

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ



ӨНЕРТАБЫСҚА
ПАТЕНТ

АСТАНА



(19) ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ

ӨНЕРТАБЫСҚА

(11) № 33028

(12) ПАТЕНТ

(54) АТАУЫ: Қой шешегі вирусының геномына интеграциялану мүмкіндігі бар pINT-TKsprrv және pINT-RRsprrv рекомбинантты плазмидті ДНК

(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); Строчков Виталий Михайлович (KZ); Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна (KZ); Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ)

(21) Өтінім № 2017/0255.1

(22) Өтінім берілген күн: 10.04.2017

23.07.2018 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 парақта келтіріледі

003911



(19)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

(12)

ПАТЕНТ

(11)

№ 33028

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(54) **НАЗВАНИЕ:** Рекомбинантные плазмидные ДНК pINT-TKspv и pINT-RRspv, обладающие способностью интегрироваться в геном вируса 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); Строчков Виталий Михайлович (KZ); Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна (KZ); Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ)

(21) Заявка № 2017/0255.1

(22) Дата подачи заявки: 10.04.2017

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан 23.07.2018.

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) 33028

(51) C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

A61K 39/285 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2017/0255.1

(22) 10.04.2017

(45) 20.08.2018, бюл. №31

(72) Червякова Ольга Викторовна; Строчков Виталий Михайлович; Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна; Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайұлы

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

(56) Тайлакова Э.Т., Червякова О.В. Бактериальная экспрессия генов вируса оспы овец, кодирующих антигенные белки srrv095 и srrv141, для разработки средств специфической профилактики нового поколения // Биотехнология. Теория и практика. №2, 2016, с. 81-87

Орлова Е.С., Щербаков А.В., Яковлева А.С., Басова Д.К., Диев В.И., Каньшина А.В. Рекомбинантные белки Р17, Р18 и Р32 вируса оспы овец как потенциальные антигены для иммуноферментного анализа // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. 2006. Т. 4. с. 30-35.

Орлова Е.С. Совершенствование методов диагностики оспы овец и оспы коз // Владимир, 2007, 25 С.

UA 82479 C2, 25.04.2008

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПЛАЗМИДНЫЕ ДНК PINT-TKSPPV И PINT-RRSPPV, ОБЛАДАЮЩИЕ СПОСОБНОСТЬЮ ИНТЕГРИРОВАТЬСЯ В ГЕНОМ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

(57) Изобретение относится к области биотехнологии. Путем амплификации фрагментов генома вируса оспы овец штамма НИСХИ получают последовательности ДНК, несущественные для репликации вируса и содержащие ген ТК или RR. Используя полученные последовательности и ряд других вспомогательных плазмид с помощью генно-инженерных манипуляций получают рекомбинантные плазмиды pINT-TKSppv и pINT-RRsppv, способные интегрироваться в геном вируса оспы овец. Полученное техническое решение может найти применение при получении поливалентных векторных вакцин на основе вируса оспы овец и их использовании в ветеринарии.

(19) KZ (13) B (11) 33028

Изобретение относится к области биотехнологии и касается получения генетических конструкций ДНК pINT-TKspv и pINT-RRspv, обладающих способностью интегрироваться в геном вируса оспы овец, и содержащих последовательности геномной ДНК вируса оспы овец несущественные для репликации вируса: ген тимидинкиназы (ТК) или ген малой субъединицы рибонуклеотидредуктазы (RR), соответственно.

Вирус оспы овец относится к роду *Capripoxvirus*, подсемейству *Chordopoxvirinae* семейства *Poxviridae*. Так же к данному роду относятся вирус оспы коз и вирус нодулярного дерматита. Все каприпоксвирусы имеют высокую степень гомологии последовательностей [Tillman ER. Afonso CL. Lu Z et al. Genome of lumpy skin disease virus. - *J Virol.* - 2001. - Vol. 75. - P. 7122-7130; Tulman ER. Afonso CL. Lu Z. et al. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. - *J Virol.* - 2002. - Vol. 76. - P. 6054-6061]. Вирус оспы овец и коз поражает соответственно овец и коз, однако некоторые штаммы могут поражать как овец, так и коз. Вирус нодулярного дерматита поражает только крупный рогатый скот.

При инфицировании соответствующих хозяев, эти вирусы вызывают клинические признаки заболевания, такие как интоксикация организма, лихорадка, папулезно-пустулезные поражения кожи и слизистых оболочек. Показатели смертности варьируют, и могут достигать более 90% в очагах оспы овец и коз, в то время как смертность от нодулярного дерматита ниже, но может составить 50%. Данные инфекции наносят значительный ущерб животноводству, слагающийся из гибели и вынужденного убоя больных животных, снижения продуктивности, затрат на проведение ветеринарно-санитарных и охранно-карантинных мероприятий. Для профилактики каприпоксвирусных инфекций разработаны эффективные вакцины на основе аттенуированных штаммов [Курченко Ф.П., Ивашенков В.Н., Уфимцев К.П., Алехин А.Ф. Эффективность культуральной вирус вакцины из штамма НИСХИ против оспы овец // *Ветеринария.* - 1991. - Т. 10. - с. 21-23; Babiuk S. Bowden TR. Boyle DB et al. Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. // *Transbound Emerg Dis.* - 2008. - Vol. 55. - P.263-272; Kitching RP. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. // *Dev Biol (Basel).* - 2003. - Vol. - 114. - P.161-167]. Несмотря на высокую эффективность данных вакцин, до сих пор не ясен механизм аттенуации вирусов, и существует риск реверсии вирулентности. Альтернативным решением при разработке вакцин могут стать рекомбинантные поксвирусы с целенаправленно инактивированными генами, кодирующими факторы вирулентности. На сегодняшний день секвенированы и аннотированы полные геномы нескольких штаммов вирусов оспы овец и коз и нодулярного дерматита [Tulman ER. Afonso CL. Lu Z et al. Genome of lumpy skin disease virus. // *J Virol.* - 2001. - Vol. 75. - P. 7122-7130; Tulman ER. Afonso CL. Lu Z et al. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. // *J Virol.* - 2002. - Vol. 76. - P. 6054-6061]. показаны предполагаемые факторы вирулентности.

Возможность делеции вирусных генов является ценным инструментом в выяснении роли отдельных генов поксвирусных геномов [Johnston JB. McFadden G. Technical knockout: understanding poxvirus pathogenesis by selectively deleting viral immunomodulatory genes. // *Cell Microbiol.* - 2004. - Vol. 6. - P. 695-705]. Принцип метода для генерации нокаут гена с использованием гомологичной рекомбинации является одинаковой для всех вирусов оспы. В инфицированные вирусом клетки вводят гибридную плазмиду, содержащую гетерологичную последовательность, фланкированную последовательностями ДНК вируса из несущественной области вирусного генома. За счет рекомбинации по областям гомологии происходит встройка чужеродной последовательности в геном вируса. Рекомбинантные вирусы выявляют с использованием различных методов. Основные различия в методах при работе с поксвирусами являются клетки, используемые для выращивания вирусов и последовательности DEIK-мишеней. используемые для гомологичной рекомбинации.

В последние десятилетия рекомбинации геномов поксвирусов проводят не только для делеций отдельных генов, но и в качестве эффективных вакцинных векторов. Широкое использование поксвирусов в качестве вакцинных векторов обеспечивается за счет их способности активировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет [Zavala F., Rodrigues M., Rodriguez D., Rodriguez J., Nussenzweig R. & Esteban, M. A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8+ T cells. // *Virology.* - 2001. - Vol. 280. - P. 155-159; Willey R., Byrum R., Piatak M. & 8 other authors. Control of viremia and prevention of SHIV-induced disease in rhesus macaques immunized with recombinant VV plus inactivated SIV and HIV-1 particles. // *J Virol.* - 2003. - Vol. 77, - P. 1163-1174], возможности встроить в геном дополнительно до 25 тысяч пар оснований ДНК [Smith G. & Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. // *Gene.* - 1983. - Vol. 25. - P. 21-28.; Merchlinsky M. & Moss B. Introduction of foreign DNA into the VV genome by in vitro ligation: recombinant-independent selectable cloning vectors. // *Virology.* - 1992. - Vol. 190. - P. 522-526]. одновременной экспрессии нескольких чужеродных генов [Perkus M., Piccini A. Lipinskas B. & Paoletti E. Recombinant vaccinia virus: immunization against multiple pathogens. // *Science.* - 1985. - Vol. 229. - P. 981-984.; Welter. J., Taylor. J., Tartaglia. J., Paoletti E. & Stephenson. C. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. // *J Virol.* - 2000. - Vol. 74. - P. 6358-6367]. Наиболее распространенный вакцинный вектор на основе вируса коровьей оспы не является абсолютно безопасным, и в настоящее время изучается возможность использования в качестве векторов поксвирусов с ограниченным кругом хозяев.

Известно несколько участков генома каприпоксвирусов, которые могут быть

нов является ли отдельных JB. McFadden ing poxvirus leting viral biol. - 2004. - для генерации омологичной всех вирусов летки вводят ерологичную нкированную ируса из нома. За счет и происходит сти в геном выявляют с . Основные юксвирусами выращивания ИК-мишеней. бинации. иции геномов для делеций эффективных спользование их векторов активировать иммунитет Rodriguez, J., rs of in vivo logy. - 2001. - R., Piatak. M. prevention of s immunized V and HIV-1 . 1163-1174], тельно до 25 & Moss. B. for at least 25 83. - Vol. 25. introduction of vitro ligation: ng vectors. // P. 522-526]. чужеродных B. & Paoletti, ation against Vol. 229. - P. .1., Paoletti, ainst canine ets with and recombinant 2000. - Vol. остранный ровей оспы в настоящее зования в раниченным з генома ут быть

использованы для интеграции чужеродных генов: ген полиинкиназы [M Mackett. G L Smith. B Moss. Vaccine virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. // Proc Natl Acad Sci USA. - 1982. - Vol. 79(25). - P. 7415-7419.]. ген малой субъединицы рибонуклеотидредуктазы [Aspden K., van Dijk A.A., Bingham J., Cox D., Passmore J.-A., Williamson A.-L. Immunogenicity of a recombinant lumpy skin disease virus (neethling vaccine strain) expressing the rabies virus glycoprotein in cattle // Vaccine. - 2002. - Vol. 20. - P. 2693-2701]. область межгенного пространства [Cohen A., Cox D., van Dijk. A.A., Korber. A., Dumbell. K.R., Williamson. A., 1997. Lumpy skin disease virus as a recombinant vaccine vector for Rift Valley fever virus and bovine ephemeral fever virus. In: Proceedings of the 4th Congress of the European Society for Veterinary Virology. Edinburgh. Scotland. 24-27 August, pp. 230-231.]. Для отбора рекомбинантных вирусов используют репортерные гены или ПЦР-скрининг. В качестве репортерных генов служат ген *B-галактозидазы* *E.coli* или зеленый флуоресцирующий белок. При этом плазида интеграции включает два промоторных элемента внутри фланкирующих последовательностей. Причем под контролем одного из промоторов находится репортерный ген, что позволяет легко и быстро идентифицировать полученные вирусные рекомбинанты, а под контролем второго промотора находится исследуемый чужеродный ген. ПЦР-скрининг проводят с использованием праймеров на участки геномных вирусных последовательностей, фланкирующих гетерологичный фрагмент. Использование данного подхода для отбора рекомбинантных вирусов делает необязательным включение в конструкцию плазмиды интеграции репортерных генов.

Рекомбинантные каприпоксвирусы были получены в середине 90-х годов на основе вируса нодулярного дерматита, штамм KS-1, экспрессирующего F [Romero. C.H., Barrett. T., Kitching. R.P., Carn. V.M., Black. D.N. Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease with a recombinant capripoxvirus expressing the fusion protein gene of rinderpest virus. 11 Vet. Rec. - 1994. - Vol. 135. - P. 152-154] и H гены вируса чумы крупного рогатого скота в разных конструкциях [Romero. C.H., Barrett. T., Chamberlain. R.W., Kitching. R.P., Fleming, M., Black, D.N. Recombinant capripoxvirus expressing the haemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. // Virology. - 1994. - Vol. 204. - P. 425-429]. Эти кандидатные вакцины защищали крупный рогатый скот от инфицирования вирулентным вирусом чумы крупного рогатого скота, а также нодулярного дерматита. Также был получен ряд экспериментальных вакцин на основе рекомбинантных вирусов нодулярного дерматита, штамм KS-1 или Onderstepoort, защищающих животных от инфицирования вирусом катаральной лихорадки овец [Perrin A. Albina E, Breard E et al. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of haemagglutinin virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. // Vaccine. - 2007. - Vol.

25. - P. 6774-6783]. чумы мелких жвачных животных [Romero. C.H., Barrett. T., Kitching. R.P., Bostock, C., Black. D.N. Protection of goats against peste des petits ruminants with recombinant capripoxviruses expressing the fusion and haemagglutinin protein genes of rinderpest virus. // Vaccine. - 1995. - Vol. 13. - P. 36-40]. лихорадки долины Рифт [Soi RK. Rurangirwa FR. McGuire TC et al. Protection of sheep against Rift Valley fever virus and sheep poxvirus with a recombinant capripoxvirus vaccine. // Clin Vaccine Immunol. - 2010. - Vol. 17. - P. 1842-1849].

В качестве вектора вирус нодулярного дерматита был также использован для экспрессии полипротеина вируса иммунодефицита человека [Shen. Y.J., Shephard. E., Douglass. N., Johnston. N., Adams. C., Williamson C., Williamson. A.L., 2011. A novel candidate HIV vaccine vector based on the replication deficient Capripoxvirus. Lumpy skin disease virus (LSDV). Virol. J. 8, 265.], гликопротеина вируса бешенства [Aspden K., van Dijk A.A., Bingham J., Cox D., Passmore J.-A., Williamson A.L. Immunogenicity of a recombinant lumpy skin disease virus (neethling vaccine strain) expressing the rabies virus glycoprotein in cattle // Vaccine. - 2002. - Vol. 20. - P. 2693-2701]. Таким образом, использование рекомбинантных каприпоксвирусов может найти применение в ветеринарии и медицине.

В Казахстане до настоящего времени не проводились какие-либо исследования, связанные с получением и изучением рекомбинантных каприпоксвирусов отечественных штаммов.

Техническим результатом заявляемого изобретения является конструирование рекомбинантных плазмидных ДНК на основе вируса оспы овец штамма НИСХИ, используемого в Казахстане для специфической профилактики оспы овец, способных интегрироваться в геном вируса оспы овец с целью создания поливалентных вакцин для животноводства.

Указанный технический результат достигается конструированием плазмид pINT-TKspv и pINT-RRspv путем встраивания в плазмидный вектор pUC19 последовательностей ДНК кодирующих ген ТК (или RR) и фланкирующие его области. Трансфекция полученными плазмидами культуры клеток тестикулы овцы, инфицированной вирусом оспы овец штамма НИСХИ, обеспечивает интеграцию в вирусный геном целевых последовательностей за счет гомологичной рекомбинации.

Сущность изобретения состоит в следующем. Генно-инженерными методами получают плазмиды pINT-TKspv и pINT-RRspv, содержащие целевые последовательности ДНК в виде двух фрагментов примерно одинакового размера для каждого гена: SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 4. представленные на фиг. 1. а-г. Последовательности ДНК, кодирующие соответствующие фрагменты генома вируса оспы овец, получают методом ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК вируса оспы овец, штамм НИСХИ.

Культуру клеток тестикулы овец, инфицированную вирусом оспы овец штамма НИСХИ, трансфицируют сконструированными плазмидами pINT-TKspv или pINT-RRspv и инкубируют в присутствии селектирующих агентов. Рекомбинантные вирусы выделяют из вирусной популяции методом люминесцентной микроскопии.

Исходным генетическим материалом для конструирования рекомбинантных плазмид pINT-TKspv или pINT-RRspv являются:

а) плазмидный вектор pUC19 (Invitrogen, США), обеспечивающий вставку целевых фрагментов ДНК, кодирующих ген ТК (или RR) и фланкирующие его области:

б) целевые фрагменты ДНК, кодирующие ген ТК (или RR) и фланкирующие его области, которые получают в полимеразной цепной реакции с использованием в качестве матрицы ДНК вируса оспы овец, штамм НИСХИ, и олигонуклеотидных праймеров: TK-LF 5'-acggatcctatggatcacagcaagtat-3', TK-LR 5'-cgatctagactgcaggcatgctgcccttcattctataacataa-3', TK-RF 5'-cctctagactgcagctcgagctcttaagatattgta-3', TK-RR 5'-gcaagctttcattcatagtcctctatattcatt-3', RR-LF 5'-acggatcctatttaaacggtaaatattcgt-3', RR-LR; 5'-cgatctagactgcaggcatgctgccagtgagggaatattctttc-3', RR-RF 5'-cctctagactgcagctcgagcagcaaacgctattaatcgt-3', RR-RR 5'-gcaagcttacgctcttagcataggaactg-3'. обеспечивающих наличие в продуктах амплификации сайтов рестрикции BamHI, XbaI, PstI, SphI, HindIII, XhoI;

в) вспомогательные плазмидные ДНК pPSMCS. pP7.5Kgpt. pEGFP.

Полученные в результате рекомбинантные плазмидные ДНК pINT-TKspv (фиг.2) и pINT-RRspv (фиг.3). обладающие способностью интегрироваться в геном вируса оспы овец характеризуются следующими признаками: - имеют размер 5894 и 5761 п.о..

соответственно, и содержат:

- HindI I-EcoRI фрагмент плазмиды pUC-19 размером 2635 п.о.;
- участок начала репликации;
- ген устойчивости к ампициллину;
- амплифицированный фрагмент, обработанный эндонуклеазами рестрикции BamHI и PstI, кодирующий N-концевую часть тимидинкиназы вируса оспы овец размером 723 п.о. или N-концевую часть рибонуклеотидредуктазы вируса оспы овец размером 762 п.о.;
- амплифицированный фрагмент, обработанный эндонуклеазами рестрикции PstI и HindIII. кодирующий C-концевую часть тимидинкиназы вируса оспы овец размером 940 п.о. или C-концевую часть рибонуклеотидредуктазы вируса оспы овец размером 780 п.о.;
- PstI-SphI фрагмент плазмиды pPSMC'S размером 110 п.о., содержащий
- синтетический промотор вируса осповакцины и уникальные сайты для эндонуклеаз рестрикции NcoI, NotI. BglII;
- NcoI-NotI фрагмент плазмиды pEGFP размером 720 п.о.. кодирующий ген зеленого флуоресцирующего белка, обладающий

способностью экспрессировать зеленый флуоресцирующий белок в составе генома вируса оспы овец;

- EcoRI-EcoRI фрагмент плазмиды pP7.5Kgpt, включающий поксвирусный промотор pP7.5K и ген ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы Escherichia coli.

Изобретение иллюстрируется графическими материалами, представленными на фигурах с 1 по 4.

Фиг.1а. Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды кодирующего N-концевую часть тимидинкиназы вируса оспы овец.

Фиг.6. Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pINT-TKspv кодирующего C-концевую часть тимидинкиназы вируса оспы овец

Фиг.1в. Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pINT-RRspv кодирующего N-концевую часть рибонуклеотидредуктазы вируса оспы овец.

Фиг.1г. Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pINT-RRspv кодирующего C-концевую часть рибонуклеотидредуктазы вируса оспы овец.

Фиг.2. Физическая карта рекомбинантного вектора pINT-TKspv.

Фиг.3. Физическая карта рекомбинантного вектора pINT-RRspv.

Фиг.4. Схема сборки плазмидного вектора pINT-TKspv.

Сущность предлагаемого изобретения поясняется примерами его исполнения и использования.

Пример 1. Получение последовательностей ДНК несущественных для репликации вируса и содержащей ТК или RR гены вируса оспы овец штамма НИС'ХИ.

В качестве матрицы для амплификации целевых последовательностей ДНК, кодирующих гены ТК и RR используют геномную ДНК вируса оспы овец, штамм НИСХИ. Праймеры для проведения ПЦР конструируют с использованием программы Vector NTI 10.0.1 с использованием последовательности полного генома вируса оспы овец штамма НИСХИ GenBank ID: AY077834. Последовательности праймеров приведены ниже:

TK-LF 5'-acggatcctatggatcacagcaagtat-3'.

TK-LR 5'-

cgatctagactgcaggcatgctgcccttcattctataacataa-3'.

TK-RF 5'-cctctagactgcagctcgagctcttaagatattgta-3'

TK-RR 5'-gcaagctttcattcatagtcctctatattcatt-3'.

RR-LF 5'-acggatcctatttaaacggtaaatattcgt-3',

RR-LR: 5'-

cgatctagactgcaggcatgctgccagtgagggaatattctttc-3'.

RR-RF 5'-

cctctagactgcagctcgagcagcaaacgctattaatcgt-3'

RR-RR 5'-gcaagcttacgctcttagcataggaactg-3'

Амплификацию генов проводят на термощелке GeneAmp PCR 9700. Applied Biosystems. Состав ПЦР смеси (50 мкл): 5мкл ЮхПЦР буфера (Qiagen). 1 мкл ЮтМ dNTPs (Qiagen). 2 мкл ДНК. 2 мкл каждого праймера (20 пМоль/мкл). 0.25 мкл Taq-полимеразы (2,5 units. Qiagen). 37.75 мкл Н²О. Условия проведения реакции: 94°C - 5 мин; затем 30 циклов

зеленый
нома вируса

и pP7.5Kgpt,
pP7.5K и ген
азы

рафическими

овательность
N-концевую

овательность
ирующего С-
оспы овец
овательность
ирующего N-
газы вируса

овательность
ирующего С-
газы вируса

мбинантного

мбинантного

ектора pINT-

я поясняется
ния.

ностей ДНК
вируса и
оспы овец

ии целевых
к гены ТК и
оспы овец,
едения ПЦР
ммы Vector
вательности
ма НИСХИ
вательности

3'.

5'.

-3'.

atattgta-3'

tcatt-3'.

cgt-3'.

5'.

-3'.

5'.

3'.

моциклере

Состав ПЦР

agen). 1 мкл

кл каждого

полимеразы

Условия

30 циклов

48°C - 30 с. 55°C (для гена SPPV122 - 45°C) - 30 с.
72°C - 60 с. и 1 цикл 72°C - 10 мин. Очистку
продуктов амплификации проводят методом
электрофореза в 1% агарозном геле.

Пример. 2. Получение плазмидных векторов
интеграции pINT-TKspv и pINT-RRspv

Продукты амплификации целевых
последовательностей вируса оспы овец
обрабатывают ферментами рестрикции: BamHI и PstI
для TK-L и RR-L; HindIII и PstI для TK-R и RR-R.
Также проводят обработку рестриктазами BamHI и
HindIII плазмидной ДНК вектора pUC19. После чего
линеаризованный 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. Получают промежуточные
плазмидные векторы pTK и pRR.

Далее проводят ряд последовательных
клонирований, встраивая в промежуточные векторы
фрагменты вспомогательных плазмид:

- PstI-SphI фрагмент плазмиды pPSMCS размером
110 п.о., содержащий синтетический промотор
вируса осповакцины и уникальные сайты для
эндонуклеаз рестрикции NcoI, NotI, BglII:

- NcoI-NotI фрагмент плазмиды pEGFP размером
720 п.о., кодирующий ген зеленого
флуоресцирующего белка, обладающий
способностью экспрессировать зеленый
флуоресцирующий белок в составе генома вируса
оспы овец.

- EcoRI-EcoRI фрагмент плазмиды pP7.5K.gpt.
включающий поксвирусный промотор pP7.5K и ген
ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы
Escherichia coli.

Схема сборки плазмид интеграции приведена на
фиг. 4 на примере pINT-TKspv. Физические карты
плазмид pINT-TKspv и pINT-RRspv приведены на
фиг. 2 и фиг. 3. соответственно.

Пример 3. Получение рекомбинантных вирусов
оспы овец, содержащих ген зеленого
флуоресцирующего белка.

Плазмидной ДНК pINT-TKspv или pINT-RRspv
трансфецируют культуру клеток тестикулы овцы,

зараженную вирусом оспы овец штамма НИСХИ.
Полученные рекомбинантные вирусные клоны
обладают способностью флуоресцировать в зеленом
диапазоне за счет экспрессии зеленого
флуоресцирующего белка. Наличие рекомбинантных
клонов доказывает правильность сборки плазмид
интеграции, а также возможность использования
полученных плазмид для конструирования
рекомбинантов, содержащих целевые чужеродные
гены.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рекомбинантные плазмидные ДНК pINT-TKspv
и pINT-RRspv, обладающие способностью
интегрироваться в геном вируса оспы овец и
характеризующиеся следующими признаками:
имеют размер 5894 и 5761 п.о., соответственно, и
содержат: HindIII-EcoRI фрагмент плазмиды pUC-19
размером 2635 п.о.; участок начала репликации;
ген устойчивости к ампициллину; амплифицированный
фрагмент, обработанный эндонуклеазами
рестрикции BamHI и PstI, кодирующий N-концевую
часть тимидинкиназы вируса оспы овец размером
723 п.о. или N-концевую часть
рибонуклеотидредуктазы вируса оспы овец размером
762 п.о.; амплифицированный фрагмент,
обработанный эндонуклеазами рестрикции PstI и
HindIII, кодирующий С-концевую часть
тимидинкиназы вируса оспы овец размером 940 п.о.,
или С-концевую часть рибонуклеотидредуктазы
вируса оспы овец размером 780 п.о.; PstI-SphI
фрагмент плазмиды pPSMCS размером 110 п.о.,
содержащий синтетический промотор вируса
осповакцины и уникальные сайты для эндонуклеаз
рестрикции NcoI, NotI, BglII; NcoI-NotI фрагмент
плазмиды pEGFP размером 720 п.о., кодирующий ген
зеленого флуоресцирующего белка, обладающий
способностью экспрессировать зеленый
флуоресцирующий белок в составе генома вируса
оспы овец; EcoRI-EcoRI фрагмент плазмиды
pP7.5Kgpt, включающий поксвирусный промотор
pP7.5K и ген ксантин-гуанин-
фосфорибозилтрансферазы Escherichia coli.

<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 pINT-TKspv и pINT-RRspv, обладающие
способностью интегрироваться в геном вируса оспы овец

<160> 4

<210> 1

<211> 723

<212> DNA

<213> sheep pox virus

<400> 1

```

1      TATGG ATCAC AGCAA GTATC TATTA ACGAT ATTCT TAGAA AACGA
46     TGACT CCTTT TTAA  ATACT TATCA GAACA AGATG ATGAA ACAGC
91     TATGT CTGAT ATCGA AACCA TTGTA ACATA TTAA  ATTTT TTATT
136    GTCAT TGTTA ATTAG ATCAA AGGAT AAATT AGAGT CGATA GGTTA
181    TTATT ATGAA CCACT GTCTG AAGAA TGTA  AACAT TAGTT GATTT
226    TTCCA ATATG AAAAA TTTTA GGATA TTATT TAATA AGATT CCTAT
271    AAATG TACTA AATAA ACAA  TAACT GTAAA TAAAG GGTAC TTATC
316    AGATT TTGTT ACGAC ATTGA TGAGA TAAA  AAAAG AACTT TTTTT
361    AGAAT CACCA GAGCC GATAA CATAT ATAGA CCTTA GAAAA GATCC
406    AACAT TTTTA AACAT TTTAT CAATA TTGCA CGAAA AATAA TTGAA
451    CAAAT ATAAA AAAAA AAAAA TGGAC TATGG ATATA TACAT TTAAT
496    TATAG GACCT ATGTT TTCTG GCAAA AGTAC TGAAT TGATA AGAAT
541    AGTTA AAAGG TACCA AATAG CGCAG TATAA ATGCT GTGTA GTAAA
586    ATACT TAAAA GATAT ACGAT ATGGT AATTC TGTGT ATACA CATGA
631    TAATA ACCAT ATATC TGCAA TATCA ACAAC TTTAT TATAT GACGT
676    AGTTG ATAAA ATTAT GAATT TCGAC ATTAT AGGTA TAGAT GAAGG
721    GCA

```

Фиг. 1 а

<210> 2

<211> 940

<212> DNA

<213> sheep pox virus

<400> 2

1 TCTTT AAAGA TATTG TATCT TTTTC TGAAA ATATG GCAAA TATGG
 46 GAAAA ATAAT TATAA TATCT GCACT AGATA GCACA TTTCA ACGAA
 91 AAGAA TTAA TGATA TATTG AAATT GATAC CGTTA TCTGA AAAAG
 136 TAACA AAATT AAACG CTGTA TGTAT GGAAT GTTAT AAAGA CGCTG
 181 CGTTT TCTAA AAGGA TCACT AAAGA AAAGG AAATA GAACT CATCG
 226 GGAGT AAGGA AAAAT ATAAA TCTGT TTGTA GGAAA TGTTA TTTTT
 271 TAGAA TAATA AATAT TAATG AAAAA AAAGC AAAAA AAAAG TGATC
 316 CATTT ACTTA TTAAA CTATA TAGCT AATAA GTAAA ATGGG TATCA
 361 GACAC GAGTT AGATA TTTTG CTTGT TTCTG AAAAT CTTGC ACTAA
 406 AAAAT GTTGA ACTTC TTAAA GGTGA TAGTT ATGGA TGTAC TATTA
 451 ATATA AAAGT TAATC AACAA AAAAA ATTGG ATTTT ATTAT TATAT
 496 TACGT CCAGA TTGGA CAGAA GTAAG GAATG TTAAA AAAAT AAATA
 541 TGGTA TGTA CGGTG TTGTT ATTGA TACAA CACTA ATCAA AAAAT
 586 CTTTT TACGA AGAAG TATAT TCATC ATCTG TAACA GTTTT TAAAA
 631 ATACT ACCGT TGAAT TTTTT AGTGA TACTA GTAAG AAATA TAAAG
 676 AAGAA TATCC CATTG TTAAC ATAAA CACCA TAAAG CGTTA TTACG
 721 AAATA AAAGA TTCAA GAATG TCATG TATAA ATTTT GAATC ACCTA
 766 TAAGT GATTA TGATC AAGTA AATTA TTAA AAGAT TACAT AAATA
 811 TAAGT AATGA TTATT ATCTG TATGA TGCAT GTGAT TATTG TATCA
 856 TTAGT AGCGA CGACG ATGAC GATAA TGATA ATACA GACAA TGACG
 901 AGGAG GACGA CGAAG TTAAT GATAT AGAGG ATGAC TATGA

Фиг. 1 б

<210> 3

<211> 762

<212> DNA

<213> sheep pox virus

<400> 3

```

1      GGATC CTATT TAAAC GGTA AATTAA CTTCG TTA CT GTATT TTTTA
46     ATAGC TTTTT TAAAG TAATT AGATG AAATC TCAAA AATAT CTTTC
91     CTTGT TTGTA ATATA CCTCC AATTG TAAAT AATTAA AATTC TATCA
136    TAATC ATTTT TTAAT AACAT GTAAT TTAGT TCTTC TACAT ATTCT
181    TTATT GATAT ACCTT TTTAA AGTCA TATTG GTTAT TATTC AAGAT
226    AATTA ACAA AAGTT GTTAT TTATT CAACT TTATA ATATT CAATA
271    AAAAC TAAAA ATCAA CATCT AATGA AAAAA CATTA TCGTC TTTGT
316    TAGAA ATAAC GCCCA TTTTT TGATA TTCAC TAACT CTTTT TTCAA
361    AGAAG TTAGT TTTAC CTTCC AGTGA TATAT TTTCC ATAAA ATCAA
406    ATGGA TTTAT TGACA TAAAC ACTTT ATCAC AACCT AGTTC TAATA
451    GTAAT CTATC AGCAA TAAAC TCAAT ATATT GAGAC ATTA AATCAC
496    AATTC ATACC TATTA GTTTT ACAGG AATTA TATTG GTTAA AAATT
541    CTTTT TCTAT AGACA CAGCC TCTTT TATAA TAATT GTAAT AATCT
586    CATTA GAAGG AGGAT ATTTT AGATG TTTAA AAATT AAACA CGCAA
631    AATCA CAATG AAGGC CCTCA TCTCT ACTAA TAAGT TCGTT TGAAA
676    ATGTT AATCC TGGCA TCAAT CCTCG TTTTT TTAAC CAAAA TATTG
721    CAGCA AATGA CCCGG AAAAG AATAT TCCCT CAACT GGCAT GC

```

Фиг. 1 в

<210> 4

<211> 780

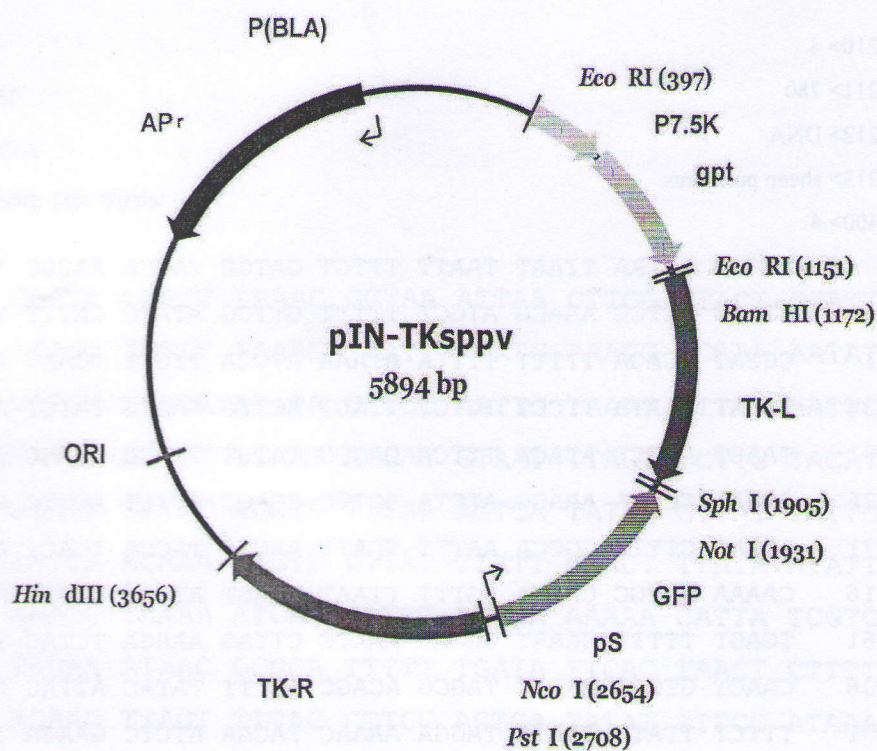
<212> DNA

<213> sheep pox virus

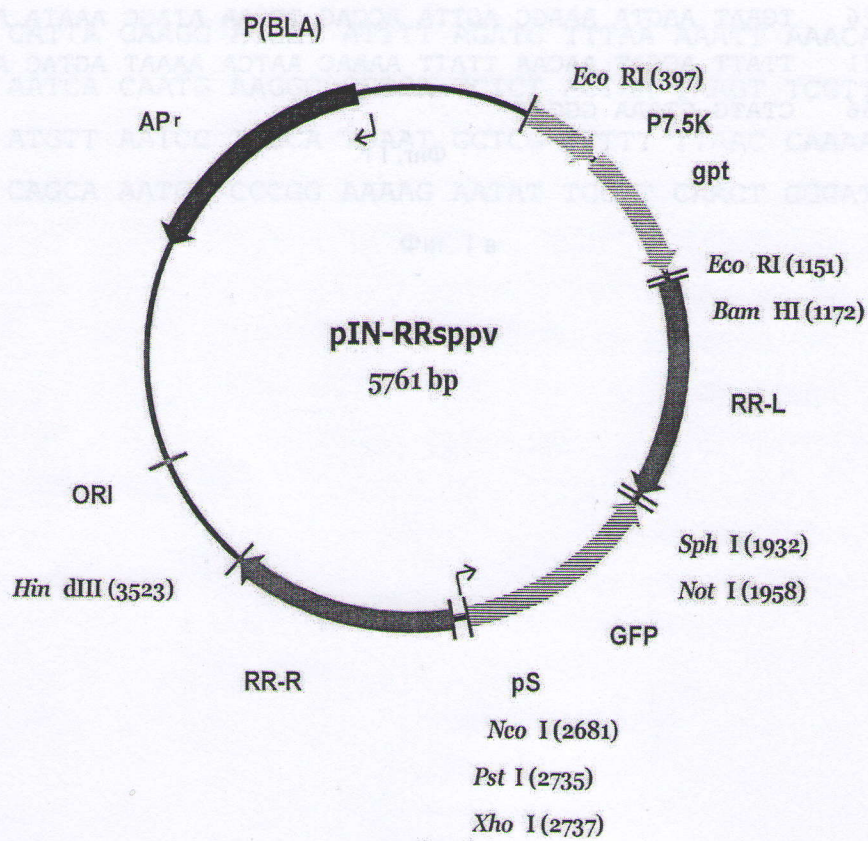
<400> 4

1 CCCGG GTTAA TTAAT TAATT TTTGT GATCC CAGCA AACGC TATTA
 46 ATCGT TCTCC AAACG ATGCT TTTTT GTTCG ATATC CATT TCTAG
 91 CCCAT TCAGA TTTTT TTTTA ATAAA ATCCA TTGTT TCAAT AGCAT
 136 TAAAT AAATA TTCCT TCTCT TTAGT ACTTG AAATG TATGT ATCAA
 181 TAAGT AAGCT ATACA TTTCA GAGTG TATGT TTTCC ATAGC TATCT
 226 GAAAA CCATA AAAGC ATCTA GCTTC CGACC ATTGT ACTTC CGAGT
 271 AAAAT CTTTC GGCCA AATTT TCATT AACTA TACCA TCACT AGCTG
 316 CAAAA AATGC CAATA TGT TTAAAT AAAGT ATTGC TCTTC ATTGT
 361 TGAGT TTTTT CCAAT CGGAT AAATC CTTAG AAAGA TCTAC TTCAT
 406 CAACT GTCCA AAAAC TAGCG ACAGC TTTTT TATAC ATTAC CCATA
 451 TTTCT TTATA TAATA TAGGA AAAAC TACAA ATCTC GAAGA TGT TT
 496 CTTTA AGAAT TGGTT CCATT TTATT TTATA CAATA AAAAT AATAT
 541 TTCAT TATTT TATTT AGTCA ACATT GACGC CCACA CACGT ATACG
 586 TATCA TCTAT ATAAT AAACA TTTTC TAATT CGTCA AAGGA TATTT
 631 TTGTG GTTAT GTTCA TCATT TTTAC CTTTA CTTTA TTTAA GAATT
 676 TGAAT AAGTA AAAGC AGTTA ACCAG TTGAA ATAGC AAATA AAGAC
 721 TTATT ACGAT AACAA TTATT AAAAC AATCA AAAAT AGTAC AGTTC
 766 STATG CTAAA GCGGT

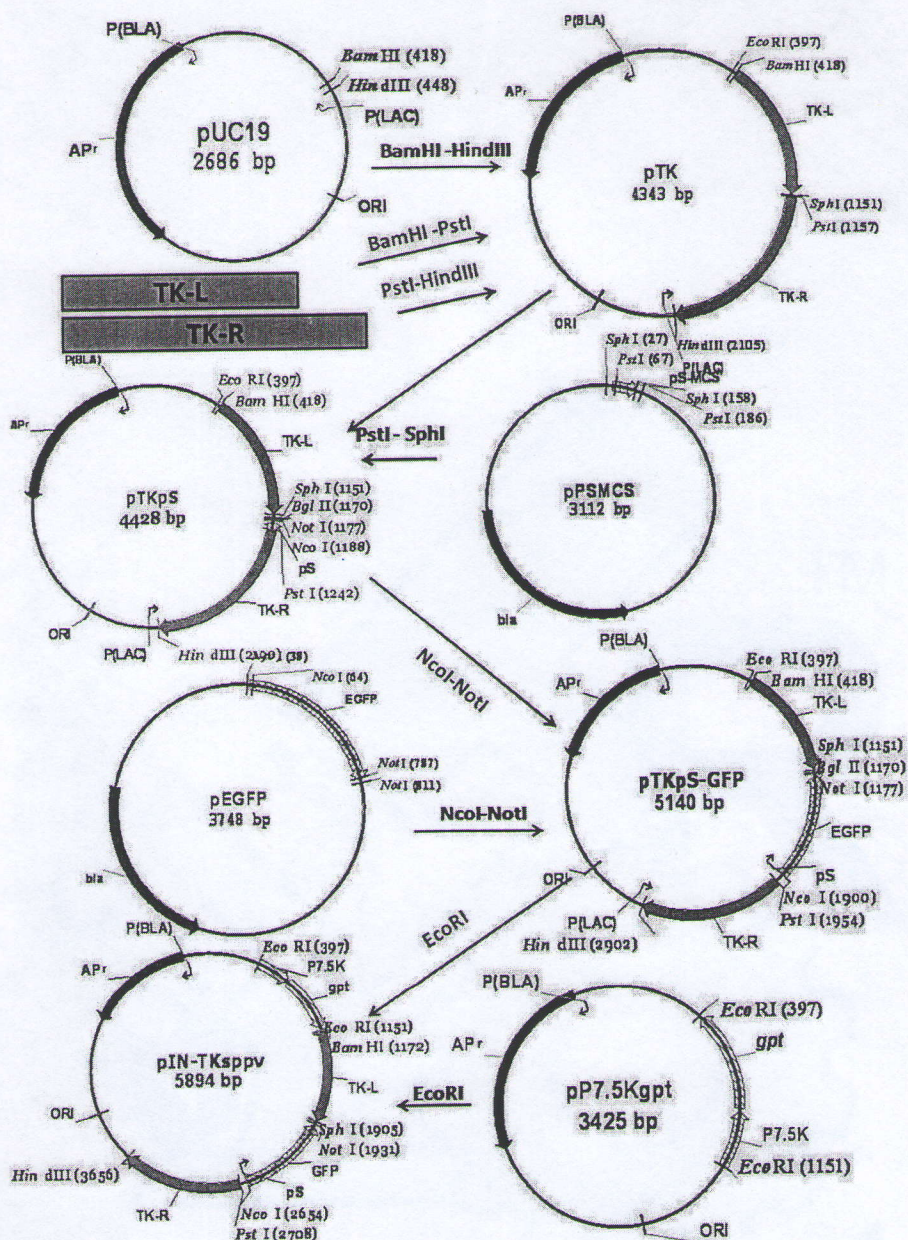
Фиг. 1 г



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4