTM, депонированные в Коллекции микроорганизмов РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК под регистрационными номерами М-3-15/D, М-4-15/D, М-5-15/D, М-6-15/D, М-7-15/D, соответственно; и рекомбинантные белки вируса оспы овец SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141. Охарактеризованные решения могут быть использованы при создании тест-систем и конструирования субъединичных вакцин против оспы овец.

(19) KZ (13) B (11) 32951

Н. Пан

Изобретение относится к области биотехнологии и касается получения генетических конструкций, обеспечивающих синтез в клетках *Escherichia coli* рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, состоящих из фрагментов соответствующих белков и С-концевого олигопептида LENNNNNH, взаимодействующих с сыворотками доноров, инфицированных вирусом оспы овец, и вызывающих выработку вируснейтрализующих антител в организме животных, и может быть использовано для разработки средств профилактики и диагностики оспы овец.

Наиболее изучены свойства белков *Vaccinia virus* (VV), который является представителем рода *Orthoroxvirus* семейства *Poxviridae*. Иммуногенность и протективность отдельных вирусных белков, экспрессированных в *E. coli* или в бакуловиральной системе, была установлена на мышах. Так, вакцинация мышей белком A27, экспрессированным в *E. coli*, вызывала образование нейтрализующих антител и защищала животных от смерти при контрольном заражении VV [Lai, C.F., Gong, S.C., Esteban, M. The purified 14 kilodalton envelope protein of vaccinia virus produced in *Escherichia coli* induces virus immunity in animals. // *J. Virol.* - 1991. - Vol. 65. - P. 5631- 5635; He Y., Meseda C.A., Vassell R.A., Merchinsky M., Weir J.P., Weiss C.D. Recombinant A27 protein synergizes with modified vaccinia Ankara in conferring protection against a lethal vaccinia virus challenge // *Vaccine.* - 2010. - Vol. 28(3). - P. 699-706]. Иммунизация мышей белками LI, B5 и A33, экспрессированными в бакуловиральной системе, также предотвращала гибель животных при контрольном заражении вирусом оспы [Galmiche, M.C., Goenaga, J., Wittek, R., Rindisbacher, L. Neutralizing and protective antibodies directed against vaccinia virus envelope antigens. // *Virology.* - 1999. - 254. - P. 71-80; Paran N., Lustig S., Zvi A., Erez N., Israely T., Melamed S., Politi B., Ben-Nathan D., Schneider P., Lachmi B., Israeli O., Stein D., Levin R., Olshevsky U. Active vaccination with vaccinia virus. A33 protects mice against lethal vaccinia and ectromelia viruses but not against cowpoxvirus; elucidation of the specific adaptive immune response. // *Virol J.* - 2013. - Vol. 10. - P. 229]. Частичную защиту мышей от гибели при контрольном заражении обеспечивала вакцинация экспрессированным в *E. coli* белком A4 [Demkowicz, W.E., Maa, J.S., Esteban, M. Identification and characterization of vaccinia virus genes encoding proteins that are highly antigenic in animals and are immunodominant in vaccinated humans. // *J. Virol.* - 1992. - Vol. 66.-P. 386-398].

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков вирусов семейства *Poxviridae* показал, что из кодируемых 150-200 белков консервативными являются лишь 90 [Gubser C, Hue S, Kellam P, Smith GL. *Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis.* // *J Gen Virol.* - 2004. - Vol. - 85. - P. 105-117.]. Из них следует отметить два иммуногенных белка H3 и L1, которые имеют высокую степень сходства и присутствуют у всех представителей семейства.

Известны белки вируса оспы овец P17 (SPPV095), P18 (SPPV117), P32 (SPPV074) с антигенной активностью, которые были экспрессированы в *E. coli*. На их основе разработана тест-система ИФА для обнаружения антител к каприпоксвирусам [Орлова Е.С. Совершенствование методов диагностики оспы овец и оспы коз. дисс... канд. Биол. наук: 03.00.06. Владимир, 2007. - с.133 РГБ ОД 61:07-3/1074]. Данные белки являются ортологами белков A4, A27, B5 *Vaccinia virus*, соответственно [Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sur JH, Sandybaev NT, Kerembekova UZ, Zaitsev VL, Kutish GF, Rock DL. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. // *J Virol.* - 2002. - Vol. 76(12). - P. 6054-6061.]. Также исследования по экспрессии и изучению антигенных свойств белков вируса оспы овец были проведены зарубежными авторами. Для двух рекомбинантных белков SPPV095 и SPPV103 была показана возможность использования при разработке диагностических тест-систем [Bowdena T.R., Coupar B. E., Babiuk S.L., White J.R., Boyd V., Duch C.J., Shiell B.J., Ueda N., Parkyn G.R., Copps J.S., Boyle D.B. Detection of antibodies specific for sheeppox and goatpox viruses using recombinant capripoxvirus antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay // *Journal of Virological Methods.* - 2009. - Vol. 161. - P.19-29].

Белки SPPV60 [Бейсенов Д.К., Станбекова Г.Э., Надирова Л.Т., Исаков Б.К. Синтез белка оболочки L1RΔ вируса оспы овец в растениях. // *Вестник КазНУ. Серия биологическая.* - 2014. - Т. 60, №1(2). - с.187-190] и SPPV122 [Надирова Л.Т., Станбекова Г.Э., Червякова О.В., Сандыбаев Н.Т., Султанкулова К.Т., Строчков В.М., Жигайлов А.В., Полимбетова Н.С., Зайцев В.Л., Исаков Б.К. Синтез белка внешней оболочки вируса оспы овец в растительной системе in vitro. // *Вестник КазНУ. Серия биологическая.* - 2011. - Т.50, №4. - с.70-74] были экспрессированы в растительной системе. Для экспрессии белка потребовалось введение в конструкции плазмидных ДНК искусственных трансляционных энхансеров.

Наиболее близким к заявленному изобретению являются штаммы *E. coli* M15, трансформированные рекомбинантными плазмидными ДНК на основе вектора pQE, экспрессирующие рекомбинантные белки вируса оспы овец P17 (SPPV095), P18 (SPPV117), P32 (SPPV074). Рекомбинантные белки проявляли антигенные свойства, взаимодействуя с сыворотками крови от больных и переболевших оспой овец выход целевого продукта составлял 16, 12, 7 мг белка с 1 л культуры, соответственно [Орлова Е.С. Совершенствование методов диагностики оспы овец и оспы коз : дисс... канд. биол. наук: 03.00.06. Владимир, 2007. - с.133 РГБ ОД 61:07-3/1074]. Однако невысокий уровень накопления в указанной клеточной системе не позволял получать рекомбинантные белки в производственных количествах с небольших объемов бактериальной культуры. Аналог к заявленному изобретению для белка SPPV141 вируса оспы овец в Республике Казахстан и в доступной зарубежной базе данных отсутствует.

(SPPV095), антигенной системы ИФА, методов, канд. Биол. 33 РГБ ОД, ортологами, ответственно, L, Sur JH, v VL, Kutish and goatpox 6054-6061.] и изучению овец были. Для двух SPPV103 была разработке T.R., Coupach C.J., Shiell, Boyle D.B. sheeppox and capripoxvirus immunosorbent - 2009. - Vol.

Техническим результатом заявляемого изобретения является создание таких плазмидных ДНК рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM, и на их основе таких штаммов бактерий *E.coli*, обеспечивающих синтез высокоспецифичных рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, которые распознаются сыворотками больных и переболевших оспой овец и вызывают выработку вируснейтрализующих антител в организме животных.

Указанный технический результат достигается конструированием плазмид рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM путем встраивания в плазмидный вектор рЕТ26b(+) последовательностей ДНК, кодирующих фрагмент белка SPPV060 вируса оспы овец с 1 по 188 аминокислотные остатки или белок SPPV095 вируса оспы овец, или белок SPPV117 вируса оспы овец, или фрагмент белка SPPV122 вируса оспы овец с 68 по 195 аминокислотные остатки, или фрагмент белка SPPV141 вируса оспы овец с 6 по 184 аминокислотные остатки, соответственно. Трансформация полученными плазмидами клеток *E.coli*, штамм Т7, обеспечивает синтез рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, взаимодействующих с сыворотками от больных и переболевших оспой овец и вызывающих выработку антител в организме животных с вируснейтрализующей активностью.

Сущность изобретения состоит в следующем:

Генно-инженерными методами получают плазмиды рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM, содержащие гены, кодирующие рекомбинантные белки SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, содержащие фрагмент белка SPPV060 вируса оспы овец с 1 по 188 аминокислотные остатки, или белок SPPV095 вируса оспы овец, или белок SPPV117 вируса оспы овец, или фрагмент белка SPPV122 вируса оспы овец с 68 по 195 аминокислотные остатки, или фрагмент белка SPPV141 вируса оспы овец с 6 по 184 аминокислотные остатки, соответственно, и С-концевой олигопептид LЕNNNNNN. Последовательности ДНК, кодирующие соответствующие фрагменты белков вируса оспы овец, получают методом ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК вируса оспы овец, штамм НИСХИ.

Клетки *E.coli* Т7 трансформируют сконструированными плазмидами рЕТ/SPPV060ΔTM, или рЕТ/SPPV095, или рЕТ/SPPV117, или рЕТ/SPPV122ΔTM, или рЕТ/SPPV141ΔTM и выращивают в течение ночи. Ночную культуру (1/50) засевают в свежую среду LB с канамицином (50 мкг/мл). Синтез белков индуцируют добавлением изопропилгалактозида (ИПТГ) до концентрации 0,5 мМ в период среднелогарифмической фазы роста культуры. Индуцированные клетки инкубируют в течение 4 ч

при 37°C, после чего собирают центрифугированием при 5000 g. Из индуцированных клеток выделяют рекомбинантные белки методом аффинной хроматографии. В результате получают рекомбинантные белки SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, имеющие молекулярные массы 22, 20, 19, 16, 20 кДа, соответственно, и состоящие из фрагментов или полных белков вируса оспы овец и С-концевого олигопептида LЕNNNNNN, включающие аминокислотные последовательности, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, представленные на фиг.1, а-д.

Исходным генетическим материалом для конструирования рекомбинантных плазмид рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM являются:

а) плазмидный вектор рЕТ26b(+) (Novagen, США), обеспечивающий вставку фрагментов ДНК, кодирующих белки (фрагменты белков) SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, и их экспрессию под контролем промотора Т7;

б) фрагменты ДНК, кодирующие белки (фрагменты белков) SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141, которые получают в полимеразной цепной реакции с использованием в качестве матрицы ДНК вируса оспы овец, штамм НИСХИ, и олигонуклеотидных праймеров: SPPV060-DIR-attcatatggagcagccgctagtatacaaac, SPPV060-REV-gactcgagtataaaattgatccgctatc, SPPV095-DIR-cccataatggactctatgaaaaaatatac, SPPV095-REV-ctcgagcttctgttattatcatcc, SPPV117-REV-gcatctcgagtcacttttagtgttaattcttctgttt, SPPV117-DIR-gcatcata/ggacagagagcgttatcaattctccaggcga, SPPV122-DIR-cccataatggaataatacatgtgaattaatc, SPPV122-REV-ccctcgagttattaaaagtcatcatgaaaaaagatcttacacagtaata, SPPV 141-DIR-cccatatgatgttattgtattttattatgt, SPPV 141-REV-ctcgagctaatttttatcaaaagta, обеспечивающих наличие в продуктах амплификации сайтов рестрикции NdeI и XhoI.

Полученные в результате плазмиды рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM (фиг.2), характеризуются следующими признаками:

а) имеют размер 5826, 5726, 5693, 5633, 5780 п.о., соответственно;

б) кодируют рекомбинантные белки SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, содержащие фрагмент белка SPPV060 вируса оспы овец с 1 по 188 аминокислотные остатки, или белок SPPV095 вируса оспы овец, или белок SPPV117 вируса оспы овец, или фрагмент белка SPPV122 вируса оспы овец с 68 по 195 аминокислотные остатки, или фрагмент белка SPPV141 вируса оспы овец с 6 по 184 аминокислотные остатки, соответственно, и С-концевой олигопептид LЕNNNNNN;

в) состоят из следующих элементов:

- фрагмента ДНК размером 564 п.о., кодирующий фрагмент белка SPPV060 вируса оспы овец с 1 по 188 аминокислотные остатки, или размером 483 п.о.,

кодирующий белок SPPV095 вируса оспы овец, или размером 447 п.о., кодирующий белок SPPV117 вируса оспы овец, или размером 384 п.о., кодирующий фрагмент белка SPPV122 вируса оспы овец с 68 по 195 аминокислотные остатки, размером 534 п.о., кодирующий фрагмент белка SPPV141 вируса оспы овец с 6 по 184 аминокислотные остатки, и С-концевого олигопептида LЕNNNNНН;

- плазмидного вектора рЕТ26b(+), обеспечивающего эффективную транскрипцию полученных генов, кодирующих рекомбинантные белки вируса оспы овец, и их экспрессию;

г) содержат:

- сайт инициации репликации плазмиды рВR322;
- промотор бактериофага Т7;
- генетический маркер kan, определяющий устойчивость к канамицину при трансформации клеток *E. coli*,

- рекомбинантный ген, кодирующий фрагмент белка SPPV060 вируса оспы овец с 1 по 188 аминокислотные остатки, или белок SPPV095 вируса оспы овец, или белок SPPV117 вируса оспы овец, или фрагмент белка SPPV122 вируса оспы овец с 68 по 195 аминокислотные остатки, или фрагмент белка SPPV141 вируса оспы овец с 6 по 184 аминокислотные остатки, соответственно, и С-концевой олигопептид LЕNNNNНН.

Для получения штаммов продуцентов рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец компетентные клетки бактерий *E. coli* Т7 (fhuA2 lacZ::T7 genel [lon] ompT gal sulAll R(mcr-73::miniTnl0--Tet^r)2 [dcm] R(zgb-210::Tnl0-Tet^r) endAl Δ(mcrC-mrr)114::IS10), NEB, трансформируют сконструированными плазмидными ДНК рЕТ/SPPV060ΔТМ, или рЕТ/SPPV095, или рЕТ/SPPV117, или рЕТ/SPPV122ΔТМ, или рЕТ/SPPV141ΔТМ. Полученные таким образом штаммы *E. coli* Т7/рЕТ/SPPV060ΔТМ, Т7/рЕТ/SPPV095, Т7/рЕТ/SPPV117, Т7/рЕТ/SPPV122ΔТМ, Т7/рЕТ/SPPV141ΔТМ характеризуются следующими признаками:

Морфологические признаки. Клетки мелкие утолщенной палочковидной формы, грамотрицательные, неспороносные.

Культуральные признаки. Клетки хорошо растут на простых питательных средах. На твердой агаровой среде образуют круглые, гладкие, прижатые, мутные с ровным краем колонии. При росте на жидких средах образуют интенсивную ровную муть. Оптимальная температура 37°C, рН от 6,8 до 7,0.

Устойчивость к антибиотикам. Бактерии устойчивы к канамицину (50 мкг/мл) за счет плазмидной ДНК.

Штаммы *E. coli* Т7/рЕТ/SPPV060ΔТМ, Т7/рЕТ/SPPV095, Т7/рЕТ/SPPV117, Т7/рЕТ/SPPV122ΔТМ, Т7/рЕТ/SPPV141ΔТМ обеспечивают индуцируемый ИПТГ синтез рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 с выходом 40-60 мг очищенного белка с 1 л культуры.

Полученные штаммы депонированы в Коллекции микроорганизмов Республиканского

государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан под регистрационными номерами М-3-15/Д, М-4-15/Д, М-5-15/Д, М-6-15/Д, М-7-15/Д, соответственно.

Изобретение иллюстрируется графическими материалами, представленными на фиг. с 1 по 5 и таблицей 1.

Фиг.1а. Нуклеотидная последовательность и кодируемая ею аминокислотная последовательность фрагмента плазмиды рЕТ/SPPV060ΔТМ, кодирующая рекомбинантный белок SPPV060, состоящий из фрагмент белка SPPV060 вируса оспы овец с 1 по 188 аминокислотные остатки и С-концевого олигопептида LЕNNNNНН.

Фиг.1б. Нуклеотидная последовательность и кодируемая ею аминокислотная последовательность фрагмента плазмиды рЕТ/SPPV095, кодирующая рекомбинантный белок SPPV095, состоящий из белка SPPV095 вируса оспы овец

Фиг.1в. Нуклеотидная последовательность и кодируемая ею аминокислотная последовательность фрагмента плазмиды рЕТ/SPPV117, кодирующая белок SPPV117 вируса оспы овец и С-концевого олигопептида LЕNNNNНН.

Фиг.1г. Нуклеотидная последовательность и кодируемая ею аминокислотная последовательность фрагмента плазмиды рЕТ/SPPV122ΔТМ, кодирующая фрагмент белка SPPV122 вируса оспы овец с 68 по 195 аминокислотные остатки и С-концевого олигопептида LЕNNNNНН.

Фиг.1д. Нуклеотидная последовательность и кодируемая ею аминокислотная последовательность фрагмента плазмиды рЕТ/SPPV141ΔТМ, кодирующая фрагмент белка SPPV141 вируса оспы овец с 6 по 184 аминокислотные остатки и С-концевого олигопептида LЕNNNNНН.

Фиг.2. Общая схема структурной организации плазмид рЕТ/SPPV060ΔТМ, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔТМ, рЕТ/SPPV141ΔТМ (физическая карта). SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 - гены, кодирующие соответствующие рекомбинантные белки, Т7 promoter - промотор фага Т7, Т7 terminator - терминатор фага Т7, kan-ген устойчивости к канамицину, указаны также некоторые сайты рестрикции.

Фиг.3. Электрофоретический анализ белков клеточного лизата *E. coli* штамма Т7, трансформированного плазмидами рЕТ/SPPV060ΔТМ (а), рЕТ/SPPV095 (б), рЕТ/SPPV117 (в), рЕТ/SPPV122ΔТМ (г), рЕТ/SPPV141ΔТМ (д). М - маркер молекулярного веса (ThermoScientific, США); Pre - клеточный лизат до индукции; Tot - после индукции ИПТГ; So - растворимые белки; IN - включения.

Фиг.4. Электрофоретический анализ очищенных белковых препаратов. М - маркер молекулярного веса; 1 - SPPV095; 2 - SPPV117; 3 - SPPV122; 4 - SPPV141; 5 - SPPV060.

Фиг.5. Вестерн-блот анализ рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122. В

«Научно-биологической»
Министерства
Австралии под
M-4-15/D,
временно.

афическими
с 1 по 5 и

ельность и
вательность
PPV060ΔTM,
SPPV060,
вируса оспы
остатки и

ельность и
вательность
кодирующая
стоящий из

тельность и
вательность
кодирующая
С-концевого

тельность и
вательность
PPV122ΔTM,
вируса оспы
остатки и

Н.
тельность и
овательность
PPV141ΔTM,
вируса оспы
остатки и

организации
ET/SPPV095,
SPPV122ΔTM,
а). SPPV060,
V141 - гены,
комбинантные
, T7 terminator
ойчивости в
которые сайты

ализ белков
штамма T7
плазмидами
PV095 (б),
22ΔTM (г),
молекулярного
еточный лизат
уки IPTG
ия.

из очищенных
молекулярного
3 - SPPV122,
комбинантных
7, SPPV122. В

гель вносили по 5 мкл очищенных препаратов белков SPPV060 (дорожка 1), SPPV095 (дорожка 2), SPPV117 (дорожка 3), SPPV122 (дорожка 4), очищенный вирус оспы овец (дорожка 5). Сыворотка от экспериментально инфицированных вирусом оспы овец (а), сыворотка от здоровых овец (б). Рекомбинантные белки отмечены звездочками.

Сущность предлагаемого изобретения поясняется примерами его исполнения и использования.

Пример 1. Способ конструирования плазмид рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM

В качестве матрицы для амплификации генов, кодирующих белки SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141, используют геномную ДНК вируса оспы овец, штамм НИСХИ. Амплификацию генов проводят на термоциклере GeneAmp PCR 9700, Applied Biosystems. Состав ПЦР смеси (50 мкл): 5 мкл 10×ПЦР буфера (Qiagen), 1 мкл 10mM dNTPs (Qiagen), 2 мкл ДНК, 2 мкл каждого праймера (20 пМоль/мкл), 0,25 мкл Taq-полимеразы (2,5 units, Qiagen), 37,75 мкл H₂O. Условия проведения реакции: 94°C - 5 мин; затем 30 циклов 94°C - 30 с, 55°C (для гена SPPV122 - 45°C) - 30 с, 72°C - 60 с, и 1 цикл 72°C - 10 мин.

Продукты амплификации, кодирующие фрагменты генов SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, расщепляют ферментами рестрикции NdeI и XhoI. Аналогично проводят обработку рестриктазами плазмидной ДНК вектора рЕТ26b(+). После чего линейаризованный вектор и ПЦР-фрагменты очищают электрофоретически в 1% агарозном геле с последующим выделением ДНК с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, в соответствии с рекомендациями производителя. Лигирование проводят в стандартном буфере с использованием T4-ДНК-лигазы. Полученной лигазной смесью трансформируют клетки E.coli T7. С помощью рестрикционного анализа и ПЦР отбирают клоны, содержащие вставки соответствующих размеров. Полученные таким образом целевые плазмиды обозначают рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM, соответственно. Схемы плазмидных ДНК рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM (физические карты) представлены на фиг.2.

Пример 2. Получение штаммов-продуцентов рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец

Клетки E.coli T7 трансформируют полученными плазмидами рЕТ/SPPV060ΔTM, или рЕТ/SPPV095, или рЕТ/SPPV117, или рЕТ/SPPV122ΔTM, или рЕТ/SPPV141ΔTM. Из единичной колонии трансформированных клеток готовят ночную культуру при 37°C. Ночную культуру (1/50) засевают в свежую среду LB с канамицином (50 мкг/мл) и инкубируют при 37°C. Когда культура достигнет среднелогарифмической фазы роста индуцируют синтез белка добавлением в изопропилгалатозид до конечной концентрации 0.5 mM. Индуцированные

клетки инкубируют при 37°C в течение 4 ч, после чего клетки собирают центрифугированием при 5000 g и анализируют методом электрофореза в 12% ДСН-ПААГ [Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed. John Wiley & Sons, Ltd, 1999. - 1104 pp. ISBN-13 978-0-471-32938-1]. Результаты этого анализа, представленные на фиг.3, показывают наличие в индуцированных культурах клеток E.coli T7/pET/SPPV060ΔTM, T7/pET/SPPV095, T7/pET/SPPV117, T7/pET/SPPV122ΔTM, T7/pET/SPPV141ΔTM дополнительного белка с молекулярной массой 22, 20, 19, 16, 20 кДа, соответственно, что согласуется с расчетными значениями молекулярных масс рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141, который отсутствует в контрольном лизате индуцированных клеток E.coli T7.

Пример 3. Очистка рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец

Рекомбинантные белки SPPV060, SPPV095, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец получают из фракции клеточных включений и белок SPPV117 из цитоплазматической фракции индуцированных клеток E.coli T7/pET/SPPV060ΔTM, T7/pET/SPPV095, T7/pET/SPPV122ΔTM, T7/pET/SPPV141ΔTM, и T7/pET/SPPV117, соответственно, в результате аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе, Invitrogen, США, согласно инструкции производителя.

Индуцированные клетки осаждают центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин. Осадок растворяют в BugBuster Master Mix, Novogen, США, из расчета 5 мл на 1 г сырого веса клеток, выдерживают 30 мин при комнатной температуре, после чего центрифугируют 16000 g 15 мин при 4°C. Надосадок, представляющий собой цитоплазматическую фракцию, переносят в чистую пробирку. Осадок трижды отмывают BugBuster Master Mix, разведенным водой 1/10. Осадок представляет собой клеточные включения, которые растворяют буфером А, содержащим 50 mM Na-фосфатный буфер pH 8.0, 300 mM, 8 M мочевины.

Полученные фракции используют для выделения рекомбинантных белков методом аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе, Invitrogen, США, согласно инструкции производителя в нативных условиях для белка SPPV117 и в денатурирующих условиях для белков SPPV060, SPPV095, SPPV122, SPPV141. Полученные белковые фракции диализуют против 150 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl, pH 7.5 и анализируют электрофорезом в 12% ДНС-ПААГ [Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed. John Wiley & Sons, Ltd, 1999. 1104 pp. ISBN-13 978-0-471-32938-1]. Пример электрофоретического анализа приведен на фиг.4.

Определение концентрации рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец в препаратах проводят по методу Лоури [Lowry O.H., Rosebraugh N.J. Protein

measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. - 1951 - Vol. 193. - P. 265-275]. Для построения калибровочной кривой используют бычий сывороточный альбумин. Общий выход белков составляет 40-60 мг очищенного белка с 1 л культуры клеток *E. coli*.

Пример 4. Оценка иммунохимических свойств рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец

Очищенные белки SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец анализируют с помощью вестерн-блот анализа с использованием сывороток от овец больных или переболевших оспой. В качестве отрицательного контроля используют сыворотку от здоровых животных. Для этого проводят электрофорез очищенных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 в 12 % ДНС-ПААГ и переносят на нитроцеллюлозную мембрану [Towbin H., Staehlin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1979. - Vol. 76. - P. 4350], которую после блокирования сайтов неспецифического связывания раствором 5% сухого молока в буфере TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1% tween-20, pH 7.5) инкубируют с антивирусными сыворотками, разведенными в том же буфере 1:10000. Связавшиеся антитела проявляют конъюгатом антиовечьих IgG со щелочной фосфатазой в разведении 1:10000. Визуализацию иммунного комплекса осуществляют с использованием 5-бромо-3-индолил фосфата и нитротетразолиевого голубого. Пример вестерн-блот анализа приведен на фиг.5.

Пример 5. Иммунизация кроликов рекомбинантными белками SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец

Для получения сывороток к рекомбинантным белкам SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец проводят четырехкратную иммунизацию кроликов с интервалом в 3 недели. Для первого введения используют очищенные препараты рекомбинантных белков в комплексе с полным адъювантом Фрейнда, три последующие иммунизации проводят белками с в комплексе с неполным адъювантом Фрейнда. Через одну неделю после последней иммунизации проводят обескровливание животных для получения сывороток крови.

Пример 5. Оценка вирус-нейтрализующей активности антител, полученных к рекомбинантным белкам вируса SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец

Способность рекомбинантных белков вызывать образование вируснейтрализующих антител в организме животных проверяют в реакции нейтрализации вируса оспы овец с использованием сывороток полученных к целевым белкам.

Для постановки реакции нейтрализации вируса оспы овец используют первичную культуру клеток почки ягненка. Конфлюентный монослой клеток трипсинизируют и ресуспендируют в полной среде. Определяют концентрацию клеток с помощью гематометра и сеют клетки в 96-луночные планшеты (Corning, USA) 5×10^4 клеток/луночка (0.2 мл/луночка в конечном объеме). Планшеты инкубируют при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 ч до получения конфлюентного монослоя.

Исследуемые сыворотки инактивируют при 60°C 30 мин и готовят двукратные разведения от 1:2 до 1:64 в объеме 2 мл каждого разведения используют среду с содержанием 2% FBS в качестве разбавителя. Затем к каждому разведению сыворотки добавляют равный объем вируса оспы овец в дозе 100 ТЦД₅₀. Смесь вируса с разведениями сывороток инкубируют при 4°C в течение 16 ч. Каждой смесью заражают по четыре лунки с монослоем клеток в 96-луночной планшете в объеме 200 мкл. Инфицированную культуру клеток инкубируют при 37°C в течение одной недели для оценки цитопатического действия вируса. Результаты учитывают на 7 день по наличию цитопатических изменений в культуре клеток. Разведение, которое ингибирует цитопатический эффект, вызванный вирусом, в 50% инфицированных культур клеток принимают за титр нейтрализующих антител исследуемой сыворотки. В реакции используют следующие контроли: контроль вируса (вирус + среда); контроль сыворотки (сыворотка + среда).

Результаты теста подтвердили способность рекомбинантных белков вызвать выработку в организме животных вируснейтрализующих антител (табл.1).

Из изложенного выше видно, что полученные плазмидные ДНК и бактериальные штаммы продуценты, обеспечивающие экспрессию рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец имеющих молекулярные массы 22, 20, 19, 16, 20 кДа соответственно.

Рекомбинантные белки распознаются сыворотками от больных или переболевших оспой овец и вызывают в организме животных выработку вируснейтрализующих антител.

Таблица

Вируснейтрализующая активность сывороток полученных к рекомбинантным белкам SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец

Компоненты	Геометрический средний титр вируснейтрализующих антител к вирусу оспы овец, log ₂
Сыворотка к белку SPPV060	3,75
Сыворотка к белку SPPV095	0,00
Сыворотка к белку SPPV117	4,00

Компоненты	Геометрический средний титр вируснейтрализующих антител к вирусу оспы овец, log ₂
Сыворотка к белку SPPV122	3,50
Сыворотка к белку SPPV141	3,25

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантные плазмидные ДНК рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM, обеспечивающие синтез рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец в клетках *Escherichia coli* T7, размерами 5826, 5726, 5693, 5633, 5780 п.о., соответственно и содержащие согласно физическим и генетическим картам плазмид, как показано на фигуре 2:

- плазмидный вектор рЕТ26b(+), раскрытый по сайтам NdeI и XhoI, включающий фрагмент, кодирующий олигопептид LENNNNNH, и уникальные сайты рестрикции NdeI и XhoI;

- NdeI - XhoI-фрагмент размером 564 п.о., кодирующий фрагмент белка SPPV060 вируса оспы овец с 1 по 188 аминокислотные остатки, или NdeI - XhoI-фрагмент размером 483 п.о., кодирующий белок SPPV095 вируса оспы овец, или NdeI - XhoI-фрагмент размером 447 п.о., кодирующий белок SPPV117 вируса оспы овец, или NdeI - XhoI-фрагмент размером 384 п.о., кодирующий фрагмент белка SPPV122 вируса оспы овец с 68 по 195 аминокислотные остатки, или NdeI - XhoI-фрагмент размером 534 п.о., кодирующий фрагмент белка SPPV141 вируса оспы овец с 6 по 184 аминокислотные остатки, причем нуклеотидные последовательности и кодируемые ею аминокислотные последовательности фрагментов белков и С-концевого олигопептида LENNNNNH,

фрагмента плазмидного вектора, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, как показано на фиг.1, а-д.

2. Штаммы бактерий *Escherichia coli* T7/pET/SPPV060ΔTM, T7/pET/SPPV095, T7/pET/SPPV117, T7/pET/SPPV122ΔTM, T7/pET/SPPV141ΔTM, - продуценты рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, содержащие соответственно рекомбинантные плазмидные ДНК рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM по п.1 и депонированные в Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан под регистрационными номерами М-3-15/D, М-4-15/D, М-5-15/D, М-6-15/D, М-7-15/D, соответственно.

3. Рекомбинантные белки SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, используемые для создания диагностических тест-систем и конструирования субъединичных вакцин против оспы овец, имеющие молекулярные массы 22, 20, 19, 16, 20 кДа, соответственно, и состоящие из фрагментов или полных белков вируса оспы овец и С-концевого олигопептида LENNNNNH, включающие аминокислотные последовательности, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, как показано на фиг.1.

Таблица

060. SPPV095.

ейтрализующих
log₂

<110> Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (РГП на пхв НИИПББ КН МОН РК)

<120> Рекомбинантные плазмидные ДНК рЕТ/SPPV060ΔTM, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔTM, рЕТ/SPPV141ΔTM, обеспечивающие синтез рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, штаммы бактерий *E.coli* T7 – продуценты рекомбинантных вирусных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141, и рекомбинантные белки вируса оспы овец SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 для создания диагностических тест-систем и конструирования субъединичных вакцин против оспы овец

<160> 5

<210> 1

<211> 591

<212> DNA

<213> sheep pox virus

<400> 1

1	Met Gly Ala Ala Ala Ser Ile Gln Thr Thr Val Asn Thr Leu Asn
	ATG GGA GCA GCC GCT AGT ATA CAA ACT ACT GTC AAT ACT TTA AAT
46	Glu Lys Ile Ser Ser Asn Leu Glu Gln Thr Ala Glu Ala Thr Ala
	GAA AAA ATA AGT AGT AAT TTG GAA CAA ACT GCT GAA GCT ACT GCG
91	Glu Ala Lys Cys Asp Ile Glu Ile Gly Asn Ile Val Phe Arg Gln
	GAA GCA AAA TGC GAT ATA GAA ATA GGA AAT ATT GTA TTT AGA CAA
136	Asn Lys Gly Cys Asn Val Thr Val Lys Asn Leu Cys Ser Ser Lys
	AAT AAG GGT TGT AAT GTT ACT GTA AAA AAC TTG TGT TCG TCT AAA
181	Ala Glu Ser Gln Leu Asp Ala Ile Leu Lys Ala Ala Thr Glu Thr
	GCA GAA TCT CAA TTA GAT GCC ATA TTA AAA GCA GCA ACA GAA ACC
226	Tyr Asp Ser Leu Thr Pro Asp Gln Lys Ala Tyr Val Pro Gly Leu
	TAT GAT TCA CTT ACT CCT GAT CAA AAA GCC TAT GTT CCA GGA TTG
271	Ile Thr Ala Ala Leu Asn Ile Gln Thr Ser Val Asn Thr Val Val
	ATA ACA GCG GCA TTA AAT ATC CAA ACA AGT GTT AAT ACT GTG GTT
316	Lys Asp Phe Glu Thr Tyr Val Lys Gln Lys Cys Thr Ser Lys Ser
	AAA GAT TTT GAA ACC TAT GTA AAA CAA AAA TGT ACA TCA AAA TCG
361	Val Ile Asp Asn Lys Leu Lys Ile His Asn Ile Phe Ile Asp Glu
	GTT ATT GAT AAT AAA TTG AAG ATT CAT AAT ATT TTT ATT GAC GAA

Фиг. 1 а

406 Cys Val Ala Pro Thr Gly Thr Thr Thr Asn Phe Glu Phe Ile Asn
 TGT GTT GCA CCA ACC GGA ACA ACG ACA AAC TTT GAA TTT ATT AAT
 451 Ser Gly Thr Ser Gln Gly Ile Cys Ala Ile Lys Thr Leu Met Asp
 TCT GGA ACC AGT CAG GGT ATA TGT GCA ATA AAA ACG TTA ATG GAT
 496 Val Thr Thr Lys Ala Ser Thr Lys Phe Ser Pro Ser Gln Ser Ser
 GTA ACC ACA AAA GCG AGT ACA AAA TTT TCC CCT AGT CAA AGT TCG
 541 Gly Tyr Gly Tyr Gln Phe Tyr Ile Leu Glu His His His His His
 GGA TAC GGA TAT CAA TTT TAT ATA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC
 His ***
 586 CAC TGA

Фиг. 1 а (продолжение)

<210> 2

<211> 519

<212> DNA

<213> sheep pox virus

<400> 2

1	Met Asp Phe Met Lys Lys Ser Thr Lys Asp Leu Glu Thr Thr Val
	ATG GAC TTC ATG AAA AAA TCC ACT AAA GAT TTA GAA ACA ACT GTA
46	Arg Asn Lys Lys Asp Glu Glu Ile Ala Ser Thr Pro Asn Leu Ile
	AGA AAT AAA AAA GAT GAA GAA ATA GCT TCT ACT CCA AAT TTA ATT
91	Asn Asn Lys Ser Val Thr Leu Thr Asp Val Asp Thr Met Leu Lys
	AAC AAC AAA TCT GTT ACA TTA ACT GAT GTA GAT ACT ATG TTA AAA
136	Ser Lys Glu His Leu Tyr Gln Gln Met Met Ile Asn Gln Leu Glu
	AGT AAA GAA CAT TTA TAT CAA CAA ATG ATG ATA AAT CAA TTG GAA
181	Glu Lys Lys Thr Leu Lys Ile Lys Asn Ile Glu Ile Lys Asn Asn
	GAA AAA AAA ACA TTA AAA ATC AAA AAT ATA GAA ATC AAA AAC AAC
226	Ser Asn Lys Leu Asn Asp Gln Cys Ser Glu Lys Lys Gln Asn Asp
	AGT AAT AAA CTC AAC GAT CAA TGT AGT GAA AAA AAA CAA AAT GAT
271	Pro Leu Lys Lys Ile Lys Ser Ile Ser His Asp Glu Leu Val Lys
	CCA TTA AAA AAA ATA AAA TCT ATT AGC CAT GAT GAA CTA GTA AAG
316	Glu Leu Lys Asp Ile Lys Asp Lys Thr Lys Ser Leu Gln Asp Asp
	GAA CTG AAA GAT ATA AAA GAT AAA ACT AAA TCA CTT CAA GAT GAT
361	Ser Asp Ser Leu Ile Lys Asp Thr Ser Val Ala Lys Asp Thr Thr
	TCT GAT TCA CTT ATT AAA GAT ACT TCA GTT GCT AAA GAT ACA ACT
406	Phe Asp Ala Ile Asn Ser Ile Met Asn Asp Leu Lys Lys Arg Leu
	TTT GAT GCT ATA AAC TCA ATT ATG AAT GAC TTA AAA AAG AGA TTA
451	Asn Ile Asp Lys Leu Asp Asp Asn Asn Ser Lys Ala Ala Ala Leu
	AAT ATA GAC AAA CTG GAT GAT AAT AAC AGC AAA GCG GCC GCA CTC
496	Glu His His His His His His ***
	GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA

Фиг. 16

<210> 3

<211> 486

<212> DNA

<213> sheep pox virus

<400> 3

```

Met Asp Arg Ala Leu Ser Ile Phe Pro Gly Asp Asp Asp Glu Thr
1 ATG GAC AGA GCG TTA TCA ATC TTT CCA GGC GAC GAT GAT GAA ACC

Asn Glu Arg Asn Ile Asn His Arg Glu Lys Thr Ser Asn Asp His
46 AAT GAA AGA AAT ATA AAT CAC AGA GAG AAA ACT AGT AAT GAT CAC

Gly His Tyr Glu Asp Asn Leu Leu Glu Leu Ser Asp Glu Glu Pro
91 GGT CAT TAT GAA GAT AAT CTT TTG GAA TTA AGC GAT GAA GAA CCC

Asn Met Ile Lys Ile Lys Asn Asp Ile Asn Lys Ile Ile Asn Glu
136 AAT ATG ATA AAA ATA AAA AAT GAT ATT AAT AAA ATA ATT AAT GAA

Arg Tyr Ser Asn Tyr Ile Ser Ile Asn Asp Asp Glu Ile Ser Asn
181 AGA TAT AGC AAT TAT ATT TCT ATC AAC GAC GAT GAA ATT TCT AAC

Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ile Ser Asn Glu Glu Ile Gln Ile Lys
226 ATT TTA AAA GAT TCG TTC ATT AGT AAC GAA GAA ATA CAA ATA AAA

Asp Phe Val Leu Arg Leu Val Val Leu Glu Lys Leu Phe Gln Thr
271 GAT TTT GTT TTA AGA CTT GTT GTA TTA GAA AAA CTA TTT CAA ACA

Ser Val Lys Glu Cys Asn Ser Leu Lys Asn Ile Ile Lys Arg Leu
316 TCA GTA AAA GAA TGC AAT TCA CTA AAA AAT ATT ATT AAA AGA TTA

Glu Asn His Ile Glu Thr Ile Arg Lys Asn Met Ile Val Leu Thr
361 GAA AAT CAT ATA GAG ACT ATT AGA AAA AAT ATG ATT GTT TTA ACA

Lys Lys Val Asp Phe Gln Thr Gly Arg Ile Thr Thr Leu Lys Leu
406 AAA AAG GTA GAT TTT CAA ACA GGA AGA ATT ACA ACA CTA AAG CTT

Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His ***
451 GCG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA

```

Фиг. 1 в

<210> 4

<211> 405

<212> DNA

<213> sheep pox virus

<400> 4

	Met	Asn	Asn	Thr	Cys	Glu	Leu	Asn	Gln	Phe	Asn	Glu	His	Lys	Gln
1	ATG	AAT	AAT	ACA	TGT	GAA	TTA	AAT	CAA	TTT	AAT	GAA	CAC	AAA	CAG
	Tyr	Phe	Leu	Lys	Asn	Pro	Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ser	Asp	Asp	Asp
46	TAC	TTT	TTA	AAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	ACA	TAT	AGT	GAC	GAC	GAT
	Thr	Glu	Ser	Glu	Leu	Asn	Val	Tyr	Arg	Ser	Cys	Lys	Gly	Ile	Val
91	ACT	GAA	TCT	GAG	TTA	AAT	GTT	TAT	AGA	TCA	TGT	AAA	GGT	ATT	GTT
	Tyr	Ser	Gly	His	Cys	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Phe
136	TAT	AGC	GGA	CAC	TGC	TAC	ACT	TTT	AAC	TCA	GAA	CCT	AAA	AGT	TTT
	Asn	Asp	Ala	Tyr	Asp	Asp	Cys	Glu	Lys	Lys	Asn	Ser	Glu	Leu	Pro
181	AAT	GAT	GCA	TAC	GAT	GAT	TGT	GAA	AAA	AAA	AAT	AGC	GAA	TTA	CCA
	Ser	Asn	Asn	Leu	Met	Asn	Asp	Trp	Ile	Ser	Asp	Tyr	Leu	Asp	Gly
226	TCA	AAT	AAT	TTA	ATG	AAT	GAT	TGG	ATA	AGT	GAC	TAC	TTG	GAT	GGG
	Thr	Trp	Gly	Glu	Asp	Gly	Asn	Val	Leu	Phe	Lys	Glu	Lys	Asn	Gln
271	ACG	TGG	GGA	GAA	GAT	GGC	AAT	GTA	CTT	TTT	AAA	GAA	AAA	AAT	CAA
	Glu	Leu	Glu	Ala	Ile	Asp	Ile	Ser	Asp	Glu	Met	Arg	Ser	Tyr	Tyr
316	GAA	CTT	GAA	GCT	ATA	GAT	ATA	AGC	GAT	GAG	ATG	AGA	AGC	TAT	TAC
	Cys	Val	Arg	Ser	Phe	Phe	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	***
361	TGT	GTC	AGA	TCT	TTT	TTT	CTG	GAG	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	TAG

Фиг. 1 г

<210> 5

<211> 573

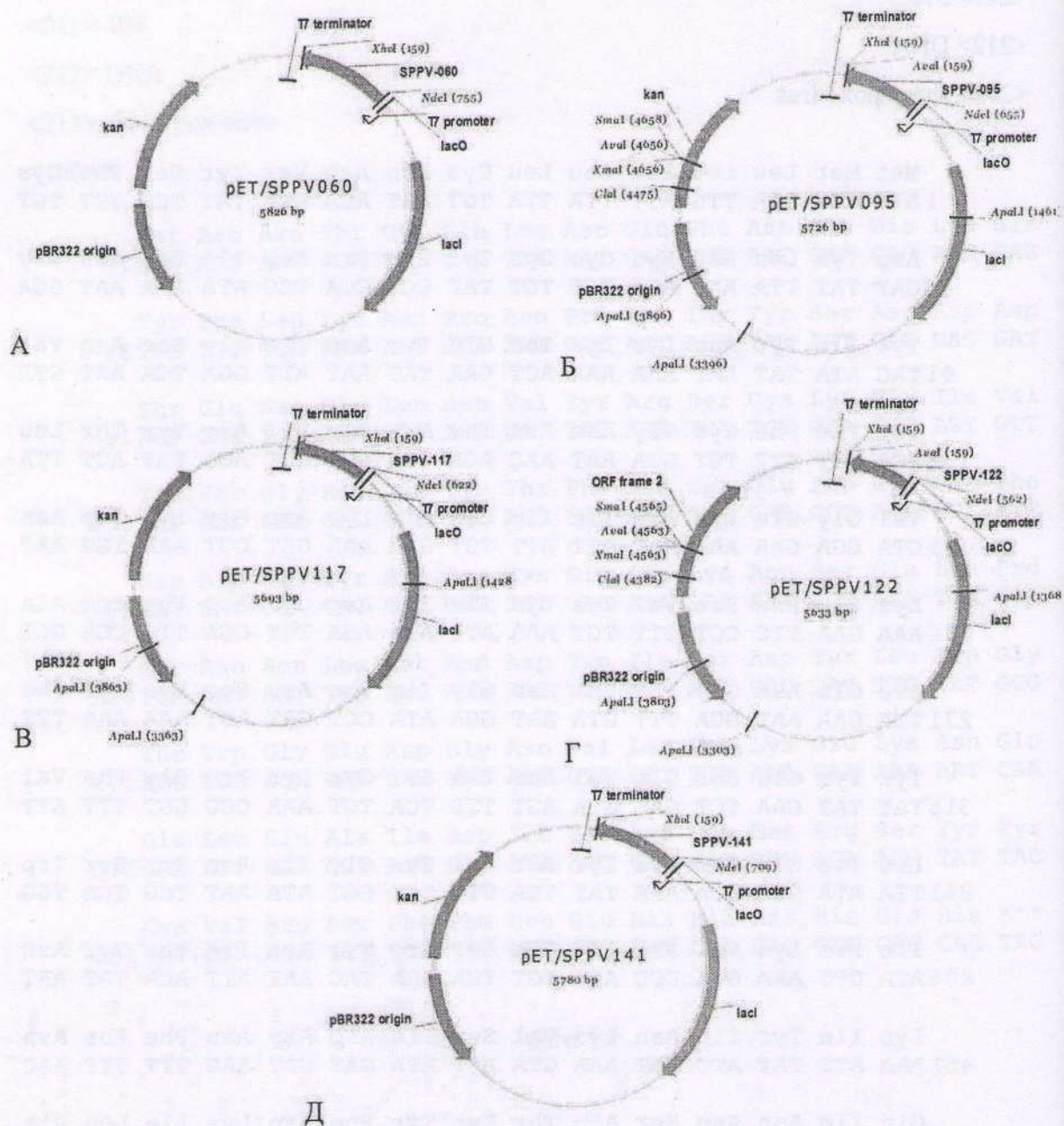
<212> DNA

<213> sheep pox virus

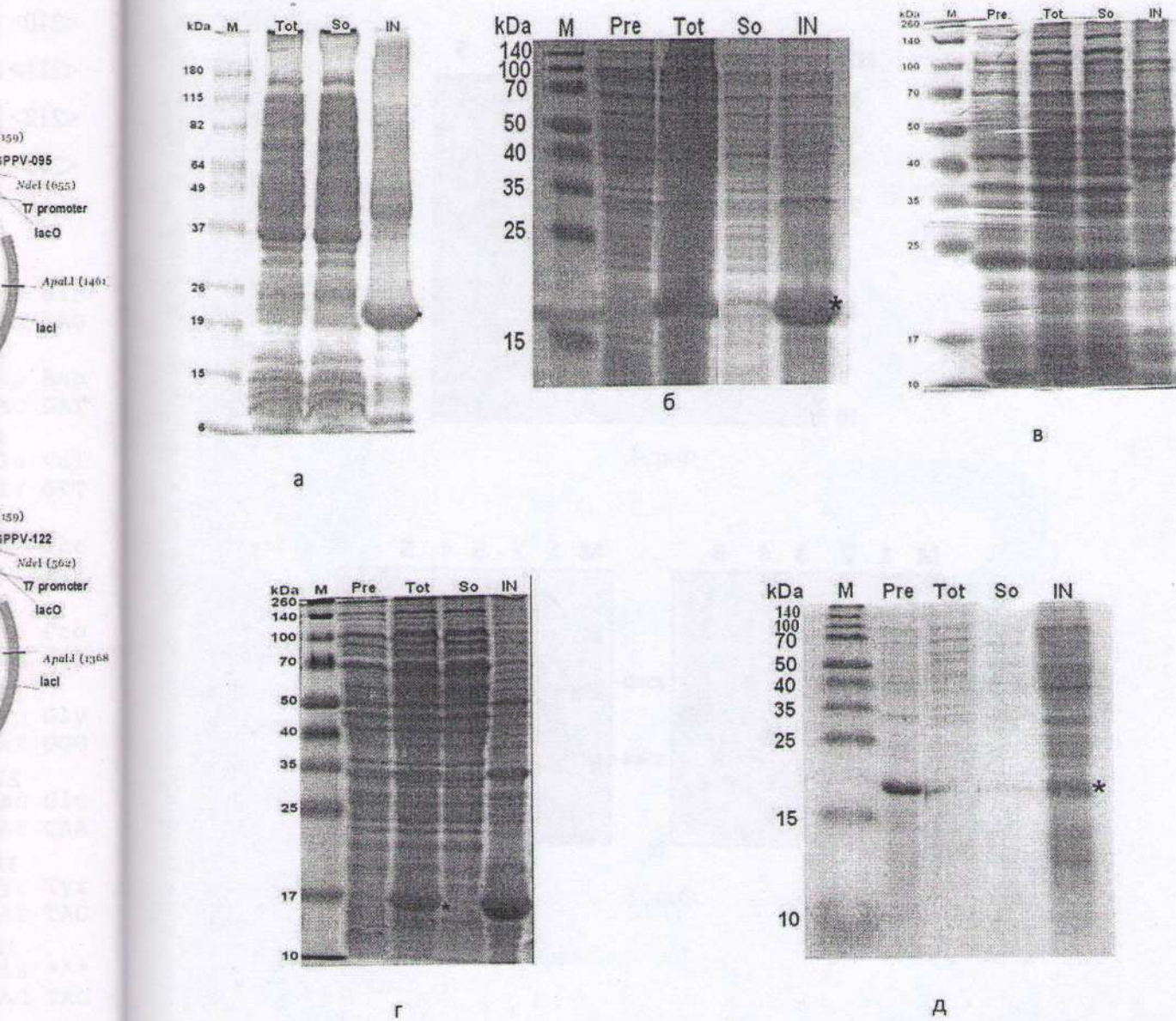
<400> 5

	Met	Met	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Cys	Asn	Arg	Val	Tyr	Ser	Phe	Cys	
	1	ATG	ATG	TTA	TTG	ATT	TTA	TTA	TGT	AAT	AGA	GTA	TAT	TCG	TTT	TGT
Lys	Gln															
AAA	CAG															
	Asp	Tyr	Leu	Asn	Lys	Cys	Cys	Tyr	Pro	Pro	Ser	Ile	Lys	Asn	Gly	
	46	GAT	TAT	TTA	AAT	AAA	TGT	TGT	TAT	CCT	CCA	TCG	ATA	AAA	AAT	GGA
Asp	Asp															
GAC	GAT															
	Tyr	Ile	Tyr	Asn	Lys	Lys	Thr	Glu	Tyr	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Val	
	91	TAC	ATA	TAT	AAT	AAA	AAA	ACT	GAA	TAT	AAT	ATT	GGA	TCA	AAT	GTA
Ile	Val															
ATT	GTT															
	Thr	Phe	Phe	Cys	Gly	Asn	Asn	Thr	Arg	Gly	Val	Arg	Tyr	Thr	Leu	
	136	ACA	TTT	TTT	TGT	GGA	AAT	AAC	ACA	CGA	GGT	GTT	AGA	TAT	ACT	TTA
Ser	Phe															
AGT	TTT															
	Val	Gly	Glu	Lys	Asn	Ile	Ile	Cys	Glu	Lys	Asp	Gly	Lys	Trp	Asn	
	181	GTA	GGA	GAA	AAA	AAT	ATT	ATT	TGT	GAA	AAA	GAT	GGT	AAA	TGG	AAT
Leu	Pro															
TTA	CCA															
	Lys	Glu	Phe	Pro	Val	Cys	Lys	Ile	Ile	Arg	Cys	Arg	Phe	Pro	Ala	
	226	AAA	GAA	TTC	CCT	GTT	TGT	AAA	ATT	ATA	AGA	TGT	CGA	TTC	CCA	GCT
Asp	Gly															
GAT	GGG															
	Leu	Gln	Asn	Gly	Phe	Val	Asn	Gly	Ile	Pro	Asp	Ser	Lys	Lys	Phe	
	271	TTA	CAA	AAT	GGA	TTT	GTA	AAT	GGA	ATA	CCT	GAT	AGT	AAA	AAA	TTT
Asn	Gln															
AAT	CAA															
	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Glu	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Lys	Pro	Gly	Phe	Val	
	316	TAT	TAT	GAA	TCT	GAG	GTA	AGT	TTT	TCA	TGT	AAA	CCG	GGT	TTT	GTT
Tyr	Tyr															
TAT	TAC															
	Leu	Ile	Gly	Thr	Lys	Tyr	Ser	Val	Cys	Gly	Ile	Asn	Ser	Ser	Trp	
	361	TTA	ATA	GGA	ACA	AAA	TAT	TCA	GTT	TGT	GGT	ATA	AAT	TCG	TCA	TGG
His	***															
CAC	TAG															
	Ile	Pro	Lys	Val	Pro	Ile	Cys	Ser	Arg	Tyr	Asn	Ile	Thr	Tyr	Asn	
	406	ATA	CCT	AAA	GTA	CCC	ATT	TGT	TCA	AGA	TAC	AAT	ATT	ACA	TAT	AAT
	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asn	Lys	Val	Ser	Ile	Asp	Asp	Asn	Phe	Phe	Asn	
	451	AAA	ATT	TAT	ATC	AAT	AAA	GTA	AGT	ATA	GAT	GAT	AAC	TTT	TTT	AAC
	Gln	Ile	Asn	Asn	Ser	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Lys	Ile	Leu	Ala	
	496	CAA	ATA	AAT	AAC	AGT	AAT	ACT	TAT	TAC	TTT	GAT	AAA	ATA	TTA	GCG
	Ala	Ala	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	His	***				
	541	GCC	GCA	CTC	GAG	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	TGA			

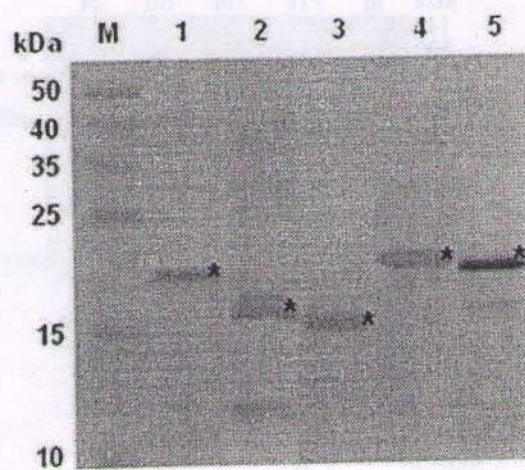
Фиг. 1 д



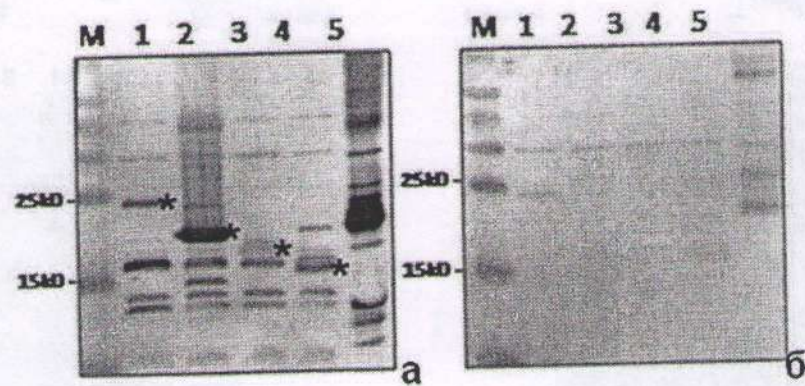
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4.



Фиг. 5.