



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 35533

(51) A61K 39/10 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2020/0751.1

(22) 29.10.2020

(45) 25.02.2022, бюл. №8

(72) Ильгекбаева Гульназ Дуйсековна; Махашов Едил; Тулепова Гульмира Кайырбековна; Садиев Сагыпаш Тулубекович

(73) Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный аграрный университет»

(56) Ильгекбаева Г.Д., Махашов Е.Ш., Тулепова Г., Садиев С.Т. (2019). Клонирование и экспрессия белка наружной мембраны бруцеллы Omp16. Исследования, результаты. № 3 ISSN 2304-3334.

RU 2361610 C1, 20.07.2009

KZ 32717 B, 26.03.2018

CN 111394293 (A), 10.07.2010

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БРУЦЕЛЛЕЗНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

(57) Изобретение относится к области ветеринарии, и может быть использовано для получения бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных.

Целью изобретения является получения безопасного и активного бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, выражается в получении безопасного и активного бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных.

Это достигается использованием в качестве бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных наружного мембранного белка бруцелл - Omp16 в растениях.

Способ получения бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных включает использование бруцеллезного антигена Omp16, путем подготовки вектора для клонирования мембранного белка бруцеллы Omp16 и удаление первых ОРС (открытая рамка считывания) и внесение рестриционных сайтов между ОРС4 и ОРС5 генома ВАВ.

(19) KZ (13) B (11) 35533

Изобретение относится к области ветеринарии, и может быть использовано для получения бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных.

Известен способ получения бруцеллезного антигена, включающий получение посевного материала и культивирование бруцелл из штамма *Brucella abortus* 19 в глубинных условиях на жидкой питательной среде с регуляцией уровня парциального давления, растворенного в культуральной жидкости кислорода на протяжении всего процесса культивирования, отделение и концентрирование выросших бактериальных клеток ультрафильтрацией и их инактивирование нагреванием (Патент РФ 2361610. «Способ получения бруцеллезного антигена из штамма *Brucella abortus* 19 для изготовления единого включающий получение посевного материала и культивирование бруцелл в глубинных условиях на жидкой питательной среде с регуляцией уровня парциального давления растворенного в культуральной жидкости кислорода на протяжении всего процесса культивирования, отделение и концентрирование выросших бактериальных клеток ультрафильтрацией и их инактивирование нагреванием бруцеллезного антигена для РА, РСК и РДСК, бруцеллезного антигена для роз-бенгал пробы (РБП) и бруцеллезного антигена для кольцевой реакции (КР) с молоком, способ изготовления бруцеллезной диагностической сыворотки и диагностические наборы» А61К 39/10 (2006.01), А61К 39/40 (2006.01), А61Р 31/04 (2006.01).

Недостатками способа являются низкая активность антигена, эпидемическая опасность, связанная с использованием вирулентных культур бруцелл, и высокая себестоимость конечного продукта.

Известен способ получения вакцины против бруцеллеза, включающий культивирование штамма *Brucella abortus* 19 на плотной питательной среде с последующим смывом бактериальной массы, лиофильным высушиванием микробных клеток (Патент РФ 2054293. «Способ получения вакцины против бруцеллеза» А61К 39/10 (2006.01).

Однако вакцина, полученная известным способом, имеет следующие недостатки: является живой, в результате чего развивается бактерионосительство; экологически небезопасна в связи с возможностью реверсий штамма; абортотенна; вызывает образование антител в высоких титрах, что создает трудности при диагностике бруцеллеза.

Целью изобретения является получения безопасного и активного бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, выражается в получении безопасного и активного бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных.

Это достигается использованием в бруцеллезном антигене для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных наружного мембранного белка бруцелл - Omp16 в растениях.

Способ получения бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных включает использование бруцеллезного антигена Omp16, путем подготовки вектора для клонирования мембранного белка бруцеллы Omp16 и удаление первых ОРС (открытая рамка считывания) и внесение рестрикционных сайтов между ОРС4 и ОРС5 генома ВАВ.

Разработанный вирусный вектор на основе генома ВАВ был использован для получения мембранного белка бруцеллы Omp16 в растениях путем агроинфильтрации целого растения, магнифекш метод. Данный метод является самым эффективным в накоплении большого количества целевого белка. Использование природной способности вирусов заражать растение, системно передвигаться по растению проходя множественные клеточные барьеры, а также бороться с РНК-интерференцией приводит к неспособности вируса заражать все клетки растений и синхронно распространяться по растению, что соответственно ведет к накоплению большого количества бруцеллезных белков. Объединение вирусной способности с высокой эффективностью реплицироваться в клетках растений и агробактериальной способности трансформировать клетки растений повышает в разы эффективность экспрессии бруцеллезных белков.

Пример 1 получения бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных.

Способ разработки бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных на основе мембранного белка бруцеллы Omp16, включает подготовку вектора для клонирования мембранного белка бруцеллы Omp16 путем удаление первых ОРС и внесение рестрикционных сайтов между ОРС4 и ОРС5 генома ВАВ. Данный вектор использовался для внесения кассеты, содержащей последовательности 2А пептидов и гена Omp16 между ними. Для разработки вирусного вектора на основе деконструктивного генома ВАВ, была использована плазида pCASSgva. Стратегия разработки вектора заключалась в замене ОРС4 ВАВ на ген мембранного белка бруцеллы Omp16. Ген мембранного белка бруцеллы Omp16 находился под контролем субгеномного промотора КБ ВАВ и в рамке считывания с ОРС5. Область перекрытия ОРС3 и ОРС4 оставалась интактной. Для удаления аминокислотной последовательности области перекрытия (N-конца КБ ВАВ) и для отделения мембранного белка бруцеллы Omp16 от белка Р10, были внесены последовательности 2А пептидов. Т2А последовательность была внесена между областью перекрытия и геном мембранного белка бруцеллы Omp16, Е2А последовательность была

внесена между ORC5 и геном Omp16. Стоп-кодон у гена Omp16 были удалены. Модифицированный ген Omp16 в дальнейшем был субклонирован в бинарный вектор pSAMgva для агробактериальной доставки в растения.

Для анализа экспрессии мембранного белка бруцеллы Omp16 в растениях с помощью вирусного вектора, проводили агроинфильтрацию растений *Nicotiana benthamiana*.

Эффективность вирусного вектора была анализирована путем внесения гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок и гена, кодирующего капсидный белок вируса хлоротической пятнистости листьев яблони, данные гены вносились по отдельности. Для повышения количества мембранного белка бруцеллы Omp16 в растениях при экспрессии гена Omp16 с помощью деконструированного вирусного вектора были

разработаны трансгенные растения, несущие ген КБ ВАВ. Стабильная трансформация осуществлялась с помощью агробактерий.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения бруцеллезного антигена для диагностики и профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных, включающий культивирование штамма *Brucella abortus* 19 на плотной питательной среде с последующим смывом бактериальной массы, *отличающийся* тем, что используют бруцеллезный антиген Omp16, путем клонирования гена мембранного белка бруцеллы Omp16 в вектор на основе вируса А винограда с последующей трансформацией в растения с помощью агробактерий.