

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

UDC 619:616.98:578.842.1:577.2

МОНОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ СЫВОРОТКА К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ p30 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ (АЧС)

MONOSPECIFIC RABBIT SERUM TO RECOMBINANT PROTEIN p30 IN INVESTIGATION OF AFRICAN SWINE FEVER (ASF)

Казакова Анна Сергеевна*
аспирант

Kazakova Anna Sergeevna
postgraduate student

Варенцова Алиса Алексеевна
аспирант

Varentsova Alisa Alexeevna
postgraduate student

Першин Андрей Сергеевич
аспирант

Pershin Andrey Sergeevich
postgraduate student

Белянин Сергей Александрович
аспирант

Belyanin Sergey Alexandrovich
postgraduate student

Южук Татьяна Эммануиловна
к.б.н.

Yuzhuk Tatyana Emmanuilovna
Cand.Biol.Sci.

Лыска Валентина Маркеловна
к.б.н.

Lyska Valentina Markelovna
Cand.Biol.Sci.

Живодеров Сергей Петрович
к.в.н.

Zhivoderov Sergey Petrovich
Cand.Vet.Sci.

Власова Наталья Никифоровна
д.б.н.

Vlasova Natalia Nikiforovna
Dr.Sci.Biol.

*Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной вирусологии и
микробиологии Российской академии
сельскохозяйственных наук, г.Покров, Россия*

*State Research Institution National Research Institute
for Veterinary Virology and Microbiology of Russian
Academy for Agricultural Sciences, Pokrov, Russia*

Статья посвящена анализу применения гипериммунной моноспецифической сыворотки крови кролика к рекомбинантному белку p30 вируса африканской чумы свиней (АЧС) для изучения вируса *in vivo* и *in vitro*

This article describes performance analysis of using hiperimmunity monospecific rabbit serum to recombinant protein p30 of African swine fever virus (ASFV) for investigation of the virus *in vivo* and *in vitro*

Ключевые слова: АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ, РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ, p30, ИФА, РНИФ, РЗГАд, ИММУНОБЛОТТИНГ

Keywords: AFRICAN SWINE FEVER, RECOMBINANT PROTEINS, p30, ELISA, IMMUNOFLUORESCENCE ANALYSIS, REACTION INHIBITION HAEMADSORPTION, WESTERN-BLOTTING

Введение

Африканская чума свиней (АЧС) известна почти на протяжении 100-летия как природно-очаговая вирусная инфекция диких африканских и домашних свиней местных и европейских пород. Болезнь

* E-mail: anna-kazakova85@mail.ru

распространяется переносчиками, алиментарным и контактным путем от больных животных и вирусоносителей. Кроме того, вирус АЧС может передаваться трансплацентарно, вызывая аборт у супоросных свиноматок [2]. АЧС характеризуется высокой летальностью и контагиозностью, сверхострым, подострым, острым и хроническим течением болезни. В 2000 г. возбудитель отнесен к семейству *Asfarviridae* [1].

Экономический ущерб, наносимый АЧС, складывается из прямых потерь при ликвидации больных и контактировавших с ними животных, ограничений в международной торговле и измеряется десятками миллионов долларов [3]. Вакцинация против АЧС, как предохранительный метод, не применяется, поэтому ранняя и высокоэффективная диагностика болезни является ключевым моментом для ограничения её распространения и иррадикации.

Геном вируса АЧС представлен одной линейной молекулой двухцепочечной ДНК, размеры которой варьируют от 170 до 190 тыс. п.о. [16, 17], кодирующей до 200 белков, из которых 34 идентифицированы в структуре очищенных вирионов и около 100 - в инфицированных клетках.

Вирусный белок р30 входит в состав внутренней мембраны вирусной частицы и представляет собой фосфопротеин [9, 12]. Он выявляется на поверхности 91% клеток на 6-ой час после заражения, т.е. до выхода зрелых вирусных частиц или клеточного лизиса. Возможно, это происходит с помощью пузырьков, содержащих структурные и неструктурные белки вируса АЧС в том числе и р30.

Установлено, что даже после выхода вирусных частиц большая часть р30 остается в клетках. В работах Afonso C.L., Alcaraz C., et al. [12] было показано, что связывание р30 со своим клеточным рецептором является вторым шагом репликационного цикла АЧС, относящегося к внедрению вирионов в чувствительные клетки. Антитела к р30 ингибируют интернализацию вируса в клетку [10].

Целью настоящих исследований являлось получение гипериммунных сывороток на кроликах с помощью рекомбинантного белка р30(размер полипептидной цепи эпитопа (с 90 по 190-ю) - 101 аминокислота, молекулярная масса 14.000 Da) для выявления антигена вируса АЧС методом иммунофлюоресценции и изучения вируса АЧС *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы

В работе использовали:

Вирусные штаммы: высоковирулентный штамм вируса АЧС Конго-73 (II серотип) (титр 7,5 lg ГАЕ₅₀/см³); авирулентный штамм вируса АЧС 691/88 (5,8 lg ГАЕ₅₀/см³), адаптированный к репродукции в перевиваемой культуре клеток CV-1, получены из коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Бактерии: клетки E.coli штамма BL21(DE3)pLysS (Promega) [5, 6]; клон рТТ9/ASFVp30 (клон 11) клеток E.coli штамма BL21(DE3)pLysS с рекомбинантной плазмидой рТТ9p30-9, полученной Копытовым В.О. в 2004 г [4].

Культуры клеток: культура клеток костного мозга свиней (ККМС); перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартышки CV-1;

Животные: кролики породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг

Компоненты для постановки реакций:

Антигены:

- специфический культуральный антиген вируса АЧС, полученный из лизата перевиваемой культуры клеток CV-1, инфицированной штаммом 691/88;

- лизат клеток E.coli клона рТТ9/ASFVp30 (клона 11);

- рекомбинантный хроматографически очищенный белок р30;

- лизат клеток E.coli штамма BL21(DE3)pLysS;
- лизат перевиваемой культуры клеток CV-1.

Культуральные тест-препараты:

- специфические культуральные тест-препараты вируса АЧС, полученные фиксацией 80% ацетоном выращенной на стеклянных пластинках культуры клеток CV-1, инфицированной авирулентным штаммом 691/88 вируса АЧС (2-3 сутки, множественность заражения не менее 0,1-0,01 ТЦД_{50/см}³/клетка), приготовленные согласно инструкции к «Набору препаратов для дифференциальной диагностики АЧС (африканской чумы свиней), КЧС (классической чумы свиней) и БА (болезни Ауески)», выпускаемому в лаборатории Диагностики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии;

- отрицательные культуральные тест-препараты, полученные фиксацией 80% ацетоном культуры клеток CV-1, выращенной на стеклянных пластинках;

Сыворотки:

- отрицательная сыворотка крови кролика, отобранная по стандартной методике перед началом иммунизации;

- специфическая сыворотка крови свиньи к вирусу АЧС из «Набора диагностикумов для твердофазного иммуноферментного анализа при африканской чуме свиней», выпускаемого в лаборатории Диагностики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии;

- специфическая антисыворотка свиньи к вирусу АЧС II типа с титром в РЗГАд 1:64.

Типоспецифические сыворотки свиней получены из коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Подготовка препаратов плазмиды для иммунизации

Плазмидную ДНК, необходимую для праймирования - первой стадии получения моноспецифической сыворотки, выделяли из клеток клона

pTT9/ASFVp30 методом фенольной экстракции. Степень очистки препарата и концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на приборе SP6-400 UV Spectrophotometer согласно стандартной методике определения концентрации двуспиральной ДНК при длине волны 260 нм [8].

Приготовление препарата рекомбинантного белка p30

Препарат рекомбинантного белка p30 вируса АЧС, используемый для иммунизации кроликов, хроматографически очищали на целлюлозном сорбенте - микрокристаллической целлюлозе марки Avicel® (Merck) методом ионообменной хроматографии из лизата бактериальной культуры клона pTT9/ASFVp30 согласно методике, описанной Т.Э. Южук и соавт. [14]. Содержание общего белка в очищенных препаратах определяли любым из стандартных методов: по методу Лоури, Брэдфорду и др.[7]. Погрешность метода составляет $\pm 0,05-0,1$ мг/мл. Выход рекомбинантного белка составляет приблизительно 2-4 мг белка, получаемого с 1 л бактериальной культуры. Концентрация белка в очищенных препаратах составляла 0,4-0,5 мг/мл.

Гипериммунизация кроликов

Гипериммунизацию кроликов проводили с целью получения моноспецифических сывороток крови к рекомбинантному p30 вируса АЧС. Использовали метод праймирования плазмидой, несущей целевой ген, и иммунизацию экспрессируемым рекомбинантным белком-антигеном p30 вируса АЧС.

В ходе первой стадии иммунизации – процедуры «праймирования» – животным вводили в область бедра внутримышечно в непосредственной близости от регионарных лимфатических узлов водный раствор плазмидной ДНК из расчёта 100 мкг/кг живого веса.

Через 10 сут. после процедуры «праймирования» животным инъецировали в ту же область препарат рекомбинантного белка p30 вируса АЧС из расчёта 100 мкг/кг живого веса 3-хкратно с интервалом в 10-14 сут.

Через 14 сут. после последней иммунизации обескровливали животных согласно «Методическим рекомендациям по обескровливанию лабораторных животных» и получали сыворотки крови.

Получение сыворотки

Флаконы с отобранной кровью инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 мин. После ретракции сгустка клеточных элементов крови от него избавлялись путём центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин. Сыворотку собирали, делили на аликвоты и хранили при минус 20°C.

Определение специфичности сывороточных иммуноглобулинов методом иммуноблоттинга

Для определения специфичности иммуноглобулинов сыворотки крови кролика, иммунизированного рекомбинантным белком р30 вируса АЧС, проводили иммуноблоттинг с использованием перечисленных выше антигенов в полусухой буферной системе (Kyhse-Andersen, 1984) [8, 20]. Иммунохимическое окрашивание полученных реплик осуществляли с помощью непрямого варианта ИФА, с соблюдением всех его стадий. В качестве проявляющего красителя применяли диаминобензидин тетрагидрохлорид или 4-хлор-1-нафтол.

Постановка непрямого варианта твздофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА)

Для определения титра специфических антител в моноспецифической сыворотке крови кролика проводили непрямым вариант ТФ ИФА [11, 13, 15, 20]. В качестве антивидового конъюгата использовали конъюгат протеина А с пероксидазой хрена.

Постановка реакции непрямои иммунофлюоресценции (РНИФ)

Выявление антигенов вируса АЧС в культуре инфицированных клеток проводили в РНИФ с использованием моноспецифической сыворотки крови кролика к рекомбинантному белку р30 вируса АЧС согласно стандартной методике, рекомендованной Международным эпизоотическим бюро (МЭБ). В качестве антивидового конъюгата использовали конъюгат протеина А с флюоресцентной меткой - Protein А – FITC (Sigma) в рабочем разведении.

Постановка реакции задержки гемадсорбции (РЗГАд)

Для изучения способности гипериммунной сыворотки крови кролика к рекомбинантному р30 задерживать гемадсорбцию вируса АЧС в культуре клеток ККМС проводили РЗГАд согласно стандартной методике [19, 21].

Результаты исследований

Результат очистки рекомбинантного белка р30 оценивали в 12% и 10% SDS-ПААГ электрофорезе по Laemmli U.K. (*Рисунок 1*) [7].

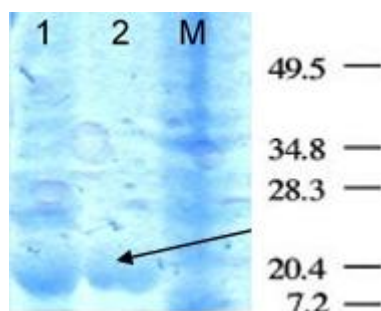


Рисунок 1. Электрофоретический анализ эффективности очистки рекомбинантного белка р30 вируса АЧС из лизата клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pLysS, трансформированных плазмидой рТТ9р30-9 в SDS-ПААГ: белки лизата клеток рекомбинантного клона (трек 1) и рекомбинантный белок р30 после хроматографической очистки на микрокристаллической целлюлозе (трек 2).

При определении специфичности иммуноглобулинов сыворотки крови кролика, иммунизированного рекомбинантным белком р30 вируса АЧС было установлено, что сывороточные IgG крови иммунизированного кролика реагируют со специфическим культуральным антигеном вируса АЧС из штамма 691/88 (окрашивание реплики на уровне 30 кДа), с лизатом клеток *E.coli* клона рТТ9/ASFVp30 (клона 11) и с рекомбинантным хроматографически очищенным белком р30 (окрашивание реплики на уровне 14 кДа) и не реагируют с нормальным культуральным антигеном, полученным из лизата перевиваемой культуры клеток CV-1. Результаты представлены на *Рисунке 2*.

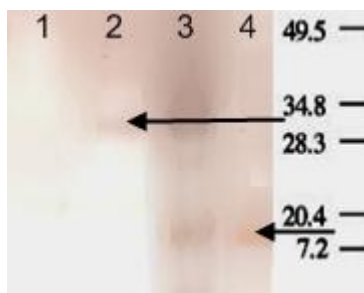


Рисунок 2. Результаты определения специфичности иммуноглобулинов сыворотки крови кролика, иммунизированного рекомбинантным белком р30 вируса АЧС в иммуноблоттинге: лизат перевиваемой культуры клеток CV-1 (трек 1), специфический культуральный антиген вируса АЧС из штамма 691/88 (трек 2), лизат клеток E.coli клона pTT9/ASFVp30 (клона 11) (трек 3) и рекомбинантный белок р30 после хроматографической очистки на микрокристаллической целлюлозе (трек 4).

С целью определения активности сыворотки крови кролика к рекомбинантному белку р30 вируса АЧС и её специфичности проводили реакцию непрямого ТФ ИФА [13, 15].

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАНТНОМУ Р30 ВИРУСА АЧС В МОНОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРОЛИКА В НЕПРЯМОМ ТФ ИФА

Сыворотки крови кролика	Nar* CV-1	Nar CV-1	Sar** CV-1	Sar CV-1	Nar E.coli лизат	Nar E.coli лизат	Sar p30 Rec.	Sar p30 Rec.	Контроли конъюгата
Нормальная - отрицательный контроль	0,050 -	0,052 -	0,059 -	0,050 -	0,049 -	0,051 -	0,059 -	0,061 -	Nar CV-1 0,054
Сыворотка к р30 1:50	0,052 -	0,057 -	0,232 +	0,226 +	0,111 -	0,119 -	1,475 +	1,413 +	Sar CV-1 0,052
Сыворотка к р30 1:100	0,053 -	0,055 -	0,212 +	0,200 +	0,100 -	0,097 -	1,322 +	1,384 +	Nar E.coli лизат 0,057
Сыворотка к р30 1:200	0,054 -	0,055 -	0,182 +	0,176 +	0,085 -	0,084 -	1,208 +	1,112 +	Sar p30 Rec. 0,057
Сыворотка к р30 1:400	0,053 -	0,055 -	0,147 +	0,144 +	0,074 -	0,076 -	0,914 +	0,882 +	
Сыворотка к р30 1:800	0,056 -	0,055 -	0,122 +	0,120 +	0,066 -	0,067 -	0,622 +	0,596 +	
Сыворотка к р30 1:1600	0,054 -	0,057 -	0,093 -	0,097 -	0,059 -	0,063 -	0,390 +	0,418 +	
Сыворотка к р30 1:3200	0,056 -	0,057 -	0,070 -	0,079 -	0,057 -	0,061 -	0,262 +	0,264 +	

- *Nar - нормальный антиген;
- **Sar- специфический антиген.

Моноспецифическая сыворотка крови кролика к рекомбинантному р30 специфично реагировала со специфическим вирусным антигеном АЧС и с хроматографически очищенным рекомбинантным белком р30 вируса АЧС и не взаимодействовала с отрицательными антигенами - с лизатом интактной культуры клеток CV-1 и лизатом клеток E.coli штамма BL21(DE3)pLysS. Оптическая плотность лунок, сенсibilизированных специфическими антигенами, в которых инкубировали моноспецифическую сыворотку крови кролика превышала в 2,1 и более раза в лунках, в которых инкубировали отрицательную сыворотку крови кролика.

Титр исследуемой сыворотки с рекомбинантным хроматографически очищенным р30 составлял 1:1600-1:3200, а со специфическим вирусным антигеном АЧС - 1:400-1:800.

С целью определения активности испытуемой сыворотки крови кролика к рекомбинантному белку р30 вируса АЧС проводили её титрование в РНИФ.

Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 - ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВИРУСА АЧС В КУЛЬТУРЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРОЛИКА К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ Р30 ВИРУСА АЧС

	Специфические культуральные тест-препараты вируса АЧС		Отрицательные культуральные тест-препараты	
SS кролика 1:8	+++	+++	-	-
SS кролика 1:16	+++	+++	-	-
SS кролика 1:32	+++	+++	-	-
SS кролика 1:64	+++	+++	-	-
SS кролика 1:128	+++	+++	-	-
SS кролика 1:256	++	++	-	-
SS кролика 1:512	±	±	-	-
SS кролика 1:1024	-	-	-	-
SS свиньи	++++	++++	-	-
NS кролика	-	-	-	-

Моноспецифическая сыворотка крови кролика к рекомбинантному р30 специфически реагировала только с антигенами вируса АЧС инфицированных культуральных тест-препаратов и проб органов, но не взаимодействовала с антигенами интактных культуральных тест-препаратов перевиваемой культуры клеток CV-1 (Рисунок 3).

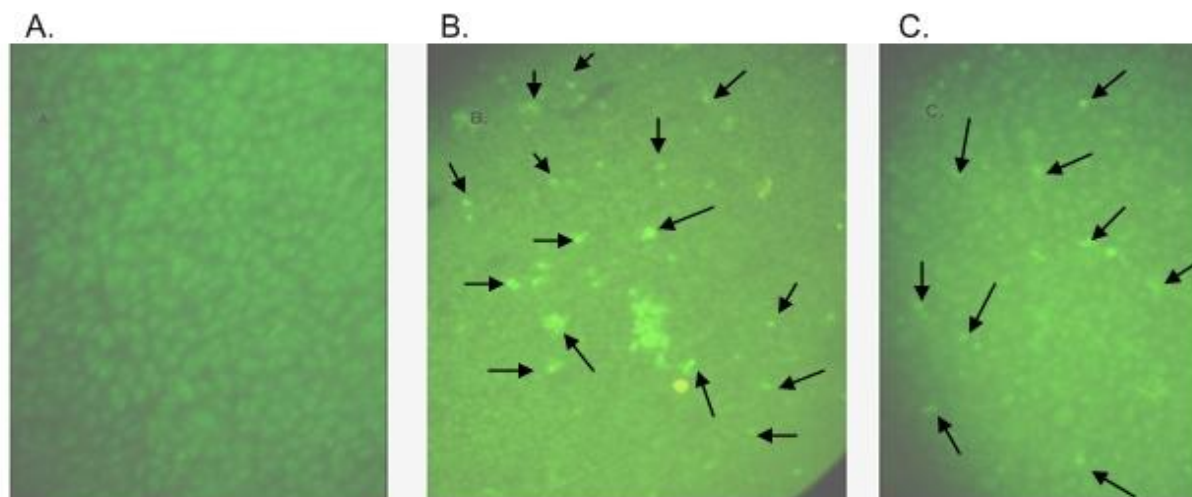


Рисунок 3. Выявление вируса АЧС в инфицированной культуре клеток в реакции непрямой иммунофлюоресценции. А. - отрицательный культуральный тест-препарат, фиксированной ацетоном культуры клеток CV-1; В, С. - специфические культуральные тест-препараты инфицированной авирулентным штаммом 691/88 вируса АЧС культуры клеток CV-1, фиксированной ацетоном, инкубированные со специфической к вирусу АЧС гипериммунной сывороткой свиньи в рабочем разведении (В) и с моноспецифической сывороткой крови кролика к рекомбинантному белку р30 вируса АЧС в разведении 1:64 (С).

В результате постановки реакции установили, что титр гипериммунной сыворотки крови кролика к рекомбинантному р30 вируса АЧС в РНИФ составляет 1:128-1:256.

При изучении свойств моноспецифической сыворотки крови кролика к рекомбинантному р30 вируса АЧС в РЗГАд проводили её титрование с 1:2 до 1:32. Разведения сыворотки в объеме 0,5 см³ инкубировали в течение часа при температуре 37°С с разведением вируса АЧС штамма

Конго-73 в дозе 2,0 Ig ГАЕ₅₀ /см³ на пробу. Далее инкубированную смесь вносили в интактную культуру ККМС, выращенную в чашках Карреля.

Результаты учета реакции титрования представлены на рисунке 4 (на 5-е сутки) и в таблице 3.

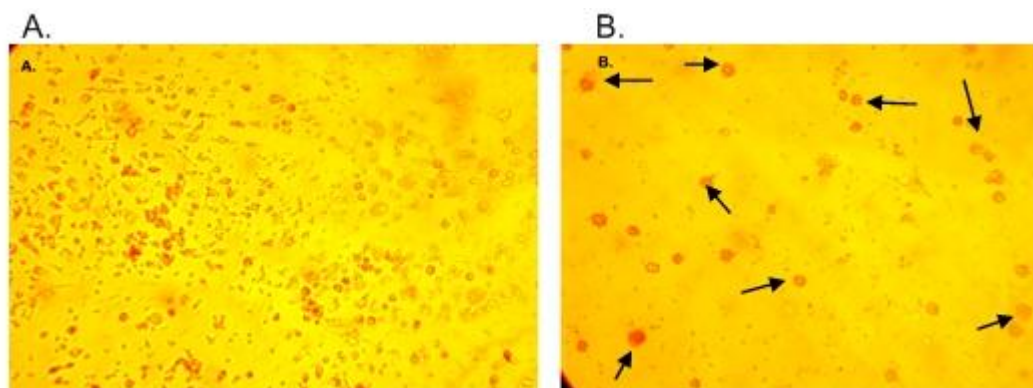


Рисунок 4. Изучение свойств гипериммунной сыворотки крови кролика к рекомбинантному р30 вируса АЧС в РЗГА_д в инфицированной культуре клеток ККМС. А. – культура клеток ККМС с задержкой гемадсорбции вируса АЧС при внесении сыворотки кролика к рекомбинантному р30 в разведении 1:4; В. - культура клеток ККМС с выраженным феноменом гемадсорбции при репликации вируса АЧС (3-и сутки).

Таблица 3. - РЕЗУЛЬТАТЫ РЗГА_д С СЫВОРОТКОЙ КРОВИ КРОЛИКА К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ Р30 ВИРУСА АЧС.

№	Разведения сыворотки крови кролика к рекомбинантному р30 (Rec-р30 штамма <i>НВЛ-1</i>)	Сутки							
		3	4	5	6	7	8	9	10
Заражение культуры ККМС гомологичным типом вируса АЧС штамма Конго-73									
1	1:2	-	-	-	-	-	-	-	+
2	1:4	-	-	-	-	-	+	+	+
3	1:8	-	-	-	+	+	+	+	+
4	1:16	-	+	+	+	+	+	+	+
5	1:32	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Специфическая сыворотка свиньи к вирусу АЧС II серотипа	-	-	-	-	-	-	-	-

† Наличие цитопатического действия (наличие гемадсорбции).

Гипериммунная сыворотка крови кролика к рекомбинантному белку р30 задерживала гемадсорбцию вируса АЧС в разведении 1:8 (конечное разведение сыворотки в чашке при этом составляло 1:80) до 5-х суток.

Обсуждение

Зарубежная исследовательская практика доказала эффективность и целесообразность использования в диагностических целях рекомбинантных белков и полученных к ним сывороток. Технология продукции рекомбинантных антигенов даёт много преимуществ по сравнению с методами, базирующимися на получении антигена из экстракта инфицированных клеток, т.к. исключается использование живого вируса для получения антигена; отпадает необходимость инактивации вируса, что сохраняет нативными конформационные эпитопы антигена; позволяет стандартизировать антиген и значительно облегчает интерпретацию полученных результатов исследований.

Сыворотки крови кроликов к различным рекомбинантным белкам широко используются в зарубежной практике. Так, Galindo I. et al. показали, что кроличья антисыворотка к рВ438L (р49) в иммуноблоттинге выявляет полипептид вируса АЧС молекулярной массой 49 кДа в пробах, приготовленных из экстракта инфицированной культуры клеток Vero, кроме того, с ее помощью авторы методом иммуноэлектронной микроскопии установили локализацию данного белка в вирусной частице [18].

Наши исследования с использованием гипериммунной моноспецифической сыворотки крови кролика к рекомбинантному белку р30 вируса АЧС по результатам иммунофлюоресценции полностью согласуются с результатами Barderas M.G, Wigdorovitz A., Merelo F. et al. [11].

В исследованиях . R. Tulman, G. A. Delhon , B. K. Ku , D. L. Rock [22]

показана возможность ингибиции размножения вируса АЧС и задержки гемадсорбции при использовании сывороток к отдельным рекомбинантным белкам. Полученная в результате наших экспериментов гипериммунная сыворотка кролика к рекомбинантному р30, также ингибировала репродукцию вируса АЧС, что приводило к задержке появления гемадсорбции в инфицированной культуре.

Следовательно, как показал анализ, гипериммунные моноспецифические сыворотки, полученные при иммунизации хроматографически очищенным рекомбинантным белком р30, могут быть использованы для диагностики АЧС в иммуноблоттинге, в реакции непрямой иммунофлуоресценции, а также применены в исследованиях при изучении патогенеза и репродукции вируса АЧС *in vivo* и *in vitro*.

Заключение

В результате исследований была получена на кроликах сыворотка к рекомбинантному белку р30 вируса АЧС, при определении специфичности иммуноглобулинов которой, было установлено, что сывороточные IgG крови иммунизированного кролика специфически взаимодействуют с культуральным антигеном вируса АЧС штамма 691/88.

Гипериммунная сыворотка крови кролика к рекомбинантному р30 в реакции непрямого ТФ ИФА специфически реагировала с вирусным антигеном АЧС и с хроматографически очищенным рекомбинантным белком р30 вируса АЧС, но не взаимодействовала с контрольными антигенами - с лизатом интактной культуры клеток CV-1 и лизатом клеткок *E.coli* штамма BL21(DE3)pLysS. Титр исследуемой сыворотки в реакции непрямого ТФ ИФА с рекомбинантным хроматографически очищенным р30 составлял 1:1600-1:3200, а со специфическим вирусным антигеном АЧС - 1:400-1:800.

Полученная в результате исследований моноспецифическая сыворотка крови кролика к рекомбинантному р30 в РНИФ специфично реагировала только с антигенами вируса АЧС из инфицированных культуральных тест-препаратов, но не взаимодействовала с интактными

клетками культуральных тест-препаратов перевиваемой культуры клеток CV-1. Титр исследуемой сыворотки в РНИФ 1:128-1:256.

Гипериммунная сыворотка крови кролика к рекомбинантному белку р30 задерживала появление гемадсорбции вируса гомологичного и гетерологичного серотипа в разведении 1:8 (конечное разведение сыворотки составляло 1:80) на 5-е сутки, что подтверждает факт, что белок р30 необходим для репродукции вируса АЧС.

Благодарность

Коллектив авторов выражает благодарность заведующему лаборатории Диагностики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии Куриннову В.В. и сотрудникам лаборатории Музейных штаммов Балышеву В.М. и Болговой М.В., предоставившим нам возможность проведения данной работы.

Литература

1. Family Asfarviridae / L.K. Dixon, J.V. Costa, J.M. Escribano [et al.] // *Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. - San Diego: Summers Academic Press, 2000. - P. 159-165.
2. Sanchez-Vizcaino, J.M. (2006). African swine fever. / J.M. Sanchez-Vizcaino // *Diseases of Swine, 9th Edition*, Ed. A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. Dallaire and D.J. Taylor. - Ames (Iowa, USA): Iowa State University Press, 2006. - P. 93-102.
3. Arias, M. African Swine Fever Eradication: The Spanish model / M. Arias, J.M. Sanchez-Vizcaino // *Trends in Emerging Viral Infections of Swine. 1st edn*. Ed. A. Morilla, K. Jin and J. Zimmerman. - Ames (Iowa, USA): Iowa State University Press, 2002. - P. 133-139.
4. Копытов, В.О. Клонирование и экспрессия генов структурных белков р30 и р72 вируса африканской чумы свиней: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.06: защищена 23.12.04 / Копытов Валерий Олегович. - Покров, 2004.
5. Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) *J. Mol. Biol.* 189, 113-30.
6. Davanloo, P. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2035-9.
7. Laemmli, U.K Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. - № 227. – P. 680-685.
8. Методы вирусологии и молекулярной биологии / Пер. с англ. и предисл. канд. биол. наук Л.Б. Меклера. Ред. Л.Г. Тер-Саркисян, М.Б. Николаева. – М.: Мир, 1972. – С. 187-189.
9. Andres, G. Characterization of two african swine fever virus 220-kDa proteins: a precursor of the major structural protein p150 and an oligomer of phosphoprotein p32 / G. Andres, C. Simon-Mateo, E. Vinuela // *Virology*. - 1993. - № 194. – P. 284-293.

10. Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization / P. Gomez-Puertas, F. Rodriguez, J.M. Oviedo [et al.] // *J. Virol.* - 1996. - № 70. - P. 5689–5694.
11. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae/ M.G. Barderas, A. Wigdorovitz, F. Merelo et al. // *J. Virol. Methods.* - 2000. - № 89. - P. 129-136.
12. Characterisation of p30 a highly antigenic membrane and secreted protein of african swine fever virus / C.L. Afonso, C. Alcaraz, A. Brun [et al.] // *Virology.* – 1992. - № 189(1). – P. 368-373.
13. Использование рекомбинантного белка p30 для выявления специфических антител к вирусу африканской чумы свиней / А.С. Казакова, Н.Н. Власова, О.В. Капустина, О.М. Стрижакова / *Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Т.IV. Вопросы микробиологии, вирусологии, эпизоотологии, ветеринарно-санитарной экспертизы и биотехнологии: материалы Междунар. науч.-практ. конф./УГСХА.* – Ульяновск, 2009. – С.124-127.
14. Приготовление препаратов рекомбинантных белков вируса африканской чумы свиней / Т.Э. Южук, А.С. Казакова, И.Ю. Хухорова, Н.Н. Власова / *Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации: материалы Междунар. науч.-практ. конф./ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.* – Покров, 2011. – С.224-229.
15. Рекомбинантные белки в изучении африканской чумы свиней / А.С. Казакова, Т.Э. Южук, Ю.Ф. Калантаенко, В.М. Лыска, Н.Н. Власова / *Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс].* – Краснодар: КубГАУ, 2011. - №67(03). – Шифр Информрегистра: 0421100012/0096. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2011/03/pdf/15.pdf>
16. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus/ R.J. Yanez, J.M. Rodriguez, M.L. Nogal, L. Yuste, C. Enriquez, J.F. Rodriguez, E. Vinuela// *Virology.* – 1995. – Vol. 208. – P. 249-278.
17. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences/ E.P. de Villiers, C. Gallardo, M. Arias, M. da Silva, Ch. Upton, R. Martin, R.P. Bishop// *Virology.* – 2010. – Vol. 400. – P. 128-136.
18. Galindo, I. Characterization of the African swine fever virus protein p49: a new late structural polypeptide / I. Galindo, E. Vinuela, A.L. Carrascosa // *Journal of General Virology.* - 2000. - № 81. - P. 59–65.
19. Сероиммунологическая классификация природных изолятов вируса африканской чумы свиней / И.Ф. Вишняков, Н.И. Митин, Ю.И. Петров [и др.] / *Материалы научно-практической конференции ВНИИВВиМ.* – Покров, 1995. – С. 141-143.
20. Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to an african swine fever virus / C.I. Alcaraz, M. De Diego, M.J. Pastor [et al.] / *J. Vet. Diagn. Invest.* – 1990. - № 2. – P. 191-196.
21. Разработка микрометода типизации вируса африканской чумы свиней / М.В. Салина, Ю.И. Петров, В.М. Балышев, И.В. Федорищев, Н.В. Князева / *Материалы научно-практической конференции ВНИИВВиМ.* – Покров, 1995. – С. 143-144.
22. African swine fever virus / E. R. Tulman , G. A. Delhon , B. K. Ku , D. L. Rock / *Current Topics in Microbiology and Immunology* 328. - Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.