



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40571 (13) C2

(51) 7 C12N15/00, C12N7/01,
C12N12/38, A61K39/265,
A61K39/395, C12P21/08,
C12Q1/70

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) МУТАНТ КОРОВ'ЯЧОГО ВІРУСУ ГЕРПЕСУ ТИПУ 1 (BHV-1), КОМПОЗИЦІЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ВАКЦИНАЦІЇ ТВАРИН ДЛЯ ЗАХИСТУ ЇХ ВІД BHV-1, КОМПОЗИЦІЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ВАКЦИНАЦІЇ ТВАРИН ДЛЯ ЗАХИСТУ ЇХ ВІД ПАТОГЕНА

(21) 93004426

(22) 05.06.1992

(24) 15.08.2001

(31) 9100989

(32) 07.06.1991

(33) NL

(86) PCT/NL92/00097, 05.06.1992

(46) 15.08.2001, Бюл. № 7, 2001 р.

(72) Рейсвейк Франціскус Антоніус Марія, NL,
Оірсот Йоханнес Теодорус ван, NL, Має Ооже Ка-
м'ель, BE

(73) СТИХТИНГ СЕНТРАЛ ДІРГЕНЕСКЮНДІГ ІНСТІ-
ТЮТ, NL

(56) The Journal of Virology, vol. 61, no. 2, 1987, pp.
600–603. H. Neidhardt et. al. "Herpes simplex virus
type 1 glycoprotein is not indispensable for viral acti-
vity".

(57) 1. Мутант коров'ячого вірусу герпеса типу 1
(BHV-1), який має делецію в gE-гені глікопро-
теїна, причому gE-ген глікопротеїна розташований в
US-регіоні між сайтами рестрикції Pst I та Sma
I, причому вказана делеція дозволяє мутанту
відличатися серологічно від BHV-1 дикого типу.

2. Мутант BHV-1 по п. 1, **відличаючийся** тим, що
вказана делеція в gE-гені глікопротеїна ви-
звана аттенуацією.

3. Мутант BHV-1 по п. 2, **відличаючийся** тим, що
представляє собою Difivac-1 (Інститут Пастера,
Франція, депозит № 1-1213).

4. Мутант BHV-1 по п. 1, **відличаючийся** тим, що
вказана делеція в gE-гені глікопротеїна була
получена з допомогою технології рекомбінантних
ДНК.

5. Мутант BHV-1 по п. 4, **відличаючийся** тим, що
являється 1B7 або 1B8 за даними Саузерн-
блоттингу.

6. Мутант BHV-1 по п. 1, **відличаючийся** тим, що в
доповнення до вказаної делеції в gE-гені гліко-
протеїна, має делецію в гені тимідинкінази і
делецію в gI-гені глікопротеїна.

7. Мутант BHV-1 по п. 1, **відличаючийся** тим, що в
доповнення до вказаної делеції в gE-гені глі-

копротеїна, має делецію в gI-гені глікопро-
теїна.

8. Мутант BHV-1 по п. 1, **відличаючийся** тим, що в
доповнення до вказаної делеції в gE-гені гліко-
протеїна має делецію в гені тимідинкінази і
делецію в gI-гені глікопротеїна.

9. Мутант BHV-1 по п. 1, **відличаючийся** тим, що
содержит гетерологічний ген, введений з ис-
пользованием технології рекомбінантних ДНК.

10. Мутант BHV-1 по п. 9, **відличаючийся** тим, що
вказаний гетерологічний ген вставлений в місце-
расположение gE-гена глікопротеїна і знаходиться
під контролем регуляторних послідовностей
gE-гена або гетерологічного гена.

11. Мутант BHV-1 по п. 10, **відличаючийся** тим,
що гетерологічний ген з'єднаний з частиною gE-
гена, який кодує сигнальний пептид.

12. Мутант BHV-1 по п. 10 або 11, **відличаючийся**
тим, що в доповнення до делеції gE-гена гліко-
протеїна, має делецію в гені тимідинкінази,
делецію в gI-гені глікопротеїна або в обох ге-
нах, причому вказаний гетерологічний ген встав-
лений в місцепоположение, по меншій мірі, однієї
із вказаних делецій.

13. Мутант BHV-1 по будь-якому з пп. 9–12, **від-
личаючийся** тим, що вказаний гетерологічний ген
кодує імуногенний білок або пептид другого
патогена або кодує цитокін.

14. Композиція вакцини для вакцинації живот-
них, в частності, млекопитаючих, конкретніше
коров, для захисту їх від BHV-1, **відличаюча**
тим, що содержит мутант BHV-1 по будь-якому з пп.
1–13 і підходящий носитель або добавку.

15. Композиція вакцини для вакцинації живот-
них, в частності млекопитаючих, конкретно ко-
ров, для захисту їх від патогена, **відличаюча**
тим, що содержит мутант BHV-1, який має
делецію в gE-гені глікопротеїна і содержит ге-
терологічний ген, який був введений з исполь-
зованием технології рекомбінантних ДНК, і ко-
дує імуногенний білок або пептид патогена,
і підходящий носитель або добавку.

Это изобретение относится к областям вакцинации и диагностики в связи с заболеваниями, которые вызываются патогенными бактериями, и включает использование как классических способов получения живой ослабленной вакцины или инактивированной вакцины, так и современных способов, основанных на ДНК рекомбинантной технологии.

Более конкретно, изобретение относится к живым ослабленным вакцинам и инактивированным вакцинам для защиты животных, особенно крупного рогатого скота против вируса герпеса типа I у коров /BHV-1/, причем эти вакцины таковы, что они не только безопасны и эффективны, но также дают возможность отличить зараженных от незараженных животных в вакцинированной популяции.

Диагностические комплексы и процедуры, которые можно использовать для такого теста на различение зараженных и незараженных животных в вакцинированной популяции, являются также аспектом настоящего изобретения.

Предпосылки изобретения

BHV-1, включая инфекционный вирус ринотрахеита /IBPV/ и инфекционный пустулезный вирус вульвовагинита /IPVV/, играет важную роль в развитии респираторных заболеваний и нарушении плодовитости у коров. После острого заражения BHV-1 часто остается у носителя в латентной форме. Латентный вирус может вновь активизироваться под влиянием стресса – что может сопровождаться клиническими проявлениями – а затем вывести из организма. Как следствие, зараженный скот можно рассматривать как потенциальный разносчик BHV-1. BHV-1 часто приобретает эндемический характер приблизительно в 75% голландских ферм. Особенно серологически позитивны к нему старые животные.

Существует ряд инактивированных ("убитых") вакцин и множество ослабленных ("живых") вакцин для прививки против заражений BHV-1. Инактивированные вакцины готовятся умерщвлением вируса BHV-1, например, теплообработкой, облучением или обработкой этанолом или формалином. Однако, это не всегда обеспечивает достаточную защиту. Ослабленные вакцины готовятся большим числом пересевов на гомологичные (коровьи) или на гетерологические клетки такие, как клетки свиньи или собаки, и иногда потом вирусы также обрабатываются физически или химически. Таким образом, в геноме вируса развиваются неизвестные мутации/делеции, которые часто снижают свойства вируса, продуцирующие заболевание. Ослабленные живые вакцины дают лучшую защиту, чем инактивированные вакцины, поскольку они дают больше вирусных антигенов иммунной системе хозяина. Другим важным преимуществом живых вакцин является то, что их можно назначать через нос, т.е. на участке, где происходит первое размножение вируса дикого типа после заражения. И все же живые вакцины нуждаются в усовершенствовании. Некоторые живые вакцины все еще обладают abortогенной способностью, что проявляется особенно после внутримышечного назначения. Кроме того, вероятно, все живые вакцины присутствуют в вакцинированной корове в латентном состоянии. И существует вероят-

ность, что если вакцина не сильно отличается от вируса дикого типа, возможен возврат к вирулентности. Но одна из основных проблем заключается в том, что вакцины BHV-1 не могут помешать заражению вирусами дикого типа. В результате вакцинированный скот может также разносить BHV-1 дикого типа.

Для хорошей программы контроля BHV-1 необходимо иметь эффективную и безопасную вакцину, которую можно отличить от вируса дикого типа, поскольку применение эффективной вакцины может снизить значительно циркуляцию BHV-1, а тест, который может различить вакцину и вирус дикого типа, делает возможным обнаружение (и затем удаление) инфицированного скота в вакцинированной популяции.

Были разработаны BHV-1 вакцины, которые представлены как более безопасные, чем традиционные вакцины, и отличительные от вируса дикого типа. Был изолирован мутант с делецией тимидинкиназы, который обладает меньшей abortогенностью, становится латентным не так часто, и не может реактивироваться. Кроме того, с использованием техники рекомбинантной ДНК была создана BHV-1 вакцина, которая имела делецию в гене для гликопротеина gIII, что делает эту вакцину отличаемой от BHV-1 дикого типа посредством серологических приемов. Однако, все же существуют возражения против этих вакцин. С одной стороны ген тимидинкиназы вовлечен в вирусную репликацию, а снижение репликации ведет к снижению защиты. С другой стороны гликопротеин gIII важен для выработки защитных антител, что делает менее эффективной вакцину с делецией gIII. Практическая проблема заключается в том, что внутриносное введение, которое дает наилучшую защиту в случае рекомбинантных вакцин, не разрешено в некоторых странах. Соответственно, существует необходимость создания вакцины, которая была бы столь же безопасна, как и эффективна, и кроме того, отличима от BHV-1 дикого типа, еще также желательно, чтобы, по меньшей мере, одна из таких вакцин была основана на вирусе, ослабленном с помощью традиционной техники, нежели вирусе, созданном техникой рекомбинантной ДНК.

Теперь, с помощью пересевов в клеточных культурах был получен штамм BHV-1, в котором отсутствует ген гликопротеина gE. Первые результаты наших исследований показывают, что этот ген очень полезен в серологическом разграничении с BHV-1 дикого типа, и что он участвует в выражении вирулентности. Поэтому его делеция способствует безопасности и может сделать использование делеций тимидинкиназы ненужным. Гликопротеин gE представляется менее важным для индуцирования защиты, чем гликопротеин gIII. Ослабленный традиционным способом штамм BHV-1, который можно серологически отличить от вируса дикого типа, уникален. Расположение и последовательность ДНК гена gE, описанные здесь в первый раз, не были ранее известны. Не были также известны ни олигонуклеотиды, ни полипептиды и олигопептиды, которые можно получить от них. Проба на серологическое различение на основе gE гена также уникальна.

Важное преимущество этого "традиционного" мутанта с делецией gE ("традиционным" счи-

тается использование традиционного метода для изоляции ослабленного вируса) заключается в том, что его внутриносовое назначение допускается в странах, где это запрещено в отношении рекомбинантных вакцин. Однако, с учетом различных мнений по безопасности, кроме этой традиционной вакцины с делецией gE, были также созданы конкретные рекомбинантные варианты. Эти рекомбинантные вакцины также имели делецию gE и могут иметь или не иметь делецию гена тимидинкиназы – и также могут использоваться как векторы для экспрессии гетерологических векторов. Все эти рекомбинантные вакцины можно отличить от вируса дикого типа с помощью того же gE-специфичного теста. Использование стандартного теста для ряда разных вакцин может быть большим преимуществом в борьбе с BHV-1 в международном масштабе. Такой подход не был ранее описан в области BHV-1 вакцин.

Серологический анализ ответной реакции на BHV-1 у скота показал, что важная фракция анти-gE антител направлена против комплекса, сформированного гликопротеином gE и другим гликопротеином BHV-1 – гликопротеином gI. Поэтому серологические тесты, которые могут (также) продемонстрировать присутствие таких комплекс-специфических антител, более чувствительны, чем тесты, которые могут только обнаруживать анти-gE антитела. Скот, вакцинированный одним мутантом с делецией gE, может вырабатывать анти-gI антитела, которые могут помешать обнаружению анти-gI/gE антител. Следовательно, это изобретение также включает вакцину с двойной делецией gI/gE.

Содержание изобретения

Во-первых, это изобретение предусматривает мутант с делецией BHV-1, который имеет делецию в gE-гене гликопротеина. Слова "делеция в" охватывают делецию гена в целом.

Предпочтительный вариант изобретения предполагает мутант BHV-1 с делецией, который имеет делецию в gE-гене гликопротеина, что вызвано процедурой ослабления, такой, как мутант с делецией Difivac-I, описанной ниже.

Другие предпочтительные варианты изобретения заключаются в мутанте с делецией BHV-1, включающем делецию в gE-гене гликопротеина, который был создан технологией рекомбинантной ДНК, такой, как мутанты с делецией IB7 или IB8, описанные ниже.

Другой предпочтительный вариант изобретения состоит из мутанта BHV-1 с двойной делецией, включающего делецию в gE-гене гликопротеина и делецию в gI-гене гликопротеина, такого, как мутант с двойной делецией gI/gE Difivac-IE, описанный ниже.

Кроме того, учитывая максимальную безопасность, в соответствии с изобретением предпочтителен мутант с делецией BHV-1, который имеет делецию в gE-гене гликопротеина и делецию в гене тимидинкиназы. В изобретение включен также мутант с делецией BHV-1, который имеет делецию в gE-гене гликопротеина, gI-гене гликопротеина, и гене тимидинкиназы.

Изобретение предусматривает композицию вакцины для вакцинации животных, в частности, млекопитающих, конкретнее коров, чтобы защи-

тить их против BHV-1, включающую мутант с делецией BHV-1, как описано выше, и подходящий носитель или стимулятор. Указанная композиция может быть композицией живой или инактивированной вакцины.

Далее изобретение предусматривает мутант BHV-1, который имеет делецию в gE-гене гликопротеина и содержит гетерологичный ген, введенный технологией рекомбинантной ДНК. Предпочтительно это касается мутанта BHV-1, который содержит гетерологичный ген, введенный технологией рекомбинантной ДНК, в местоположение gE-гена гликопротеина, и этот гетерологичный ген находится под контролем регуляторных последовательностей gE-гена и может быть связан с частью gE-гена, которая кодирует сигнальный пептид. Такой гетерологичный ген может также быть под контролем другого промотора BHV-1, или под контролем гетерологичного промотора. Если мутант BHV-1 имеет другие делеции в дополнение к делеции в gE-гене гликопротеина, такие, как делеция в гене тимидинкиназы и/или делеция в gI-гене гликопротеина, указанный гетерологичный ген можно также ввести в местоположение этой дополнительной делеции (й). Множественные вставки – еще одна возможность, либо в месте в местоположении одной делеции, либо распределенные по местоположениям нескольких делеций.

Введенный гетерологичный ген предпочтительно кодирует для иммуногенного белка или пептида другого патогена или для цитокина, который стимулирует иммунную реакцию. Примерами подходящих цитокинов являются интерлейкин 2, интерферон-альфа и интерферон-гамма.

Изобретение также предусматривает (живую или инактивированную) композицию вакцины для вакцинации животных, в частности, млекопитающих, конкретнее, коров, чтобы защитить их против (различных) патогенных бактерий, включающую мутант BHV-1, имеющий в себе кодирование гетерологичного гена для иммуногенного белка или пептида этого другого патогена, и подходящий носитель стимулятора. Конечно, защита может относиться более, чем к одному патогену, т.е. это мультивалентная вакцина, в которой мутант содержит множество гетерологичных генов.

Далее изобретение относится к композиции, включающей рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую gE-ген гликопротеина BHV-1, часть этого gE-гена гликопротеина или нуклеотидную последовательность, производную от этого gE-гена гликопротеина. Эта композиция может содержать вектор для клонирования или экспрессии, имеющий в себе вставку рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая включает gE-ген гликопротеина BHV-1, часть этого gE-гена гликопротеина или нуклеотидную последовательность, производную от этого gE-гена гликопротеина.

Изобретение также включает композицию, содержащую гликопротеин gE BHV-1, часть этого гликопротеина gE, пептид, производный от этого гликопротеина gE, или комплекс гликопротеинов gE и gI, и композицию, содержащую антитело, которое специфично для гликопротеина gE BHV-1, части этого гликопротеина gE, пептида, производного от этого гликопротеина gE, или комплекса гликопротеинов gE и gI. "Антитело" означает как

препарат поликлонального антитела, так и моноклонального антитела, предпочитаемый для большинства применений. Под терминами "часть гликопротеина gE" и "пептид, производный от гликопротеина gE" понимается обозначение последовательностей gE-специфической аминокислоты, которые обычно имеют длину, по меньшей мере, около 8 аминокислот.

Далее изобретение относится к диагностическим комплексам и процедурам для обнаружения нуклеиновой кислоты BHV-1 в образце, биологическом образце, таком, как кровь или сыворотка крови, кровяные клетки, молоко, жидкости тела, такие, как слезы, промывающая жидкость легких, носовая жидкость, сперма, в частности, семенная жидкость, слюна, мокрота или ткань, в частности, нервная ткань, животного, в частности, млекопитающего, конкретно, коровы, включающим зонд или праймер нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность, полученную от gE-гена гликопротеина BHV-1, и средства обнаружения, пригодные для реакции на обнаружение нуклеиновой кислоты.

Далее, изобретение относится к диагностическим комплексам и процедурам для обнаружения антител, которые специфичны для BHV-1 в образце, в частности, биологическом образце, таком, как кровь или сыворотка крови, слюна, мокрота, жидкости тела, такие, как слезы, промывающая жидкость легких, носовая жидкость, молоко, или ткань животного, конкретно коровы, включающим гликопротеин gE BHV-1, часть этого гликопротеина gE, пептид, производный от этого гликопротеина gE, или комплекс гликопротеинов gE и gI, и средства обнаружения, пригодные для реакции на обнаружение антитела. Такие диагностические процедуры могут также содержать одно или несколько антител, которые специфичны для гликопротеина gE BHV-1 или специфичны для комплекса гликопротеинов gE и gI BHV-1.

Изобретение также относится к диагностическим процедурам для обнаружения белка BHV-1 в образце, в частности, биологическом образце, таком, как кровь или сыворотка крови, клетки крови, молоко, жидкости тела, такие, как слезы, промывающая жидкость легких, носовая жидкость, сперма, в частности, семенная жидкость, слюна, мокрота или ткань, в частности, нервная ткань животного, млекопитающего, конкретнее коровы, включающим одно или несколько антител, которые специфичны для гликопротеина gE BHV-1 или специфичны для комплекса гликопротеинов gE и gI BHV-1, и средства обнаружения, пригодные для анализа на обнаружение белка.

Изобретение далее предусматривает способ определения заражения BHV-1 животного, в частности млекопитающего, конкретно, коровы, включающий исследование образца от животного, в частности, биологического образца, такого, как кровь, или сыворотка крови, клетки крови, сперма, в частности, семенная жидкость, слюна, жидкости тела, такие, как слезы, промывающая жидкость легких, носовая жидкость, молоко, или ткань, в частности, нервная ткань, на присутствие нуклеиновой кислоты, содержащей gE-ген гликопротеина BHV-1, или присутствие гликопротеид gE BHV-1, или присутствие антител, которые специфичны

для гликопротеин gE BHV-1 или специфичны для комплекса гликопротеинов gE и gI BHV-1. Образец для исследования может быть взят у животного, которое ранее не вакцинировалось композицией вакцины по изобретению или у животного, которое ранее вакцинировалось препаратом вакцины по изобретению.

Подробное описание изобретения.

Изобретение относится к ряду BHV-1 вакцин, как живых, так и инактивированных, у которых общее то, что в них полностью или частично отсутствует гликопротеин gE ген. Эта серия включает как естественный мутант с gE делецией, так и созданные мутанты с делецией gE, которые могут включать или не включать также делецию гена тимидинкиназы и/или гена gI гликопротеина, и созданные мутанты с делецией gE, которые используются как векторы для гетерологичных генов. Изобретение далее относится к нуклеотидным последовательностям, кодирующим гликопротеид gE-ген BHV-1, олигонуклеотидам, производным от этих последовательностей, самому гликопротеину gE, пептидам, которые получены от них, и (моноклональным или поликлональным) антителам, которые направлены против gE гликопротеина и пептидов, полученных от них. Изобретение также относится к комплексам гликопротеинов gE и gI BHV-1, и к антителам, направленным против таких комплексов.

Эти материалы в соответствии с изобретением можно использовать для:

1) вакцинации скота против заболеваний, вызванных BHV-1, так что можно различить зараженных BHV-1 животных и вакцинированных животных; наряду с традиционной можно использовать созданную вакцину;

2) вакцинации скота против как заболеваний BHV-1, так и заболеваний, вызванных другими патогенными бактериями, кодирующие последовательности которых для защитных антигенов можно ввести в мутанты с делецией BHV-1;

3) исследования крови, сыворотки, молока или других жидкостей тела скота на серологическое определение или посредством техники обнаружения нуклеиновой кислоты (например, ЦРП (ЦРП – цепная реакция полимеразы)), были ли животные заражены BHV-1 одного типа или были вакцинированы мутантом с делецией gE.

Синтез олигопептидов, полипептидов и гликопротеинов, полученных от кодирующей последовательности гликопротеин gE-гена и гликопротеин gI-гена BHV-1.

Результаты анализа последовательности ДНК, описанного в примерах, гликопротеин gE-гена (фиг. 3A) и изолированных фрагментов ДНК, которые кодируют для этого гена, делают возможным, используя стандартные молекулярно-биологические процедуры, как синтезировать пептиды gE белка (олиго или полипептиды), так и выразить gE белок полностью или большими частями через прокариотный путь (в бактериях) или через эукариотный путь (например, в мышечных клетках). Через эти пути можно получить gE специфический антиген, который может например, служить для выработки gE-специфических моноклональных антител (MAT). Кроме того, gE-специфический антиген (и gE-специфические MAT) можно использо-

вать в серологических тестах, чтобы сделать различие между животными, вакцинированными вакциной BHV-1 делеции gE, и животными, зараженными вирусом BHV-1 дикого типа.

Результаты частичного анализа последовательности ДНК гликопротеина gI гена – описанного в примерах – и изолированные фрагменты ДНК, которые кодируют для этого гена, вместе с эукариотными клетками, выражающими гликопротеин gE, позволяют экспрессию gI/gE комплекса в эукариотных клетках (См. фиг. 13 и 14). Этот гликопротеиновый комплекс может быть использован, чтобы получить gI/gE специфические моноклональные антитела. gI/gE комплекс можно также использовать как антиген в серологических пробах для дифференциации между животными, вакцинированными одним gE BHV-1 мутантом с делецией, или двойным gI/gE BHV-1 мутантом с делецией, и животными, зараженными вирусом BHV-1 дикого типа.

gE-специфические пептиды

На основе известной кодирующей последовательности белка с помощью автоматического синтезатора можно получить полипептиды не менее, чем 40–50 аминокислот. Теперь, когда выявлена кодирующая последовательность белка гликопротеина штамма Lam BHV-1 (фиг. 3A), можно синтезировать полипептиды этого BHV-1 gE гликопротеина. Такими полипептидами по стандартным методам можно иммунизировать экспериментальных животных, таких, как мышей или кроликов, чтобы выработать gE-специфические антитела. Кроме того, используя эти gE-специфические пептиды, можно также определить местоположения, где анти-gE антитела реагируют с gE белком (эпитопы), например способом PEPSCAN (Geysen и др., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci, США 81, 3998–4002). gE-специфические олигопептиды можно также использовать в серологических реакциях, которые демонстрируют анти-gE антитела.

Прокариотная экспрессия gE

Для синтеза gE белка в бактериях (т.е. прокариотной экспрессии gE), фрагменты ДНК, которые кодируют для гликопротеина gE или для его частей, должны клонироваться в векторы прокариотной экспрессии. Векторы прокариотной экспрессии представляют собой циркулярные молекулы ДНК, которые могут сохранять себя в бактерии как отдельная воспроизводящая молекула (плазмида). Эти векторы экспрессии содержат один или несколько маркерных генов, которые кодируют для устойчивости к антибиотику, и таким образом, позволяют выбор для бактерий с вектором экспрессии. Кроме того, векторы экспрессии включают (часто контролируемый) участок промотора, за которым фрагменты ДНК можно лигировать и которые затем выражаются под влиянием промотора. Во многих настоящих векторах прокариотной экспрессии нужный белок выражен в состоянии слияния с так называемым белком носителем. В вектора за промотором располагается кодирующая последовательность для белка-носителя, непосредственно к которому можно лигировать нужный фрагмент ДНК. Белки слияния часто более стабильны и/или их легче распознать и/или изолировать. Уровень состояния устойчивости, которого может достичь определенный слитый белок в определенном

бактериальном штамме, зависит от вида слияния и от штамма. Обычно пробуют различные комбинации.

Эукариотной экспрессии гликопротеин gE-гена

Хотя прокариотная экспрессия белков предлагает некоторые преимущества, белки не имеют модификаций, таких, как гликозиляция и других, которые имеют место в эукариотных клетках. В результате этого, эукариотически выраженный белок часто является более стабильным антигеном. Для гетерологичной экспрессии белков в эукариотных клетках, таких: как мышинные клетки, используются векторы эукариотной экспрессии. Этими векторами являются плазмиды, которые не только могут размножаться в клетках *E. coli*, но также стабильно существуют в эукариотных клетках. В дополнение к прокариотному селективному маркеру они также включают эукариотный селективный маркер. Аналогично векторам прокариотной экспрессии векторы эукариотной экспрессии содержат участок промотора, за которым можно лигировать желаемые гены. Однако, последовательности промотора в эукариотных векторах специфичны для эукариотных клеток. Более того, в эукариотных векторах слияние с белками-носителями используется очень редко. Эти векторы вводятся в эукариотные клетки посредством стандартного способа трансфекции (Graham и A.J. van der Eb, 1973, Virology, 52, 456–467). Кроме эукариотных плазмидных векторов имеются также вирусные векторы, где гетерологичный ген вводится в геном вируса (напр. ретровирусы, вирусы герпеса и коревой оспы). Следовательно эукариотные клетки можно заразить рекомбинатными вирусами.

В общем, нельзя предсказать какой вектор и тип клетки наиболее приемлемы для определенного продукта гена. По большей части пробуются несколько комбинаций.

Эукариотная экспрессия и гликопротеина gE и гликопротеина gI

Конечная структура, которой достигает белок, зависит от последовательности его основной аминокислоты, его укладки, его посттрансляционной модификации и т.д. Важный фактор, от которого зависит структура белка – его взаимосвязь с одним или несколькими другими белками. Мы выявили, что BHV-1 гликопротеин gE образует комплекс, по меньшей мере, с одним другим гликопротеином: BHV-1 гликопротеином gI. Первое указание на такой комплекс появилось из наших результатов с кандидатом анти-gE MAT 1, 51, 67, 75 и 78 (см. таблицу 2). Эти MAT не реагировали ни с Difivac-I, ни с Lamg E', а также не опознавали гликопротеин gE-экспрессирующие 3T3 клетки. Однако, эти MAT не реагировали с gE-экспрессирующими 3T3 клетками после заражения Difivac-I, показывая, что нужны комплементарные факторы, чтобы дать гликопротеину gE нужную антигенную конформацию для этих MAT. В некоторых из наших экспериментах по радио-иммунопреципитату с MAT 81 мы выявили копреципитацию белка с молекулярным весом в 63 кД. Ввиду того, что гликопротеин gE вируса простого герпеса образует комплекс с белком со сравнительным молекулярным весом (HSV1 гликопротеин gI), мы сделали вывод, что BHV-1 гликопротеин gE образует комплекс с

BHV-1 гомологом гликопротеина gI. Чтобы изучить этот BHV-1 gE/gI комплекс и получить gE антиген с должной антигенной структурой, мы экспрессировали оба гликопротеина в одной эукариотной клетке. Для этого мы применили те же процедуры, что описаны для эукариотной экспрессии одного гликопротеина gE. Единственным дополнительным условием было использование векторов экспрессии с различными эукариотными селективируемыми маркерами.

Серологические реакции

Серологические методы для различения скота, вакцинированного Difivac-I скота, зараженного BHV-1 дикого типа на основе антител против gE, предпочтительно основываются на использовании моноклональных антител, направленных против gE. Они используются следующим образом:

a) В соответствии с принципом, описанным Van Oirschot и др. (Jorn. of Virological Methods, 22, 191–206, 1988). В этом ELISA (ELISA – блокирующий ферментный иммуно-сорбентный тест) для обнаружения gI антител против вируса болезни Ауешзны's, антитела проявляются своим блокирующим действием на реакцию двух MAT, имеющих два разных эпитопа на gI. Тест или реакция проводится следующим образом. Микротитрационные планшеты покрываются MAT 1 в течение ночи при 37°C, после чего они стоят, например, при 4°C или -20°C. Исследуемая сыворотка преинкубируется антигеном в отдельных непокрытых микротитрационных планшетах, например, 2 часа при 37°C. Планшеты, покрытые MAT-1, промываются, скажем, 5 раз, после чего на эти планшеты добавляется MAT 2, связанное с пероксидазой хрена обыкновенного (HRPO). Затем преинкубированные смеси сыворотка-антиген переносятся на планшеты, в которых находятся два MAT, с последующей инкубацией, например, в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промываются и субстрат добавляется к каждой лунке. После приблизительно 2 часов при комнатной температуре планшеты считываются спектрофотометрически. На каждом планшете имеются четыре отрицательные контрольные сыворотки и четыре серийных разведения положительной сыворотки. Сыворотка с величиной оптической плотности (ОП) менее 50% средней величины ОП 4 отрицательных контрольных сывороток, которые исследовались на том же планшете, считается положительной.

b) В соответствии с принципом бутерброда непрямого двойного антитела (IDAS). Здесь микротитровальные планшеты покрываются MAT или поликлональной сывороткой, направленной против gE белка. Инкубация препаратом gE-антигена приводит к тому, что gE связывается с покрытием. Антитела, специфически направленные против gE в исследуемой коровьей сыворотке, последовательно связываются с gE. Эти связанные антитела распознаются антикоровым иммуноглобулиновым конъюгатом. Антитела в этом конъюгате ковалентно связаны с ферментом пероксидазы. Наконец, связанный конъюгат виден при добавлении хромогенного субстрата. Специфичность реакции проверяется проведением той же процедуры с gE-отрицательным контрольным препаратом вместо препарата gE-антигена. На каждом микротитро-

вальном планшете имеются положительные и отрицательные контрольные сыворотки. Тест считается действительным, если положительные сыворотки дают положительный результат в определенном разбавлении. Сыворотка положительна, если ее ОП выше на 0,2, чем у стандартной отрицательной контрольной сыворотки.

c) В соответствии с принципом IDAS, описанным под 2, но после инкубации исследуемой сыворотки вместо конъюгата антикорового иммуноглобулина используется анти-gE MAT/HPPO. Можно использовать сыворотку анти-gE пептида или анти-gE поликлональную сыворотку вместо анти-gE MAT. Планшеты промываются и к каждой лунке добавляется хромогенный субстрат. Приблизительно после 2 часов при комнатной температуре планшеты считываются спектрофотометрически. В каждый планшет включены четыре отрицательных контрольных сыворотки и четыре серийных разведения положительной сыворотки. Сыворотка с величиной ОП менее 50% величины ОП 4-х отрицательных контрольных сывороток, которые исследовались на том же планшете, считается положительной.

В соответствии с принципом блокирующего ферментного иммуносорбентного теста (ELISA), по которому антиген вируса, который может быть очищенным или неочищенным, наносится покрытием на микротитровальный планшет на всю ночь. На этих планшетах исследуемая сыворотка инкубируется примерно один час или больше при 37°C. После процедуры промывания на планшете добавляется анти-gE MAT с последующей инкубацией приблизительно 1 час при 37°C. Вместо анти-gE MAT можно использовать сыворотку анти-gE пептида или анти-gE поликлональную сыворотку. Планшеты промываются и к каждой лунке добавляется хромогенный субстрат. После примерно 2 часов при комнатной температуре планшеты считываются спектрофотометрически. На каждом планшете имеются четыре отрицательные контрольные сыворотки и четыре серийных разведения положительной сыворотки. Сыворотка с величиной ОП менее 50% средней величины ОП 4^х отрицательных контрольных сывороток, которые исследовались на том же планшете, считается положительной.

Во всех указанных выше процедурах может использоваться традиционный культивированный антиген вируса, который содержит gE, а также gE-антиген, который выражен через прокариоты или эукариоты. Как вариант, вместо традиционного антигена в указанных диагностических пробах могут использоваться олигопептиды, основанные на BHV-1 gE последовательности. Кроме того, такие олигопептиды можно использовать для разработки так называемого "коровьего" теста в соответствии с принципом, описанным в статье Kemp и др. Science, 241, 1352–1354, 1988. Такой тест будет основываться на связи антигенной последовательности олигопептида антителами, направленными против gE, присутствующего в зараженных животных. Для такого теста олигопептиды должны быть связаны с MAT, направленными против эритроцитов коров.

Анализ на нуклеиновую кислоту с использованием цепной реакции полимеразы

Олигонуклеотиды (зонды и праймеры) могут, например, использоваться в цепной реакции полимеразы, чтобы различить вакцинированных и зараженных животных. Цепная реакция полимеразы (ЦРП) – технологический прием, посредством которого нуклеиновые кислоты патогена можно в короткое время размножить миллиарды раз (De polymerase kettengreactie. P.F. Hilderiuk, I.A. Wagenaar, I.W.B. van der Giessen и B.A.M. van der leijst, 1990, Tijdschrift voor Diergeneeskunde deel 115, 1111–1117). gE- олигонуклеотиды можно выбирать таким образом, что в gE положительном геноме образуется другой продукт, нежели в gE отрицательном геноме. Преимуществом этого является то, что и животное, которое было вакцинировано вакциной с делецией gE, дает положительный сигнал в тесте на ЦРП. Однако, этот подход зависит от присутствия нуклеиновых кислот вируса в образце, например, крови от животного, на которой проводится тест.

После острого заражения BHV-1 имеется большая вероятность, что BHV-1 специфические нуклеиновые кислоты могут быть продемонстрированы в крови, но еще не определилось, будут ли также демонстрироваться в крови нуклеиновые кислоты BHV-1 во время латентного периода.

Использование BHV-1 в качестве вектора

Для экспрессии гетерологичных генов в BHV-1 геноме необходимо иметь в наличии точную информацию об участке, куда должен вставляться гетерологичный ген. Основные последовательности не должны нарушать структуру, а для экспрессии гетерологичного гена должны быть регуляторные последовательности. Гликопротеин gE-ген является подходящим местом для экспрессии гетерологичных генов. gE-ген не является существенным, следовательно не может быть возмещений по замене gE-гена гетерологичным геном. Как следствие этого, гетерологичный ген может так располагаться, что он будет находиться под влиянием регуляторных последовательностей gE-гена. Однако, нет необходимости использовать регуляторные последовательности gE-гена. Экспрессия гетерологичных генов может контролироваться другими, т.е. более сильными регуляторными последовательностями различных генов. Представляется возможным также лигировать гетерологичный ген к (экспортному) сигнальному пептиду gE-гена, с тем, чтобы повлиять на секрецию продукта гетерологичного гена. Очевидно, что подробное знание гена gE и белка gE дает возможность использовать BHV-1 как вектор достаточно контролируемым образом. Разработанные векторы можно серологически отличить от дикого типа. Создание BHV-1 мутантов, которые экспрессируют гетерологичные гены, можно реализовать таким же образом, что и создание мутантов с делецией gE, показанное в примерах. Однако, тогда фрагменты делеции следует заменить фрагментом, на котором гетерологический ген расположен в местоположении делеции.

Примеры.

1) Изоляция и определение естественного мутанта с делецией gE.

а) Изоляция естественного (природного) мутанта.

Геномная ДНК была изолирована из ряда ослабленных традиционным путем вакцин в соответствии со стандартными способами и проанализирована с использованием рестрикционных ферментов. В частности, мы искали отклонения генома, которые бы подходили, чтобы отличить от вируса BHV-1 дикого типа.

Ослабление было направлено, в частности, на Us участок генома BHV-1, потому что в этом участке – по аналогии с вирусом герпес простой – вероятно располагается ряд генов, кодирующих для несущественных гликопротеинов (Определение гена гликопротеида вируса простого герпеса 1 внутри кластера генов, необязательного для роста в клеточной культуре, R. Longnecker, S. Chatterjee, R.I. Whitley и B. Roizman (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 4303–4307).

Подборка BHV-1 вакцин из Загребского университета, Югославия (Lugovic и др. Veterinarski Arhiv, 55, 241–245, 1985), после большого числа пересевов на эмбриональные почечные клетки коровы и эмбриональные трахеальные клетки коровы (Эбтр), обладала участком отклонения Us, помимо наличия нормального участка Us. Более того, эта вакцина образовывала и большие и малые пятна на Эбтр клетках. Из этой смешанной популяции тремя этапами ограниченного разведения был изолирован вирус с участком Us отклоняющейся формы, с небольшими пятнами в каждом случае. Вирус, изолированный этим путем, исследовался дальше и был назван Difivac-1. Он был депонирован в Институт Пастера, Париж, Франция 27 мая 1992 г, номер депозита 1–1213.

в) Определение делеции в gE-гена в Difivac-1.

Для дальнейшего анализа этого отклонения в Us участке геномная ДНК Difivac-1 была изолирована в соответствии со стандартными методами и подвергнута блот-анализу (фиг. 1А). Гибридизация этого блота фрагментом Hind III К дикого типа, помеченного ³²P подтвердила, что этот фрагмент, расположенный в центре участка Us, короче на 1,0 тысячу пар нуклеотидов (т.п.н.) в Difivac-1. Более того, этим анализом можно было приблизительно определить позицию отсутствующей части (фиг. 1 В). Для дальнейшего анализа этой делеции Us участок BH-1 штамма Lam дикого типа был изолирован и клонирован в прокаримотные векторы. С этой целью в соответствии со стандартными методами геномная ДНК штамма Lam (фиг. 2А) была изолирована и клонирована в векторы pUC18, pACUC и pBP322 (фиг. 2В). Была составлена физическая карта участка вокруг предполагаемой позиции делеции (фиг. 2С). Исходя из этой физической карты, в векторах pKUN 19 и pUC 18 (фиг. 2) были сконструированы субклоны, пригодные для определения последовательности нуклеотидов этой области. Используя эти субклоны, методом Сангера была определена нуклеотидная последовательность двух цепей всей области (показано на фиг. 2С). Эта нуклеотидная последовательность была анализирована с использованием программы PC/ген. Из концептуальной трансляции оказывается, что нуклеотиды (нт) 168–1893 кодируют для открытой рамки считывания 575 аминокислот (фиг. 3А). Дальнейший анализ показал, что эта последовательность аминокислоты имеет харак-

теристики трансмембранного гликопротеина, как показано на фиг. 3В. Факт таков, что эти первые 26 аминокислот (ак) опознаются так типично эукариотный экспортный сигнал и область между ак 423 и ак 450 опознается как трансмембранная область. Кроме того, в этой последовательности оказываются три потенциальных участка N-связанной гликозилиции. Эта предсказанная последовательность аминокислоты демонстрирует близкое сходство с gE-геном гликопротеина вируса простого герпеса (HSV); см. фиг. 4А и 4В. Эти и другие сходства оправдывают вывод, что найденный ген является gE гомологом BHV-1. По этой причине ген называется gE. Чтобы определить, до какой степени этот BHV-1 gE-ген отсутствует в Difivac-1, был изолирован р318 фрагмент. Фрагмент р318 начинается на Alu I участке 55 нт до требуемой открытой рамки считывания BHV-1 gE и заканчивается 133 нт за ней. Геномная ДНК Difivac-1 анализировалась этим р318 фрагментом с использованием блот-гибридизации. Это выявило, что Difivac-1 не содержит р318 обнаруживаемых последовательностей (фиг. 5). Этот эксперимент подтвердил, что Difivac-1 содержит делецию и четко продемонстрировал, что эта делеция проходит по всему gE гену.

Чтобы определить размер и позицию участка делеции, геномные последовательности, охватывающие U_s регион Difivac-1, были клонированы в прокариотные векторы. См. фиг. 11С. фрагмент с 14.5 т.п.н. был клонирован в АСУС вектор и назван р775. Hind III фрагмент в 7.4 т.п.н. был независимо клонирован в рUC18 вектор и назван р728 были изолированы два субклона: фрагмент Pst I с 1.4 т.п.н. в клоне р737 и фрагмент Alu I – Pst I в клоне р754 с 350 т.п.н. Анализ рестрикционного фермента и блот-анализ этих клонов (данные не показаны) продемонстрировали, что делеция gE в Difivac-1 составляет длину 2,7 т.п.н., начиная сразу от 5' с gE гена и кончая на границе U_s участка. Эти 2,7 т.п.н. были замещены дублированием одного сегмента в 1 т.п.н., расположенного в участке U_s напротив gE-гена. См. фиг. 11В. Чтобы подтвердить результаты этого анализа и определить точную точку рекомбинации, нуклеотидная последовательность большинства вставок клона р754 определялась и сравнивалась с последовательностями дикого типа. См. фиг. 12. Этот анализ показал, что точка рекомбинации расположена у 77 пары основания (по) верх от начального клона gE-гена.

с) Оценка безопасности и эффективности Difivac-1

Difivac-1 был опробован на семинедельных телятах, свободных от BHV-1 серонегативного специфического патогена. Восемь телят были вакцинированы через нос 10^5 TCID₅₀ в 2 мл, из которых по 1 мл распылялось в каждую ноздрю. Восемь семинедельных телят, свободных от BHV-1 серонегативного специфического патогена помещались в изоляции, им вводилось в нос 2 мл среды культуры и они служили невакцинированными контрольными животными. Через пять недель после вакцинации вакцинированным и контрольным телятам капали в нос 10^7 TCID₅₀ очень вирулентный штамм Iowa BHV-1. Шесть недель спустя после контрольного заражения всем теля-

там вводился внутримышечно дексаметазон в течение 5 дней, чтобы реактивировать предполагаемый латентный вирус. Клинические проявления, ректальные температуры и рост организма находились под контролем. Вирус изолировался из носовых мазков, и в сыворотке были определены титры нейтрализующего антитела.

После вакцинации поведение, аппетит, ректальные температуры и скорости роста телят оставались нормальными, но у вакцинированных телят наблюдались некоторые серьезные выделения из носа и повышенное слюноотделение. Нарушений в слизистой оболочке носа не наблюдалось. После вакцинации из носовых мазков выделялся Difivac-1 (фиг. 17). Все вакцинированные телята вырабатывали нейтрализующие антитела по отношению к BHV-1.

После контрольного заражения все невакцинированные контрольные телята проявляли апатию, потерю аппетита, выделения из носа и глаз, покраснение десен нижней челюсти, сильные нарушения в слизистой оболочке носа в течение 14 дней после контрольного заражения и остановку роста в течение 4 дней. У вакцинированных телят были небольшие, быстро заживающие повреждения слизистой носа и не было остановки роста. Ежедневные клинические проявления, ректальная температура и развитие роста даны на фиг. 18, 19 и 20. После контрольного заражения все телята выделили вирус через нос, но количество и период вирусного выделения были заметно снижены у вакцинированных телят (фиг. 21). Вторичная реакция антитела, развившаяся у вакцинированных и невакцинированных телят выработала антитела после заражения.

После реактивации вирус контрольного заражения был изолирован от одного вакцинированного теленка и от 5 невакцинированных телят. Difivac-1 нельзя было реактивировать.

Данные результаты демонстрируют, что Difivac-1 не вызывал какого-либо признака заболевания у молодых телят и не подвержен реактивации. Difivac-1 значительно снизил силу заболевания и количество выделения вируса после контрольного заражения.

В заключение можно сказать, что Difivac-1 является безопасной и эффективной вакциной для использования в вакцинации животных против заражений BHV-1.

2). Построение рекомбинантных мутантов с делецией gE вируса BHV-1.

Чтобы иметь в распоряжении BHV-1 вакцины со способностью дифференциации, которые молекулярно определены лучше, чем Difivac-1, и, которые при желании могут содержать делецию например, в гене тимидинкиназы в дополнение к делеции в gE-гене, как дополнение к Difivac-1, были построены рекомбинантные мутанты с делецией gE. Начиная с определенной позиции гликопротеин gE-гена и используя клонированные ДНК фрагменты, которые фланкируют gE-ген, можно построить фрагмент делеции gE. С использованием стандартной техники (F.L. Graham and van der Eb. 1973, Virology, 52, 456–467), можно рекомбинировать этот фрагмент делеции в геноме штамма BHV-1 дикого типа, что дает мутант с делецией gE.

а) Построение фрагмента с делецией gE.

Для построения фрагмента с делецией gE выбирался фрагмент, у которого с одной стороны, не доставало полной gE последовательности, и, с другой стороны, который содержал достаточную фланкирующую последовательность, чтобы позволить рекомбинацию с геномом дикого типа. Был выбран ген на 5' (вверх) стороне, фрагмента 1.2 т.п. Pst I – Asu II, который заканчивается 18 нт до начального кодона gE. Для 3' (вниз) фрагмента был выбран фрагмент 1.2 т.п.н. EcoN I – Dsa I, который начинается от 2 нт до остановочного кодона gE-гена (фиг. 6).

Для построения фрагмента с делецией gE фрагмент в 1.4 т.п.н. Pst I – Sma I от 8.4 т.п.н. Hind III к фрагмента штамма lam BHV–1, расположенного на 5' стороне gE-гена, был субклонирован в Sma I и Pst I участок плазмиды pUC18. Этот клон был назван p515. EcoN I – Sma I фрагмент, расположенный на 3' стороне gE и исходящий от 4.1 т.п.н. Hind III – EcoRi клон, был клонирован в уникальный Asu II участок p515. Таким образом построение фрагмента с делецией gE было завершено и построенный клон был назван p519. Хотя в принципе всю вставку Pst I – Sma I p519 можно было использовать как фрагмент с делецией gE, это нежелательно. Дело в том, что Pst I – Sma I имеет протяженность приблизительно 100–150 пар оснований (по) в повторяющуюся последовательность, которая фланкирует U_s участок. Этот кусок в 100–150 по может рекомбинироваться с повторяющейся последовательностью на другой стороне U_s области, где не расположен gE-ген, и поэтому может дать нежелательные продукты рекомбинации. По этой причине для эксперимента рекомбинации был выбран Pst I – Dra I фрагмент, так что 100 по повтора удалены.

в) Рекомбинация фрагмента с делецией gE с геномом BHV–1 дикого типа.

Чтобы осуществить рекомбинацию между построенным фрагментом с делецией gE и геномом BHV–1 дикого типа, микрограммовые количества двух молекул ДНК вместе трансфицируются на эмбриональные трахеальные клетки коровы (Эбтр) в соответствии со стандартным методом F.L. Graham и A.I. van der Eb. (1973, Virology, 52, 456–467). Механизмы клеточной рекомбинации обеспечивают рекомбинацию небольшого процента молекул ДНК (2–4%), которые включены в клетки. Для выбора рекомбинированных мутантов с делецией gE, вирусная смесь, сформированная после трансфекции, рассеивается на свежую клеточную культуру Эбтр. В большинстве случаев отдельные популяции вируса, которые развиваются, (пятна), берут начало от одного вируса. Для изоляции мутантов BHV–1 штамма lam с делецией gE были изолированы 230 из этих пятен (бляшек) и исследованы в соответствии со стандартными иммунологическими методами с помощью специфических моноклональных антител BHV–1 (MAT), которые не реагируют с зараженными клетками Difivac-1. Эти MAT направлены против гликопротеина gE. Пять из 230 бляшек не реагировали с этими MAT. ДНК этих 5 бляшек исследовалась дальше.

с) ДНК анализ построенных мутантов с делецией gE штамма lam BHV–1

ДНК препараты 3^x (1B7, 1B8, 2H10) вышеупомянутых 5 кандидатов мутантов с делецией gE исследовались далее с использованием стандартной техники блот-анализа (Sambrook и др. 1989). Двойное переваривание этих препаратов ДНК с помощью Pst I и Dra I с последующим гелевым электрофорезом и блот-гибридизацией фрагментом делеции Pst I – Dra I в 2.3 т.п.н. в качестве зонда показали, что gE-ген генома вирусных популяций 1B7 и 1B8 точно удален желаемым образом; см. фиг. 7A и 7B. Популяция 2H10 имеет Pst I – Dra I фрагмент отклонения. Блот-гибридизации с E-специфическим зондом показывают, что ни в одном из трех препаратов ДНК не располагаются gE последовательности (результаты не показаны). Популяции 1B7 и 1B8 вируса BHV–1 являются предполагаемыми рекомбинантными мутантами с делецией gE. Популяция 1B7 вируса BHV–1 тестировалась на свойства вакцины.

d) Построение мутантов с двойной делецией тимидинкиназы/gE.

Поскольку BHV–1 рекомбинантные мутанты с делецией только в одном гене могут быть недостаточно сниженной вирулентности, делеции также предусмотрены в гене тимидинкиназы (TK) BHV–1 штаммов lam и Harberink. Эти мутанты были построены аналогично используемым для вышеупомянутых мутантов с делецией gE (результаты не показаны). Эти мутанты с делецией TK использовались для построения мутантов с двойной делецией TK/gE.

e) Построение мутантов с двойной делецией гликопротеин gl/гликопротеин gE.

Поскольку скот, вакцинированный мутантом с одной делецией gE может выработать анти-gl антитела, которые могут помешать обнаружению анти gl/gE антител (обсуждается ниже), мы также изобрели вакцину с двойной делецией gl/gE. Такой мутант с двойной делецией gl/gE может быть построен с использованием тех же процедур, которые использовались для построения мутанта с одной делецией gE. Анализ частично нуклеотидной последовательности верхнего конца от фрагмента 1.8 т.п.н. Pst I – который охватывает 5' конец gE-гена – выявил открытую рамку считывания со значительной гомологией по отношению к gl гомологам, найденным в других вирусах герпеса. См. фиг. 13 и 14. Используя Sma I – Pst I фрагмент с 350 по, которых охватывает предполагаемый 5' конец gl-гена и фрагмент EcoN I – Sma I, расположенный вниз от gE-гена, можно построить фрагмент делеции gl/gE. Этот фрагмент можно рекомбинировать с геномом дикого типа, чтобы получить мутант с делецией gl/gE вируса BHV–1. См. фиг. 16. 80–90 аминокислот, которые еще можно теоретически получить, не смогут выявить антитела, которые могут помешать обнаружению анти-gl/gE антител. Дальнейший анализ последовательности gl-гена позволит создать делецию gl, которая охватывает полную область кодирования gl. Этот мутант с двойной делецией gl/gE был назван Difivac-1E.

Оценка безопасности и эффективности мутантов LamgE[–], и LamgE[–], TK[–]

Свойства вакцины мутантных штаммов LamgE[–], и LamgE[–], TK[–] BHV–1 тестировались на семинедельных серонегативных свободных от

специфических патогенов телятах. Каждый мутантный штамм распылялся в нос 6 телятам. Каждому теленку давалась общая доза 10^5 TCID₅₀ в 2 мл среды культуры, из которых 1 мл распылялся в каждую ноздрю. Еще 6 телятам в нос распылялась среда культуры, свободная от вируса, и это были контрольные невакцинированные телята. Спустя 5 недель после вакцинации все телята, вакцинированные и контрольные, заражались через нос 10^7 TCID₅₀ высоко вирулентным штаммом Iowa BHV-1. После вакцинации и после контрольного заражения контролировались клинические проявления, ректальная температура и вес тела. Брались мазки из носа на определение числа дней выделения вируса из носа.

После вакцинации поведение, аппетит, ректальная температура и рост телят оставались нормальными. У всех вакцинированных телят наблюдались сильные носовые выделения и небольшие нарушения слизистой носа. Вирус можно было изолировать из носа вакцинированных телят приблизительно за 7 дней (таблица 1).

После контрольного заражения все невакцинированные контрольные телята проявляли апатию, потерю аппетита, выделения из носа и глаз, покраснение десен нижней челюсти, сильные нарушения слизистой носа и снижение темпа роста. У телят, вакцинированных LamgE⁻, ТК⁻ у всех наблюдались выделения из носа и небольшое раздражение слизистой носа. Не у всех телят, вакцинированных LamgE⁻ развивались выделения из носа или нарушения слизистой оболочки. У вакцинированных телят не наблюдалось апатии, потери аппетита или других клинических симптомов заболевания. Ректальная температура, рост и клиника после контрольного заражения показаны на фиг. 22, 23 и 24. Невакцинированные телята выделяли вирус из носа в 2 раза дольше вакцинированных (таблица 1).

Указанные результаты демонстрируют, что штаммы мутантов LamgE⁻ и LamgE⁻, ТК⁻ BHV-1 практически не вызывают каких-либо клинических признаков заболевания в молодых телятах. Оба мутантных штамма остановили проявление болезни после контрольного заражения и снизили период выделения вируса через нос на 50%.

Мутантные штаммы LamgE⁻ и LamgE⁻, ТК⁻ вируса BHV-1 безопасны и эффективны для использования в качестве вакцины для животных против заражений BHV-1.

3) Прокариотная экспрессия gE.

Для прокариотной экспрессии gE-гена гликопротеина BHV-1 до сих пор использовались векторы экспрессии pGEX (D.B. Smith и K.S. Johnson, Ген 67 (1988) 31–40). Код векторов PGEX для глутатион S-трансферазы (GST) белка-носителя от *Schistoma japonicum*, которая находится под влиянием промотора, который индуцируется для экспрессии изопропилтиогалактозидом (IPTG). Примером белка слияния GST-gE является продукт построения pGEX-2T600S3 (фиг. 8A). В этой конструкции с использованием стандартной молекулярно-биологической техники (Sambrook и др. 1989), за GST геном был лигирован Sma I фрагмент на 600 по, который кодирует для N-терминального участка в 200 аминокислот gE белка. Эта конструкция предполагается быть в утроенном варианте, и с

каждым разом к GST лигируется фрагмент на 600 по с разной рамкой считывания. Все эти конструкции были введены в штамм DH5 *Escherichia coli*, индуцированный IPTG и сформированные белки были перенесены на нитроцеллюлозу после электрофореза полиакриламидным гелем посредством блотирования (wiester blatteng). Иммунологическое обнаружение с помощью анти-GST продемонстрировало, что только правильная рамка считывания (№ 3), которая кодирует для участка gE белка, ведет к экспрессии четкого белка слияния предполагаемого размера в 27к (GST) + 20к (gE) = 47к. Три из МАБ, изолированные нами, которые не реагируют с Difivac-1, опознают 47 кД GST – gE белок слияния в блоте; см. фиг. 8B.

4) Эукариотная экспрессия гликопротеин gE-гена.

Для эукариотной экспрессии гликопротеин gE-гена заранее выбирается вектор pEVHIS. Вектор pEVHIS в качестве эукариотного маркера имеет кодирование HISD гена для гистидинолдегидрогеназы [EC 1.1.1.23] (C. Hartmann и R. Mulligan 1988, Proc. Natl Acad. Sci США, 85, 8047–8051), которая заставляет клетки перенести токсическую концентрацию гистидинола в 2.5 mM. Вектор также включает регион промотора непосредственного раннего гена человеческого цитомегаловируса (HCMV), с уникальными участками рестрикционного фермента, расположенными за ним. Для создания вектора экспрессии pEVHIS/gE использовался фрагмент, включающий целый кодирующий регион гликопротеид gE-гена. Он начинается на Alu I участке 55 по до предполагаемой открытой рамки считывания gE и кончается на 133 по за ней. Этот регион был клонирован за HCMV промотором вектора pEVHIS, в результате чего была получена конструкция pEVHIS/gE (фиг. 9). pEVHIS/gE был амплифицирован в клетках *E.coli* DH5d и очищен посредством градиента хлорида цезия (Sambrook и др., 1989). Эта очищенная ДНК была трансфицирована на BaLb/C-3T3 в соответствии с методом Graham и van der Eb. Трансформированные клетки отбирались гистидинолом, с тем, чтобы изолировать потом двадцать устойчивых к гистидинолу колоний. Эти колонии исследовались MAT 81 посредством иммунной реакции монослоя пероксидазы (IPMA). В четырех колониях был выражен gE белок. Из этих четырех колоний 3T3 gE клон 9 использовался, чтобы изолировать субклон с высокой gE экспрессией. Клон, изолированный этим методом, (названный 3T3 gE 9.5) использовался для характеристики кандидата в анти-gE моноклональные антитела.

5) Эукариотная экспрессия и BHV-1 гликопротеина gE, и BHV-1 гликопротеина gI в той же клетке.

Чтобы экспрессировать BHV-1 гликопротеин gI в той же клетке, что и BHV-1 гликопротеин gE, мы вначале определили предполагаемую позицию гена BHV-1 gI. Поскольку ген gI гликопротеина вируса простого герпеса располагается непосредственно выше от gE-гена гликопротеида, было предположено, что ген BHV-1 будет располагаться на соответствующей позиции. Чтобы проверить это, определялась последовательность региона в 283 нуклеотида, расположенных у 1 т.п.н. вверх от начала гена gE BHV-1. Концептуальная трансляция

этого региона показала, что вторая рамка считывания кодирует для последовательности 94 аминокислот, которая гомологична гликопротеину gI вируса простого герпеса (фиг. 13 и 14). Поскольку гомологичный сегмент находится на протяженности 80 аминокислот от начального кодона, предполагаемое начало открытой рамки считывания gI-гена BHV-1 находится приблизительно у 250 нт вверх от региона последовательности. Из этого следует, что фрагмент Sma I в 1.7 т.п.н., который начинается от 400 нт вверх от региона последовательности, и заканчивается в гене gE, содержит полный кодирующий регион gI-гена BHV-1. Этот Sma I фрагмент в 1.7 т.п.н. был клонирован в эукариотный вектор MSV-нео (см. фиг. 15). Этот вектор содержит сильный промотор вируса мышиной саркомы и селекторный ген нео, который кодирует для устойчивости против антибиотика G-418 сульфат Генетицина. Полученная конструкция MSV нео GI была амплифицирована в DH5d клетках E.coli и была трансфицирована в 3T3 gE 9.5 клетки с использованием метода Graham и van der Eb. Трансфицированные клетки отбирались с помощью среды культуры 400 мкг генетицина/мл и устойчивые колонии были изолированы и тестировались кандидатом анти-gE MAT, который не реагировал с 3T3 gE 9.5 клетками. Из этого мы отобрали клон, который реагировал, например, с MAT 66, как реагирует BHV-1 дикого типа.

6) Характеристика кандидата анти- gE MAT.

Были получены MAT против BHV-1 дикого типа и отобраны по их неспособности реагировать с эмбриональными трахеальными клетками коровы (Эбтр), инфицированными Difivac-1. Эти MAT исследовались на их реактивность с

- а) мутантом с делецией LamgE⁻;
- б) вышеописанным продуктом прокариотной экспрессии в блоте;
- в) вышеописанным gE-экспрессирующими Balb/c-3T3 клетками;
- г) клетками, упомянутыми под с/ и зараженными Difivac-1, и
- е) Balb/c-3T3 клетками, экспрессирующими gE/gI комплекс.

Для тестирования на реактивность под а, с, d и е использовалась иммунная реакция монослоя пероксидазы (IPMA). Результаты в таблице 2 показывают, что мы получили MAT, которые направлены против Е (номеров 2, 3, 4, 52, 66, 68, 72 и 81) и MAT (номера 1, 51, 53, 67, 75 и 78), которые могут быть направлены против конформационных антигенных доменов на gE/gI комплексе. Завершение IPMA для нанесения на карту антигенных доменов, опознанных различными MAT показало, что, по меньшей мере, 4 антигенных домена присутствуют на гликопротеине gE, и что один домен вероятно сформирован комплексом gE/gI. Таблица 2.

Обнаружение анти-gE антител у скота, зараженного BHV-1.

Чтобы определить, присутствуют ли в сыворотке зараженного скота антитела против gE, было проведено непрямоое блокирование IPMA 16 кандидатами gE-MAT и следующими 8 отобранными сыворотками:

- 2 сыворотками коров, вакцинированных Difivac-1 и зараженных контрольно вирулетным

штаммом Iowa, которые забирались 14 дней спустя после контрольного заражения;

- 2 сыворотками коров, экспериментально зараженных подтипом 1 вируса BHV-1, которые забирались 20 месяцев спустя после заражения. Одна из коров заражалась подвержением контакту;

- 2 сыворотками коров, экспериментально зараженных подтипом 2в вируса BHV-1, которые забирались 20 месяцев спустя после заражения. Одна из коров заражалась от контакта;

- сывороткой теленка, свободной от специфического патогена, который был вакцинирован ts мутантной вакциной и спустя 3 недели заражался подтипом 2в вируса BHV-1, сыворотка забиралась через 7 недель после контрольного заражения;

- сывороткой гнотобиотического теленка, вакцинированного мутантной вакциной и зараженного 3 недели спустя подтипом 2в вируса BHV-1, сыворотка забиралась через 7 недель после контрольного заражения.

Таблица 2 показывает, что все эти сыворотки содержали антитела против антигенных доменов III и IV на gE, и против антигенного домена I, который вероятно расположен на комплексе gE/gI. Мы можем сделать вывод, что gE является подходящим серологическим маркером для различения между зараженным BHV-1 и вакцинированным скотом.

7) Обнаружение нуклеиновых кислот BHV-1 посредством ЦРП процедуры с использованием gE-специфических праймеров BHV-1.

Начиная с определенной нуклеотидной последовательности gE-гена BHV-1, была выбрана пара праймера, подходящая для ЦРП с использованием программы селекции праймера Lowe и др. (Rowe, I. Sharefkin. S. Ai Jand и C.W. Dieffenbach, 1990, nucleic Acids Res. 18, 1757–1761). Эти праймеры были названы P₃ и P₄ и показаны на фиг. 10. Праймеры располагаются на 159 нт в обе стороны и обеспечивают амплификацию фрагмента 200 нт. Используя праймеры P₃ и P₄ и изолированную ДНК BHV-1, были оптимизированы условия для процедуры ЦРП. Они включали, в частности, варьирование концентрации MgCl₂, концентрации глицерола и условий циклов. Оптимальный подобранный буфер для использования P₃ и P₄ для амплификации ДНК BHV-1 – 10 mM Трис pH 8.0, 50 mM KCl, 0.01% желатин, 2.6 mM MgCl₂ и 20% глицерол. Оптимальные циклические условия (Perkin Elber Cetus DNA Thermal Cycler) для циклов 1–5: 1 мин. 98°C, 30 сек. 55°C и 45 сек. 72°C и для циклов 6–35: 30 сек. 96°C, 30 сек. 55°C и 45 сек. 72°C. После амплификации ЦРП полученный фрагмент ДНК в 200 нт был подвергнут электрофорезу на 2% агарозном геле, блотирован на нитроцеллюлозе и затем подвергнут блот-анализу. Проба, помеченная ³²p dCTP, используемая для блот-анализа, была фрагментом TagI 137 по, который располагался между связующими участками праймера (фиг. 10). После автордиографии гибридизированных фильтров можно наблюдать полосу в 200 по. С помощью этого пути амплификация только 10 BHV-1 геномов (приблизительно 1.5 x 10⁻¹⁵ мкг ДНК) ведет к хорошо обнаруживаемому сигналу (результат не показан). Аналогичным образом была разработана процедура ЦРП с использованием

праймеров, которые основаны на кодирующей последовательности гликопротеида g III BHV-1 (D.R. Fitzpatrick, Babink, Zamb, 1989, Virology, 173, 46–57). Для различения между ДНК BHV-1 дикого типа и вакцинной мутанта с делецией gE. Образцы ДНК были оба подвергнуты анализу gE-специфической ЦРП и g III-специфической ЦРП. В такой пробе препарат ДНК Difivac-1 был выявлен как g III положительный и gE отрицательный.

Поскольку обнаружение ДНК BHV-1 в бычьей сперме было бы важно для BHV-1 специфической процедуры ЦРП, была сделана попытка провести gE-специфическую ЦРП на бычьей сперме, зараженной BHV-1. Однако, неизвестные компоненты в сперме обладают сильным тормозящим действием на цепную реакцию полимеразы (ЦРП). Поэтому была разработана процедура изоляции ДНК BHV-1 от бычьей спермы. Чтобы изолировать ДНК от бычьей спермы, 30 μ л спермы инкубировалось 1 мг/мл протеиназы K (пК) в общем объеме 300 μ л 0.15M NaCl, 0.5% Na-Sarkosil и 40 mM ДТТ при 60°C. После 1 часа образец охлаждался до комнатной температуры и добавлялось 300 μ л 6M NaI и образец инкубировался 5 минут. Из этой смеси ДНК изолировалась стандартной экстракцией хлороформ/изоамилаэтанол и осаждалась 1 объемом изопропанола. Осадок промывался 2.5 M NH₄Ac/70% этанолом и повторно суспендировался в 10 mM Трис pH 7.4, 1 mM ЭДТК, 0.5% Tween 80 и 0.1 мг/мл пК для второй инкубации в течение 1 часа при 60°C. Этот препарат ДНК можно было непосредственно подвергать цепной реакции полимеразы.

Описание чертежей.

Фиг. 1

Блот-анализ (Southern blot) штаммов BHV-1 Difivac-1 и Iowa

А. Авторадиограмма блота Difivac-1 и Iowa геномной ДНК.

В дорожках 1 и 3 ДНК Difivac-1 применялась после переваривания рестрикционного фермента Hind III и Pst I, соответственно. В дорожках 2 и 4 ДНК Iowa применялась после переваривания рестрикционного фермента Hind III и Pst I, соответственно. Размер фрагментов указан в тысячах пар нуклеотидов (т.п.н.).

Вирусная ДНК изолировалась центрифугированием среды культуры (70 мл) роллер-флакон в 450 см²/с Эбтр клетками, зараженными вирусом в течение 2 часов через 25% (вес/вес) сахарозную подушку, в 10 mM Трис pH 7.4, 150 mM NaCl и 1 mM ЭДТК при 20 тыс. об/мин в SW 27 роторе ультрацентрифуге Бекмана L5-65. Из полученной таким образом гранулы вируса ДНК изолировалась в соответствии со стандартными методами (I. Sambrook, Fritsch и T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: Lab. Man, 2-е изд. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). На этой ДНК переваривание рестрикционного фермента проводится ферментами из Boehringer Mannheim в SURE (разрывными буферами, поставляемыми производителем).

После отделения на 0.7% агарозном геле для горизонтального электрофореза и блотирования на нитроцеллюлозном фильтре (Schleicher & Schuell) фильтр предварительно гибридизировался 6 часов при 42°C в 50% формамиде, 3 x SSC

(1 x SSC = 0.15 M NaCl и 0.015 M Na-цитрата, pH 7.4), ДНК 50 μ л денатурированной спермы лосося (Sigma) мл и 0.02% альбумина бычьей сыворотки, 0.02% поливинил пирролидона и 0.02 фикола и 0.1% α -додецилсульфата (SDS). Затем гибридизация проводилась добавлением к тому же раствору Hind III K фрагмента, помеченного ³²p dCTP (Выбор Hind III K фрагмента основывался на: Клонировании и расщеплении участка на карте ДНК от коровьего герпеса вируса 1 (Штамм Купера) John F. Wayfield, Peter L. Good, Holly I. Vanoort Aephonso R. Campbell и David A. Reed, Journal of Virology № 1983 (259–264). После 12–14 часов гибридизации фильтр промывался 2 часа в = .1% SDS и 0.1% x SSC (растворе хлорида и цитрата натрия) при 60°C. Hind III K фрагмент клонировался в pUC18 вектор в соответствии со стандартными процедурами клонирования (Sambrook, Fritsch Maniatis 1989, Molecular Cloning: Lab. Manual, Inc. 2-е изд. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. – York. После переваривания Hind III клон Hind III K pUC18, вектор вновь был отделен от Hind III K фрагмента электрофорезом на 0.7% агарозном с низкой температурой плавления) BRL, Life Technologies, геле, и изолирован от агарозы стандартной фенольной экстракцией и этаноловым осаждением. Изолированный Hind III K фрагмент был помечен меткой произвольной затравки ДНК Kit 1004.760 от Boehringer Mannheim. Авторадиография гибридизированных фильтров проводилась с экспозицией 36 часов пленкой Kodak XAR при -70°C с использованием отражательного экрана.

В. Физические карты Hind III K фрагмента Iowa в 8.4 т.п.н. и Hind III фрагмента в Difivac-1 в 7.4 т.п.н. Ввиду комиграции Pst I фрагментов в 6 т.п.н. и отсутствия Pst I фрагмента в 1.8 т.п.н. в Difivac-1, делеция должна происходить в заштрихованной области.

Фиг. 2

Субклонирование фрагментов BHV-1 дикого типа вокруг региона без Difivac-1

В А показаны компоненты генома HBV-1: Уникальный длинный регион (U_L); Уникальный короткий регион (U_S) и два повтора (I_L и T_V). Эта карта основана на опубликованном анализе штамма Купера (John F. Wayfield P.I. Good, Holly I. Vanoort, A.R. Campbell и David A. Reed, Journal of Virology (1983) 259–264).

В В показаны фрагменты из региона U_S, которые были клонированы в прокариотные векторы: фрагмент EcoR I в 15.2 т.п.н. в pACYC, фрагмент Hind III в 8.4 т.п.н. в pUC18 и фрагмент EcoR I – Hind III в 2.7 и 4.1 т.п.н. в pBP322. Изоляция вирусных фрагментов ДНК проводилась в соответствии с процедурами, которые упомянуты в надписях фиг. 1А. Клонирование этих фрагментов в различные векторы проводилось в соответствии со стандартными процедурами (J. Sambrook, E.F. Fritsch и T. Maniatis 1989. Molecular Cloning: лабораторный протокол, 2-е изд. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. – York).

В С показана физическая карта региона, где локализуется предполагаемая делеция в Difivac-1.

В D указаны некоторые субклоны этого региона, которые использовались для дальнейшего анализа. Два Pst I фрагмента клонировались в pKUN 19 и остальные фрагменты в pUC18.

Фиг. 3

А: Нуклеотидная последовательность 2027 нуклеотидов из U_s региона штамма Lam BHV-1 вокруг предполагаемого местоположения, которое было делегировано в Difivac-1, как показано на фиг. 2С [от участка опознавания AluI на крайнем левом до участка опознавания Hinc II на крайнем правом. Нуклеотидная последовательность во вставках субклонов, показанных на фиг. 2, была определена анализом на двух нитях с использованием метода дидеокси последовательности Sanger и др. (F. Sanger, S. Nicklen и Coulson, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463–5467). С этой целью использовались процедуры T7 последовательности Pharmacia в соответствии с процедурой, определенной производителем. Для радиоактивной пометки был использован [35 S] ATP (Amersham). Анализ последовательности регионов с газовой хроматографией (ГХ) с артефактами сжатия повторялся с 7-деаза-dGTP вариантом процедур Pharmacia. Указанная ниже нуклеотидная последовательность в трехбуквенном коде, представляет собой последовательность (ак) аминокислоты открытой рамки считывания остатков 575 ак, которая была выявлена после концептуальной трансляции нуклеотидной последовательности. Эта трансляция основана на универсальном коде и была определена с использованием компьютерной программы PC /Ген/ версия 1.03 PC/ген, ноябрь. 1987. Эта открытая рамка считывания 575 ак начинается с метионина на нт 168 и заканчивается останавливающим кодоном на нуклеотиде 1893.

Структурный анализ открытой рамки считывания остатков 575 ак также проводился компьютерной программой PC/ген. Первые 26 ак образуют эукариотный экспортный сигнал, показанный на фиг. "сигнальным пептидом". Со счетом 6.2 расщепление последовательности этого сигнала предполагается между ак 26 и 27. Последовательность 575 ак имеет 3 возможных участка N-связанной гликозилиции (NXT/S), указанных линией под остатками аминокислоты. В соответствии с методом Rao и Argos между ак 423 и ак 450 имеется трансмембранный регион, показанный на фиг. "трансмембранным витком". Последовательности опознавания (участки) для рестрикционных ферментов Asu II, Sma I, Hind III и EcoRI подчеркнуты. Рассчитанный молекулярный вес этого полипептида – 61212.

В: Схематическое представление структурных характеристик открытой рамки считывания вышеупомянутой 575 ак.

Фиг. 4

Аминокислотное сравнение последовательности аминокислоты gE-гена BHV-1 с последовательностью аминокислоты gE-гена вируса простого герпеса (ВПГ) и другими E гомологичными генами gl вируса pseudorabies и др. I varicella – zoster (VZV). – Последовательности, используемые для этого сравнения, брались из следующих публикаций: HSV: Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes Simplex virus type I D.I. Me Geoch, A. Dolan, S. Donald и F.I. Rixon (1985) Journal Mol. Biol. 181, 1–13. VSV: DNA Sequence of the U_s component of the varicella – zoster virus genome. A.J. Davidson

(1983), EMBO Journal 2,2203–2209. PRV: use of Agt II to usalate genes for 2 ps. ralus v. grey coprotoid, Petnovskis и др. (1986) J. of Virology 60, 185–193]. Эти последовательности сравнивались с использованием программы анализа последовательности Multalin/Corpet, 1988, Nucl. Acids Res. 16, 10881–10890).

На А показана диаграмма, на которой все последовательности четырех аминокислот показаны схематически. Здесь предсказанные трансмембранные части (ТМ) показаны друг под другом. Кроме предсказанных экспортных сигнальных последовательностей и возможных N-связанных участков гликозилиции (1) показаны две законсервированные области, в которых относительная позиция остатков цистеина часто остается неизменной (С С С).

В В показаны результаты Multalin сравнения центрально расположенного региона, богатого цистеином, четырех версий gE. Звездочки показывают идентичные аминокислоты и двоеточия аналогичные аминокислоты.

Фиг. 5

Рисунок фотографий, полученных в блот-анализе Difivac-1.

Панель А: Геномные ДНК перевариваний рестрикционного фермента Difivac-1 и Iowa помощью Bst I (1, 2), EcoPI (3, 4), и Hind III (5, 6), отделенные на 0.7% агарозном геле, блотированные на нитроцеллюлозе и гибридизированные Hind III К фрагментом с пометкой 32 P штамма Lam BHV-1, в соответствии с процедурами, определенными в надписях Фиг. 1А.

Панель В: Нитроцеллюлозный блот того же геля, что и в А, гибридизированного gE-специфическим зондом p318 BHV-1. Этот зонд включает целый Alu I – Hinc III регион, показанный на фиг. 2С.

Фиг. 6

Построение фрагмента BHV-1 с gE делецией

В А показана позиция gE-гена и используемых клонов. Компонентами генома BHV-1 являются: Уникальный длинный (U_L) регион; Уникальный короткий (U_S) регион и два повтора (IP и TP). Чтобы получить регион, расположенный на 5' стороне gE-гена, Pst I – Sma I фрагмент в 1.4 т.п.н. от Hind III К фрагмента BHV-1 в 8.4 т.п.н. штамма Lam был субклонирован в участок Sma I и Pst I плазмиды pUC18. Этот клон был назван p515 и он показан в В. EcoN I – Sma I фрагмент, расположенный на 3' стороне gE, исходящий из Hind III – EcoR I клона в 4.1 т.п.н., был клонирован в уникальный AUSII участок p515. Чтобы сделать возможным лигирование остатка EcoN I к остатку ASUII, клон p515 был переварен ASII, затем обработан ферментом Кленова (Boehringer Mann) и dCTP, чтобы получить один цитозинный остаток в остальной части ASUII (Sambrook и др. 1989). Этот дополнительный цитозин показан звездочкой в D. Затем p515 был также переварен ферментом Sma I, после чего EcoP I фрагмент можно было лигировать в этот вектор. Построенный таким образом клон был назван p519.

Фиг. 7

А. Рисунок фотографий, полученных в блот-анализе препаратов ДНК 1B7, 1B8 и 2H10. Изоля-

ция ДНК, переваривания рестрикционного фермента, блотирование и гибридизация были проведены в соответствии с процедурами, описанными на фиг. 1А. После двойного переваривания препаратов ДНК 1В7, 1В8 и 2Н10 с помощью Pst I – Dra I, фрагменты были отделены на 0.7% агарозном геле и затем блотированы на нитроцеллюлозном фильтре. Этот фильтр гибридизировался ³²p dСТР, помеченный в качестве зонда фрагментом делеции Pst I – Dra I в 2.3 т.п.н. В рядах 1–3 соответственно были отделены 1В7, 1В8 и 2Н10. В ряде 4 применялась ДНК BHV–1 дикого типа штамма Lam и в ряде 5 – фрагмент делеции в 2.3 т.п.н.

В. Физическая карта EcoP I фрагмента штамма Lam BHV–1 в 15.2 т.п.н. Карта показывает позицию участка опознавания Pst I, Dra I и Hind III и позицию зонда гибридизации, упомянутого в 7А.

Фиг. 8

Прокариотная экспрессия gE BHV–1

Для прокариотной экспрессии gE BHV–1 фрагмент Sma I gE-гена в 600 по был слит в трех рамках считывания с кодирующим регионом гена глутатион-S-трансферазы от *Schistosoma japonicum* в векторе pGEX-2T (D.B. Smith, K. Johnson, Gege 67 (1988) 31–40). Рекомбинантные молекулы с нужной ориентацией (Syn) фрагмента опознавались посредством анализа рестрикционного фрагмента с использованием стандартных методов. Клоны DH5 α E.coli с таким построением слиянием были названы pGEX-2T600 S1, pGEX-2T600 S2 и pGEX-2T600 S3.

А. Диаграмма одной из конструкций pGEX-2T600 S. На NH₂ стороне региона, который кодирует для продукта слияния GST-gE, располагается регион tac промотора, индуцируемый изопропил-тиогалактозидом (ИПТГ).

В. Изображение фотографий, полученных в блот-анализе всех препаратов белка клеток DH5 α , трансформированных pGEX-2T600S. Ночные культуры клеток DH5 α , трансфицированные конструкциями pGEX-2T600 S1, pGEX-2T600 S2 и pGEX-2T600 S3, пребывали 1/10 в среде Luria-Bertani (LB) с 50 μ г/мл ампициллина и после 1 часа роста, индуцированного ИПТГ – 5 часов. Эти индуцированные культуры были центрифугированы в течение 5 минут при 6000 x g и включены в 1 x смешанный слой (2% SDS (додецилсульфат натрия), 10% глицерол, 5% меркаптоэтанол и 0.01% бромифенол голубой) [1.5 мл культуры включалось в 500 μ л смешанного слоя и нагревались при 95°C 5 минут. Затем 50 μ л на дорожку отделялось на вертикальном 12.5% полиакриламидном геле в соответствии со стандартными процедурами и затем в полусухом состоянии блотировались на нитроцеллюлозный фильтр с использованием системы LKB-Multiphor II Nova Blot при условиях, указанных производителем.

В дорожках М применялся предварительно окрашенный маркерный белок (BRL Life Techol. Inc. 236 к, 112 к, 71 к, 44 к, 28 к, 18 к и 15 к) и в дорожках 1, 2, 3 – препараты общего белка клеток DH5 α , трансфицированных тремя соответствующими рамками: pGEX-2T600 S1, pGEX-2T600 S2 и pGEX-2T600 S3.

На панели А можно видеть результат блот-анализа антисыворотки. С этой целью фильтр инкубировался в соответствии со стандартными про-

цедурами (E. Hallow, Lane, 1986, Antibodies: Cold Spring Harbor Laboratory, N. – York) в блокирующем буфере (PBS + 2% молочный порошок и 0.05% Tween 20), а затем поликлональной анти-GST сывороткой кролика. Затем фильтр промывался и инкубировался козьей-антикроличьей иммуноглобулиновой сывороткой, конъюгированной пероксидазой хрена обыкновенного. Затем связанные козы антитела иммунохимически обнаруживались хроматоеном (диаминобензидин, хлоронафтол и H₂O₂). Продукт слияния GST, который указывается стрелкой, имеет предсказанный размер приблизительно 47 к только в рамке 3.

На панели В можно видеть результат блот-анализа с моноклональным антителом MAT 4, которое опознает gE белок. С этой целью дупло фильтр, как на панели А был заблокирован, инкубирован MAT, промыт, и инкубирован козьей-антикроличьей иммуноглобулиновой сывороткой, конъюгированной пероксидазой хрена обыкновенного (ПоХО). Затем связанные кроличьи антитела иммунохимически обнаруживались хромоеном. Полоса, которая видна в дорожке 3 (рамка 3), составляет 47 т в размере и указана стрелкой.

Фиг. 9

Построение pEVHIS gE плазмиды для эукариотной экспрессии gE-гена BHV–1

Для эукариотной экспрессии gE-гена весь регион gE кодирования клонировался в соответствующей ориентации за регионом промотора HCMV вектора экспрессии pEVHIS, используя стандартные процедуры (Sambrook и др. 1989). С этой целью AII I фрагмент с 394 по, который начинается на 55 по до открытой рамки считывания gE, был клонирован в pUC18 и назван p201. Затем после переваривания p201 посредством Hinc II, Hinc II фрагмент с 1740 по, который включает большую часть gE-гена, был клонирован в p201. Это дало плазмиду p318, которая в полилинкере pUC18 включает всю область кодирования gE от AII I участка на 55 по до начального кодона gE до Hinc II участка на 133 по за останавливающим кодоном gE. Используя участки рестрикционного фермента в полилинкере вектора, этот фрагмент был вырезан из p318 ферментами Bam HI и Sph I. Вначале p318 был переварен Sph I и затем участок Sph I был заполнен использованием полимеразы Кленова и dNTP. После переваривания Bam HI вставка в 1.9 т.п.н. была выделена из pUC18 вектора в агарозу с низкой температурой плавления и лигирована в pEVHIS вектор, который был переварен Bam HI и EcoRV с этой целью. Полученная таким образом плазида была названа pEVHIS/gE.

Фиг. 10

Позиция gE-специфических праймеров и зонда для процедуры ЦРП для обнаружения ДНК BHV–1

На схеме показана последовательность нуклеиновой кислоты gE-гена гликопротеина BHV–1 из нуклеотида 1272–2027 [последовательность была взята с фиг. 3]. Праймеры, используемые для gE-специфической процедуры ЦРП, были названы P₃ и P₄. Участки связывания праймера для P₃ и P₄ подчеркнуты. Нуклеотидная последовательность P₃-5'-ACG-TGG-TGG-TGC-CAG=TTA-GC-3' (Посл. ID №:2). Нуклеотидная последова-

тельность Р₄ (дополнительно к связующей последовательности праймера, определенной выше) - 5'-ACC-AAA-CTT-TGA-ACC-CAG-AGC-G-3' (Посл. ID №:3). Зонд, который использовался для гибридизации блота для обнаружения амплифицированной ЦРП ДНК, представлял собой Taq I фрагмент в 137 по, расположенный между участками связывания праймера, концы этого фрагмента указаны. Для сравнения с фиг. 3 указаны также участки Hind III и EcoR I.

Фиг. 11

Картирование gE делеции Difivac-1

На А показана физическая карта EcoR I фрагмента в 15.5 т.п.н. штамма Lam BHV-1 дикого типа. На В показана физическая карта EcoR I фрагмента в 14.5 т.п.н. Difivac-1. Оба EcoR I фрагмента покрывают полные уникальные короткие регионы геномов соответствующих вирусов. Позиция gE-гена и предполагаемая позиция gl-гена указаны открытыми боксами. Карты А и В расположены таким образом, что фрагменты Rst I в 6 т.п.н. внутри каждой карты выравнены. На обоих картах последовательности внутреннего повтора и концевых повторов были указаны заштрихованными боксами. Стрелки под повторами показывают ориентацию этих последовательностей.

В А была указана часть U_s региона, которая отсутствует в штамме Difivac-1.

С показывает позицию клонированных Difivac-1 фрагментов, используемых для картирования gE делеции и получения физической карты, показанной в В. Стрелки под вставками клонов p728, p737 и p754 указывают регионы, которые имели порядок следования, чтобы определить рекомбинационную точку.

Сокращения:

A = Alu I, E = EcoR I, P = Pst I, H = Hind III, r = рекомбинационная точка, IR = внутренний повтор, TR = концевой повтор.

Фиг. 12

Определение точной рекомбинационной точки в U_s регионе Difivac-1

Чтобы определить точные границы gE делеции, выявленной в штамме Difivac-1, был определен порядок следования клонa p754 и концов клонов p728 и p737. Вставки этих клонов были указаны на фиг. 11. Используемые процедуры последовательности были описаны в пояснениях фиг. 3.

На А была показана последовательность большей части Alu I – Pst I фрагмента. Эта последовательность начинается в регионе промотора gE-гена. Предполагаемый ТАТА бокс подчеркнут. В точке r (= рекомбинационной точке) этот регион промотора сливается с последовательностью, также выявленной на противоположном участке U_s региона, и называется: инвертированный повтор. Точная рекомбинационная точка была определена сравнением повтора, выявленного на регионе gE промотора, с копией повтора, выявленного на противоположном участке U_s региона. Точка, где эти последовательности расходятся, была указана в В (под I) обозначением "r". Подобное сравнение было сделано с последовательностью gE промотора, выявленной в Difivac-1, и gE промотора, выявленной в штамме Lam дикого типа. Точка, где эти последовательности расходятся, была показана в В

(под II) и также помечена "r". Выявленные точки рекомбинации те же самые.

Фиг. 13

Анализ частичной последовательности gl-гена BHV-1

С использованием Pst I клонa штамма BHV-1 в 1.8 т.п.н., который попадает и в gl, и gE-ген BHV-1 (см. фиг. 11), была определена последовательность 284 нуклеотидов внутри кодирующего региона BHV-1 gl. Используемые процедуры последовательности были описаны в пояснениях к фиг. 3. Транспируемая последовательность основывалась на универсальном коде версий 1.03 компьютерной программы PC (ген/ноябрь 1987). Последовательность аминокислоты, кодируемой второй рамкой считывания, дается в однобуквенном коде ниже нуклетидной последовательности. Эта последовательность аминокислоты гомологична кодирующему региону других gl гомологов вируса герпеса (См. фиг. 14).

Фиг. 14

Сравнение аминокислоты частичной последовательности аминокислоты предполагаемого gl-гена BHV-1 с соответствующими частями кодирующих регионов gl-гена вируса простого герпеса, др 63 гена вируса (PRV) pseudorabies и др. IV гена вируса varicella-zoster (VZV).

Последовательность PRV начинается у аминокислоты 82, HSV I последовательность начинается у ак 80 и последовательность VZV начинается у ак 76 их соответствующих кодирующих регионов. Используемая последовательность была опубликована в документах, упомянутых в пояснениях к фиг. 4. Сравнение проводилось с использованием Miltalen компьютерной программы. Звездочки указывают идентичные аминокислоты и двоеточия указывают аналогичные аминокислоты.

Фиг. 15

Построение VSV нео Gl плазмиды для эукариотной экспрессии gl-гена BHV-1

На основании сравнения аминокислоты частичной последовательности gl-гена BHV-1, была рассчитана предполагаемая позиция gl-гена BHV-1. Основываясь на этом расчете, предполагалось, что Sma I фрагмент в 1.7 т.п.н. должен содержать полный кодирующий регион gE-гена BHV-1. Позиция этого Sma I фрагмента была указана в А. К ту-пым концам этого Sma I фрагмента в 1.7 т.п.н. были лигированы Bam HI линкеры с использованием стандартных процедур. Полученный продукт был переварен Bam HI и лигирован в вектор MSV-нео эукариотной экспрессии. Вектор MSV-нео имеет уникальный участок Bam HI за MSV-LTR, который обладает сильной активностью промотора. Этот вектор был описан в Rijsewijk и др. 1987 EMBO J. 6, 127-131.

Фиг. 16

Построение фрагмента двойной делеции gl/gE BHV-1

Позиция гликопротеин gE-гена и предполагаемая позиция гликопротеид gl-гена в U_s регионе BHV-1 изображена на диаграмме А. Заштрихованные блоки показывают повторы, которые граничат с регионом U_s. В показывает физическую карту некоторых значительных участков рестрикционного фермента по отношению к позиции обоих генов.

Чтобы построить фрагмент делеций gl/gE, клон pl. r – Sma I/o, содержащий Sma I фрагмент, в 1.7 т.п.н., который охватывает gl-ген, будет переварен Pst I. Участок Pst I остающейся вставки Sma I – Pst I в 350 по, будет сделан с затупленными концами с использованием стандартных молекулярно-биологических процедур. EcoN I – Sma I фрагмент (См. фиг. 6в), изолированный от фрагмента Hind III – EcoR I в 4.1 т.п.н., описанный на фиг. 6а, также будет сделан с затупленными концами и лигирован к модифицированному P I участку. Это показано на диаграмме в С и D. Из полученного клона рΔIE фрагмент Sma I – Dra I в 1.4 т.п.н. может быть изолирован для рекомбинации с ДНК BHV-1 дикого типа.

Сокращения:

E = EcoR I, H = Hind III, S = Sma I, P = Pst I, EN I = EcoN I, D = Dra I, kb = тысяча пар нуклеотидов (т.п.н.) и U_s = уникальный короткий.

Фиг. 17

Среднее количество вируса, выделяющееся из носа телят после вакцинации

. == вакцинированные Difivac-1, 0 = невакцинированные контрольные телята.

Фиг. 18

Средние ежедневные клинические проявления у телят после контрольного заражения вирулентным штаммом BHV-1, ключевые обозначения, как на фиг. 17.

Фиг. 19

Средняя ректальная температура телят, с контрольным заражением вирулентным штаммом BHV-1, ключевые обозначения, как на фиг. 17.

Фиг. 20

Средний рост телят после контрольного заражения вирулентным штаммом BHV-1, ключевые обозначения, как на фиг. 17.

Фиг. 21

Среднее количество вируса, выделяющееся из носа телят после контрольного заражения вирулентным штаммом BHV-1, ключевые обозначения, как на фиг. 17.

Фиг. 22

Средняя ректальная температура телят после контрольного заражения вирулентным штаммом BHV-1.

. = вакцинированные Lamg E⁻, 0 = вакцинированные Lamg E⁻/TK⁻,

x = невакцинированные контрольные телята.

Фиг. 23

Средний рост телят после контрольного заражения вирулентным штаммом BHV-1, ключевые обозначения, как на фиг. 22.

Фиг. 24

Средние ежедневные клинические проявления у телят после контрольного заражения вирулентным штаммом, ключевые обозначения, как на фиг. 22.

Таблица 1

Выделение вируса из носа телят после вакцинации Lam gE⁻ или Lam gE⁻/TK⁻ и после контрольного заражения вирулентным штаммом BHV-1 этих вакцинированных и контрольных телят

Группа	Среднее количество дней выделения вируса из носа	
	После вакцинации	После контрольного заражения
Контроль	0	10.33 ± 1.51
Lam gE ⁻	7.00 ± 0.89	4.83 ± 1.17
Lam gE ⁻ /TK ⁻	7.17 ± 1.33	5.17 ± 0.98

Таблица 2

Характеристика gE-MAT

MAT	Реактивность кандидатов gE-MAT с помощью							
	Difivac-1 3T3/EBTP	Lam gE ⁻	Prok	3T3 gE	3T3 gE Difivac-1I	3T3 gE/gI	Группы Ag	Ab белка коровы
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	–	–	nd	–	+	?	I	+
2	–	–	–	+	+	+	II	–
3	–	–	+	+	+	+	?	–
4	–	–	+	+	+	+	?	–
42	–	–	nd	–	–	?	V?	±
51	–	–	nd	–	+	+	III	+
52	–	–	+	+	+	+	?	–
53	–	–	nd	–	+	+	III	+
59	–	–	nd	–	–	+	III	+
66	–	–	nd	+	+	+	III	+
67	–	–	nd	–	+	+	III	+
68	–	–	–	+	+	+	IV	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9
72	—	—	—	+	+	+	V	\pm
75	—	—	nd	—	+	?	I	+
78	—	—	nd	—	+	?	nd	—
81	—	—	—	+	+	+	II?	—

+ : все 8 тестируемых сывороток дают процент блокирования >50% в непосредственном блокировании IPMA.

\pm : Сыворотки дают блокирующий процент \pm 50%.

— : Сыворотки дают блокирующий процент <50%.

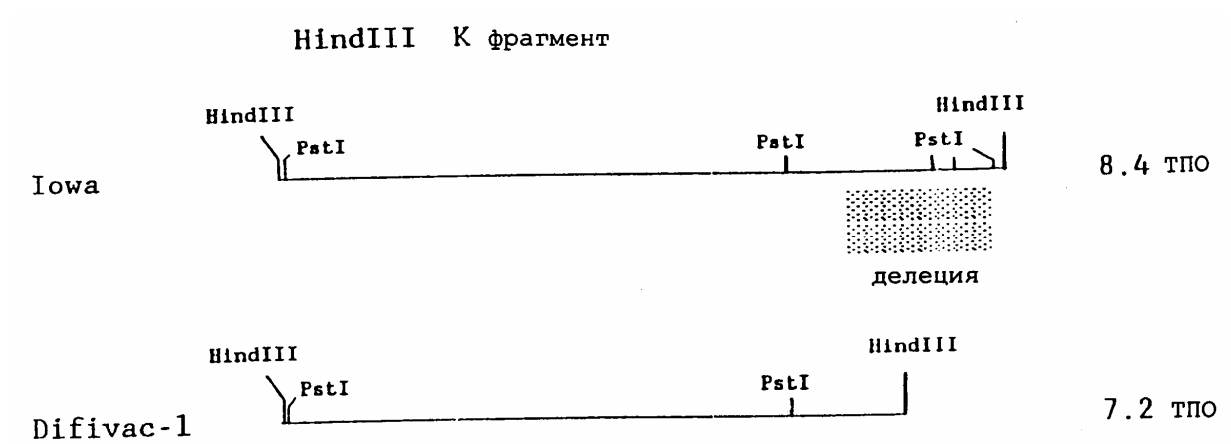
$\frac{H}{D I} \quad \frac{P}{D I}$

$$\frac{8,4_{\text{ТПО}}}{7,2_{\text{ТПО}}} = \frac{---}{---} - 6_{\text{ТПО}}$$

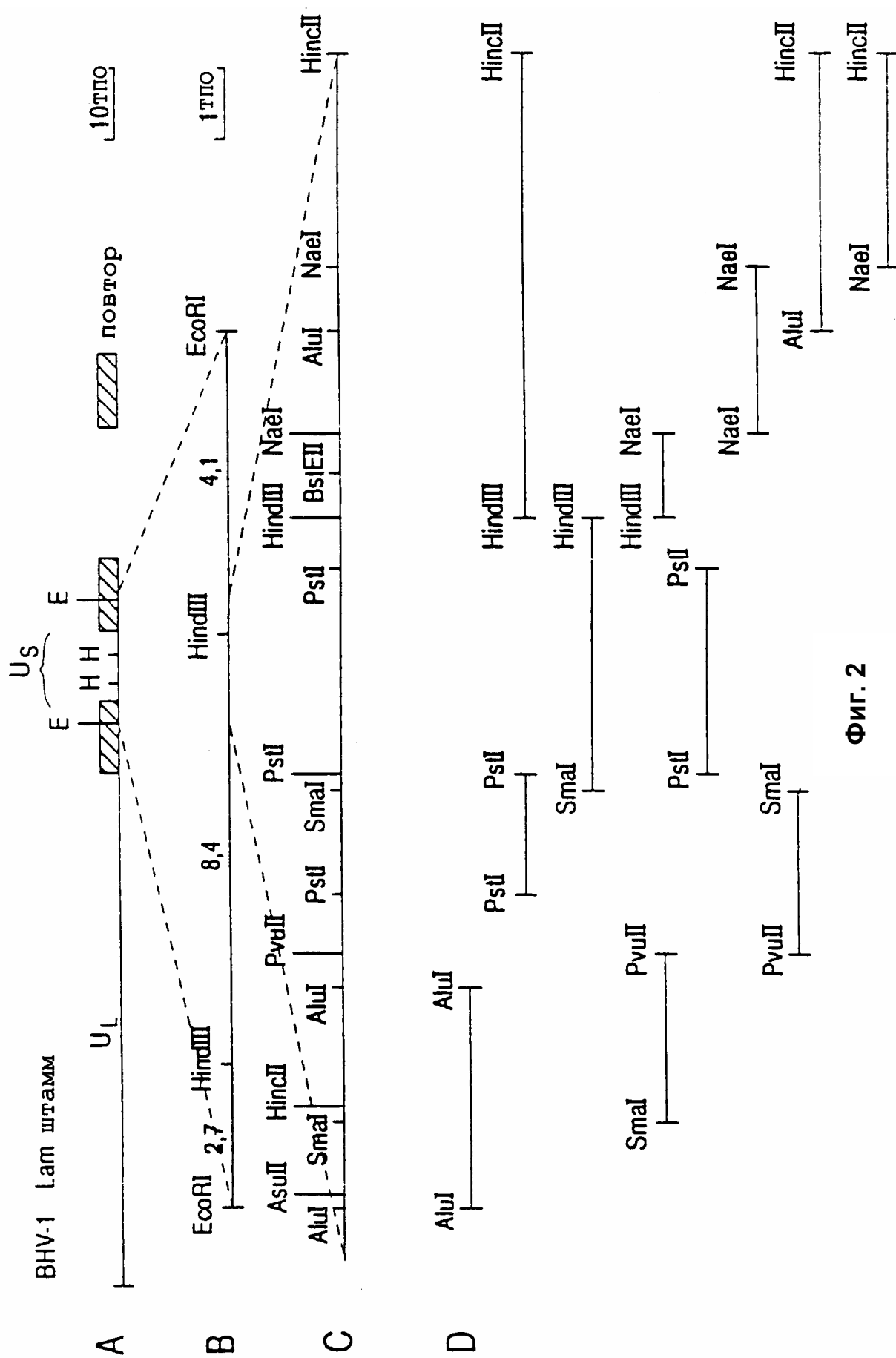
—
—

1 2 3 4

Фиг. 1а



Фиг. 1b



AGGGCGGAGC GTT GAGCGGC CCGACCGCCG CCGGGTTGTT AAATGGGTCT CGCGCGGCTC	60
---->делетирован в Difivac1	
GTGGTTCCAC ACCGCCGGAG AACCAGCGCG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGCG	120
AsuII	
TTCCGGGGAA CGGCGCACGC GAGAGGGTTC GAA AAGGGCA TTTGGCA	167
ATG CAA CCC ACC GCG CCG CCC CGG CGG CGG TTG CTG CCG CTG CTG CTG	215
Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
=====сигнальный пептид=====	
CCG CAG TTA TTG CTT TTC GGG CTG ATG GCC GAG GCC AAG CCC GCG ACC	263
Pro Gln Leu Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr	
20 25 30	
=====	
SmaI	
GAA ACC CCG GGC TCG GCT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACG GCG CGC GCT	311
Glu Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala	
35 40 45	
GGC GCG CCC GTC TTT CTC CCA GGG CCC GCG GCG CGC CCG GAC GTG CGC	359
Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg	
50 55 60	
GCC GTT CGC GGC TGG AGC GTC CTC GCG GGC GCC TGC TCG CCG CCC GTG	407
Ala Val Arg Gly Trp Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val	
65 70 75 80	
CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CGC GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC	455
Pro Glu Pro Val Cys Leu Asp Asp Arg Glu Cys Phe Thr Asp Val Ala	
85 90 95	
CTG GAC GCG GCC TGC CTG CGA ACC GCC CGC GTG GCC CCG CTG GCC ATC	503
Leu Asp Ala Ala Cys Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile	
100 105 110	
GCG GAG CTC GCC GAG CGG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT	551
Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val	
115 120 125	
PvuII	
CTC GCC GAC CCG CAC GTC TCG GCG CAG CTG GGT CGC AAC GCG ACC GGG	599
Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg Asn Ala Thr Gly	
130 135 140	
GTG CTG ATC GCG GCC GCA GCC GAG GAG GAC GGC GGC GTG TAC TTC CTG	647
Val Leu Ile Ala Ala Ala Glu Glu Asp Gly Gly Val Tyr Phe Leu	
145 150 155 160	
TAC GAC CGG CTC ATC GGC GAC GCC GGC GAC GAG GAG ACG CAG TTG GCG	695
Tyr Asp Arg Leu Ile Gly Asp Ala Gly Asp Glu Glu Thr Gln Leu Ala	
165 170 175	
CTG ACG CTG CAG GTC GCG ACG GCC GGC GCG CAG GGC GCC GCG CGG GAC	743
Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp	
180 185 190	

Фиг. 3а

GAG	GAG	AGG	GAA	CCA	GCG	ACC	GGG	CCC	ACC	CCC	GGC	CCG	CCG	CCC	CAC	791
Glu	Glu	Arg	Glu	Pro	Ala	Thr	Gly	Pro	Thr	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	His	
		195					200				205					
CGC	ACG	ACG	ACA	CGC	GCG	CCC	CCG	CGG	CGG	CAC	GGC	GCG	CGC	TTC	CGC	839
Arg	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Pro	Pro	Arg	Arg	His	Gly	Ala	Arg	Phe	Arg	
	210					215					220					
GTG	CTG	CCG	TAC	CAC	TCC	CAC	GTA	TAC	ACC	CCG	GGC	GAT	TCC	TTT	CTG	887
Val	Leu	Pro	Tyr	His	Ser	His	Val	Tyr	Thr	Pro	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	
225					230				235						240	
CTA	TCG	GTG	CGT	CTG	CAG	TCT	GAG	TTT	TTC	GAC	GAG	GCT	CCC	TTC	TCG	935
Leu	Ser	Val	Arg	Leu	Gln	Ser	Glu	Phe	Phe	Asp	Glu	Ala	Pro	Phe	Ser	
				245				250						255		
GCC	AGC	ATC	GAC	TGG	TAC	TTC	CTG	CGG	ACG	GCC	GGC	GAC	TGC	GCG	CTC	983
Ala	Ser	Ile	Asp	Trp	Tyr	Phe	Leu	Arg	Thr	Ala	Gly	Asp	Cys	Ala	Leu	
			260					265					270			
ATC	CGC	ATA	TAC	GAG	ACG	TGC	ATC	TTC	CAC	CCC	GAG	GCA	CCG	GCC	TGC	1031
Ile	Arg	Ile	Tyr	Glu	Thr	Cys	Ile	Phe	His	Pro	Glu	Ala	Pro	Ala	Cys	
		275					280					285				
CTG	CAC	CCC	GCC	GAC	GCG	CAG	TGC	AGC	TTC	GCG	TCG	CCG	TAC	CGC	TCC	1079
Leu	His	Pro	Ala	Asp	Ala	Gln	Cys	Ser	Phe	Ala	Ser	Pro	Tyr	Arg	Ser	
		290				295					300					
GAG	ACC	GTG	TAC	AGC	CGG	CTG	TAC	GAG	CAG	TGC	CGC	CCG	GAC	CCT	GCC	1127
Glu	Thr	Val	Tyr	Ser	Arg	Leu	Tyr	Glu	Gln	Cys	Arg	Pro	Asp	Pro	Ala	
305					310					315					320	
GGT	CGC	TGG	CCG	CAC	GAG	TGC	GAG	GGC	GCC	GCG	TAC	GCG	GCG	CCC	GTT	1175
Gly	Arg	Trp	Pro	His	Glu	Cys	Glu	Gly	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Pro	Val	
				325				330						335		
GCG	CAC	CTG	CGT	CCC	GCC	AAT	AAC	AGC	GTA	GAC	CTG	GTC	TTT	GAC	GAC	1223
Ala	His	Leu	Arg	Pro	Ala	Asn	Asn	Ser	Val	Asp	Leu	Val	Phe	Asp	Asp	
			340					345					350			
GCG	CCG	GCT	GCG	GCC	TCC	GGG	CTT	TAC	GTC	TTT	GTG	CTG	CAG	TAC	AAC	1271
Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Leu	Tyr	Val	Phe	Val	Leu	Gln	Tyr	Asn	
		355					360					365				
GGC	CAC	GTG	GAA	GCT	TGG	GAC	TAC	AGC	CTA	GTC	GTT	ACT	TCG	GAC	CGT	1319
Gly	His	Val	Glu	Ala	Trp	Asp	Tyr	Ser	Leu	Val	Val	Thr	Ser	Asp	Arg	
	370					375					380					
TTG	GTG	CGC	GCG	GTC	ACC	GAC	CAC	ACG	CGC	CCC	GAG	GCC	GCA	GCC	GCC	1367
Leu	Val	Arg	Ala	Val	Thr	Asp	His	Thr	Arg	Pro	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	
385					390					395					400	
GAC	GCT	CCC	GAG	CCA	GGC	CCA	CCG	CTC	ACC	AGC	GAG	CCG	GCG	GGC	GCG	1415
Asp	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Pro	Pro	Leu	Thr	Ser	Glu	Pro	Ala	Gly	Ala	
				405					410					415		

Фиг. 3а

CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG GTG CTG GTG GGC GCG CTT GGA	1463
Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly	
420 425 430	
=====трансмембранная петля=====	
CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CGG GTG TGC GCG	1511
Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala	
435 440 445	
=====	
CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG	1559
Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly	
450 455 460	
CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG	1607
Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val Val	
465 470 475 480	
CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT	1655
Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp	
485 490 495	
GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC	1703
Asp Asp Ser Asp Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala	
500 505 510	
TAC GAC CTC GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC	1751
Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala	
515 520 525	
CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT	1799
Pro Ala <u>Asn Gly Thr</u> Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe	
530 535 540	
AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG CGG ACC CCG GCC GCA	1847
Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala	
545 550 555 560	
CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC <u>CTC CGC TAG</u>	1895
Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg *	
565 570 575	
GCACCCCGCGC GCTGTGCCGT CTGACGGAAA GCACCCGCGT GTAGGGCTGC	1955
ATATAAATGG AGCGCTCACA CAAAGCCTCG TCGGGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA	2015
CGCAGCGTCG TC	2027

Фиг. 3А

40571

BHV-1 gE



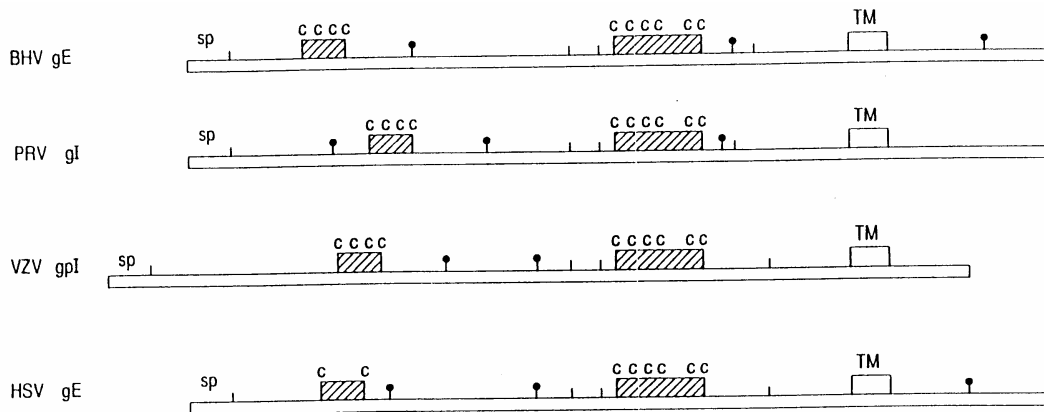
575 аминокислоты

sp = сигнальный пептид из 26 ост.

• = предполагаемый сайт
N - гликозилирования

tm = трансмембранная петля из 423-450 ост.

Фиг. 3В

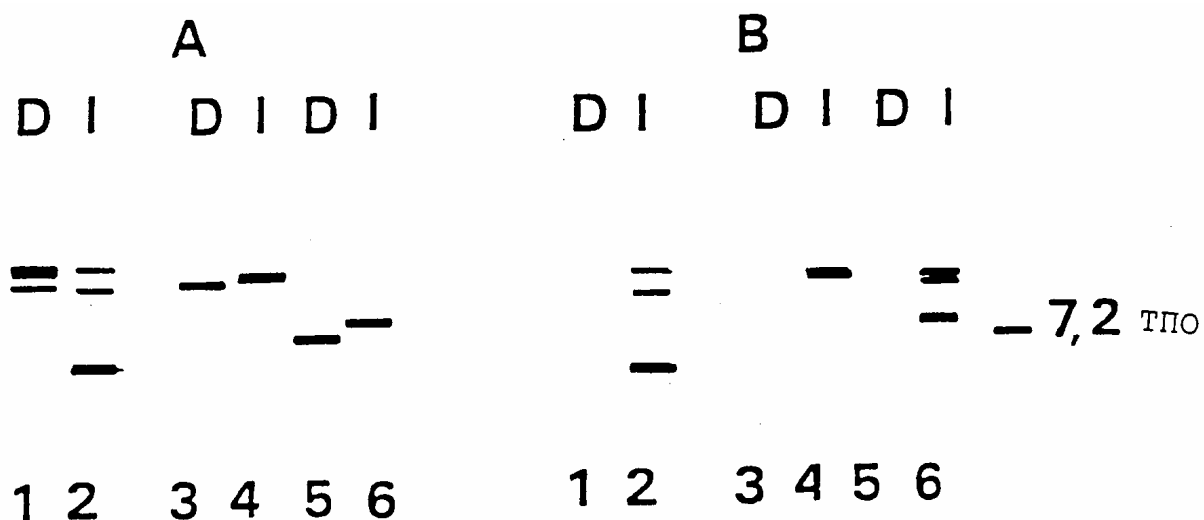


Фиг. 4А

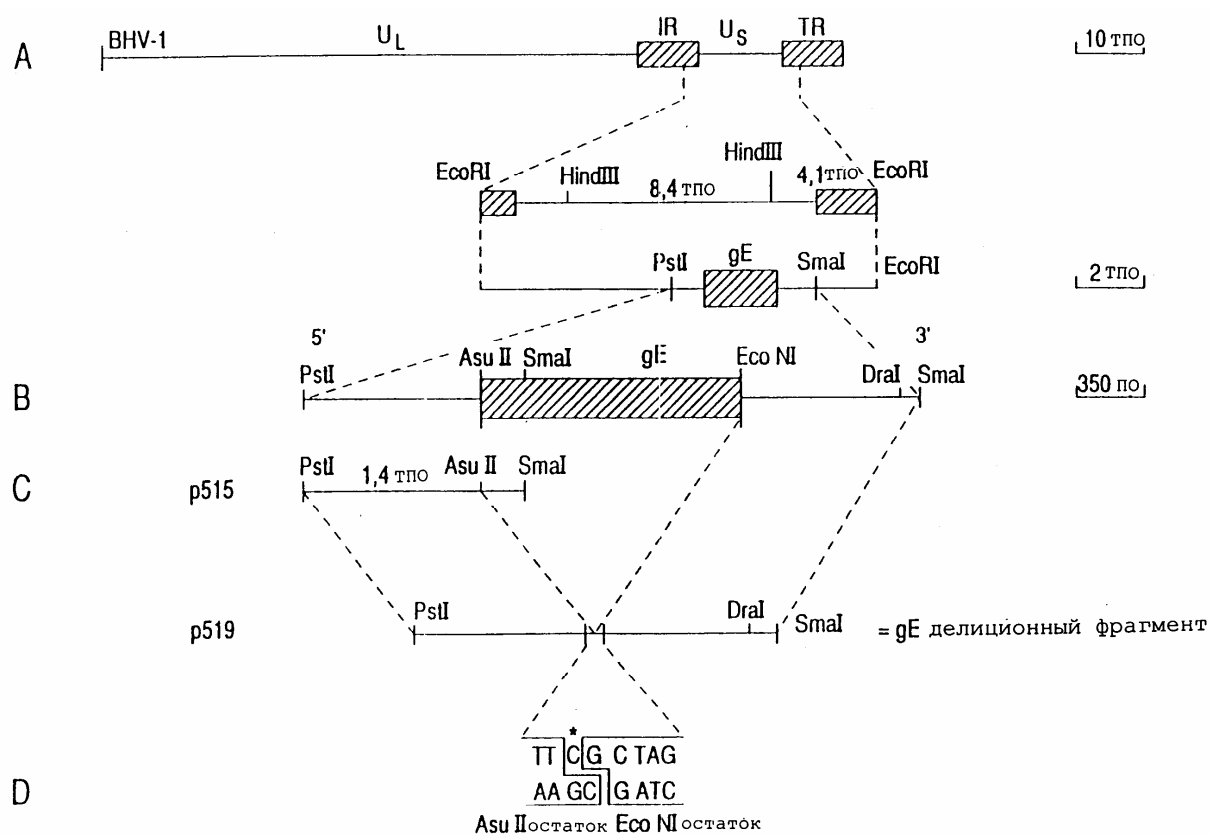
обозначение сравнительная таблица: DAYHOFF.DAT; "штраф" gap : 8

	1	10	20	30	40	50	60
PRV	HSQLFSPGDTFDLM	PRVVS	DMGDS	RENTFTATLD	WYYARAP	PRCLLYV	VEPC IYHPRAP
	***:	***	*	:	*	*	***
VZV	HSVFSVGDTFSL	AMHLQYKI	.H.	EAPFDLL	LEWLYVP	IDPTCQ	PMRLYSTCLYHPNAP
	***:	***	***	***	***	***	***
BHV	HSVYTPGDSFLL	SVRLQSEFFD	.EAPFS	ASIDWYFL	RRTAGD	CALIRI	YETC IYHPRAP
	***:	***	***	***	***	***	***
HSV	EAILFSPGETF	STNVS	IHAIAHD	.DQTY	MDVVL	RFDPV	PTSCAEMRIYESCLYHPQLP
	1	10	20	30	40	50	
	70	80	90	100	110		
PRV	ECLRPVDPAC	SFTSPARA	ALVARRAY	ASCSP	LLGDRWLT	ACPFDA	FGEEVH.....
	***:	***	***	***	***	***	***
VZV	QCLSHMNSG	CTFTSPH	LAQRV	ASTVYQNC	.EHADNY	TAYCLG	ISHMEPSFGLILHDGGT
	***:	***	***	***	***	***	***
BHV	ACLHPADAQ	CTFASPY	RSETVYS	RLYEQCR	PDPAGR	WPHECE	GAAAYAAPVAHLRPANNSV
	***:	***	***	***	***	***	***
HSV	ECLSPADAP	C..AAS	TWTSRL	AVRSYAG	CSRTNP	...PPR	CSAEAHMEPVPGLAWQAASV
	60	70	80	90	100	110	
	120	130	140				
PRV	...TNATA	DESGLY	VLMTH	NGHVAT	WDYTL	VAT	
	***:	***	***	***	***	***	***
VZV	TLKFVDTP	ESLSGLY	VVFYV	FNGHVE	AVAYT	VVST	
	***:	***	***	***	***	***	***
BHV	DLVFDDAP	AAASGLY	VFVLQY	NGHVE	AWDYS	LVVT	
	***:	***	***	***	***	***	***
HSV	NLEFRDAS	PQHSGLY	LCVVY	VNDHI	AWGHIT	IST	
	120	130	140	148			

Фиг. 4В

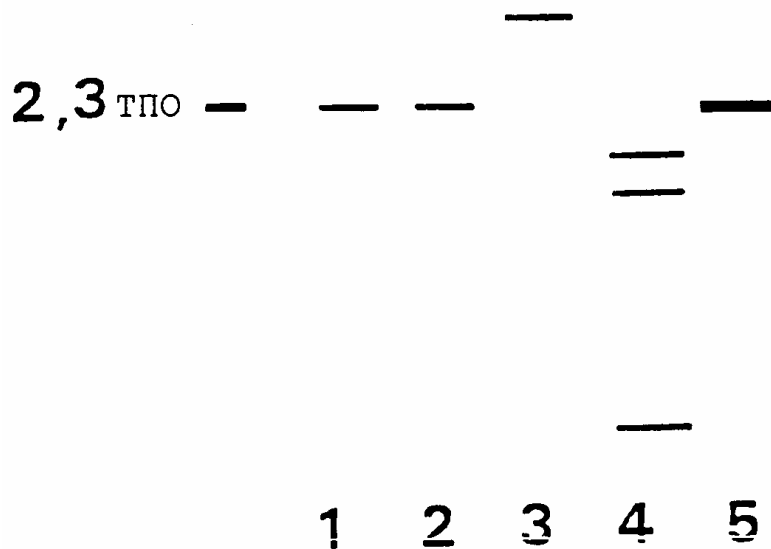


Фиг. 5

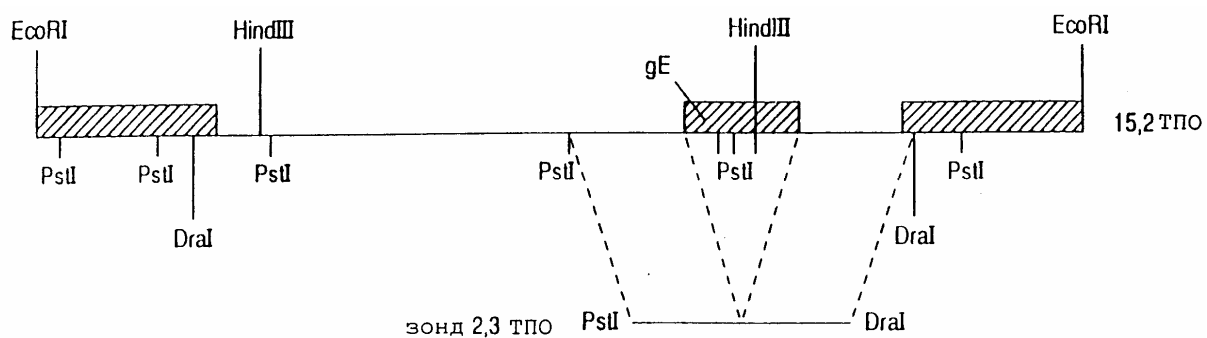


Фиг. 6

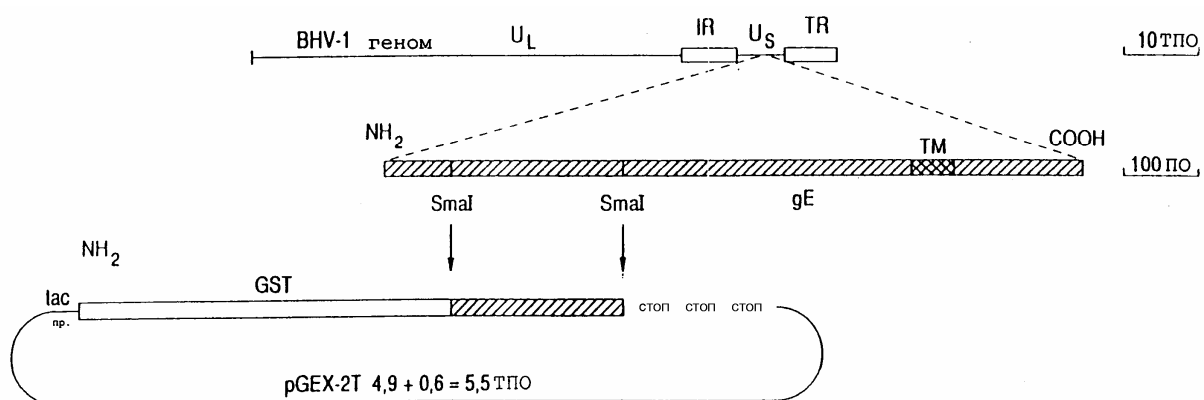
40571



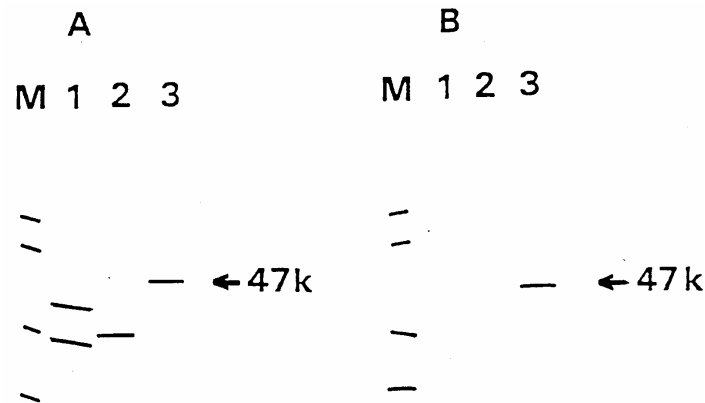
Фиг. 7А



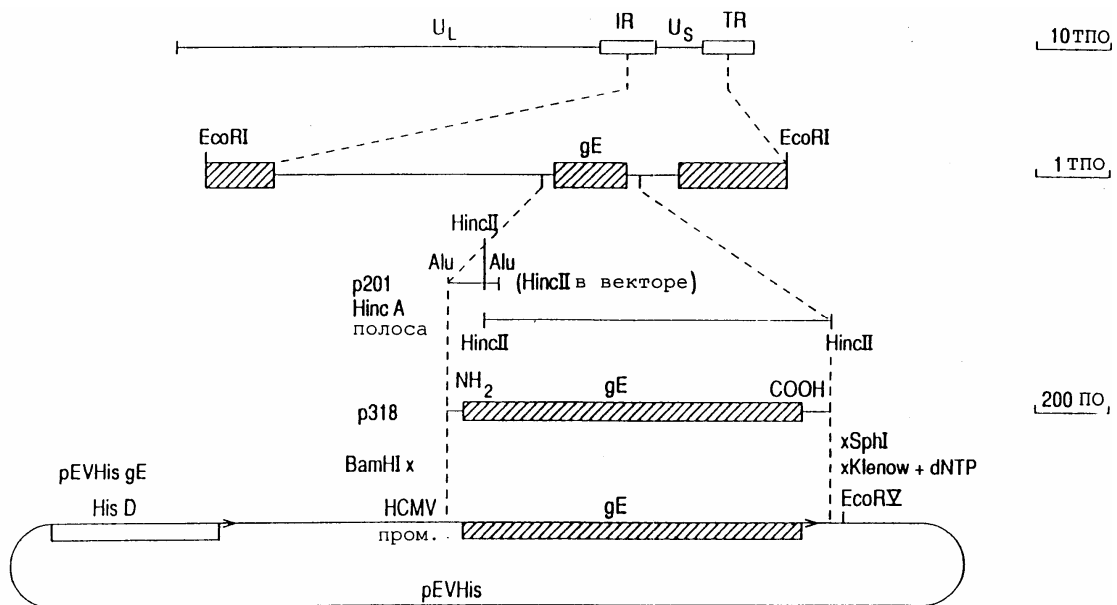
Фиг. 7В



Фиг. 8А



Фиг. 8В

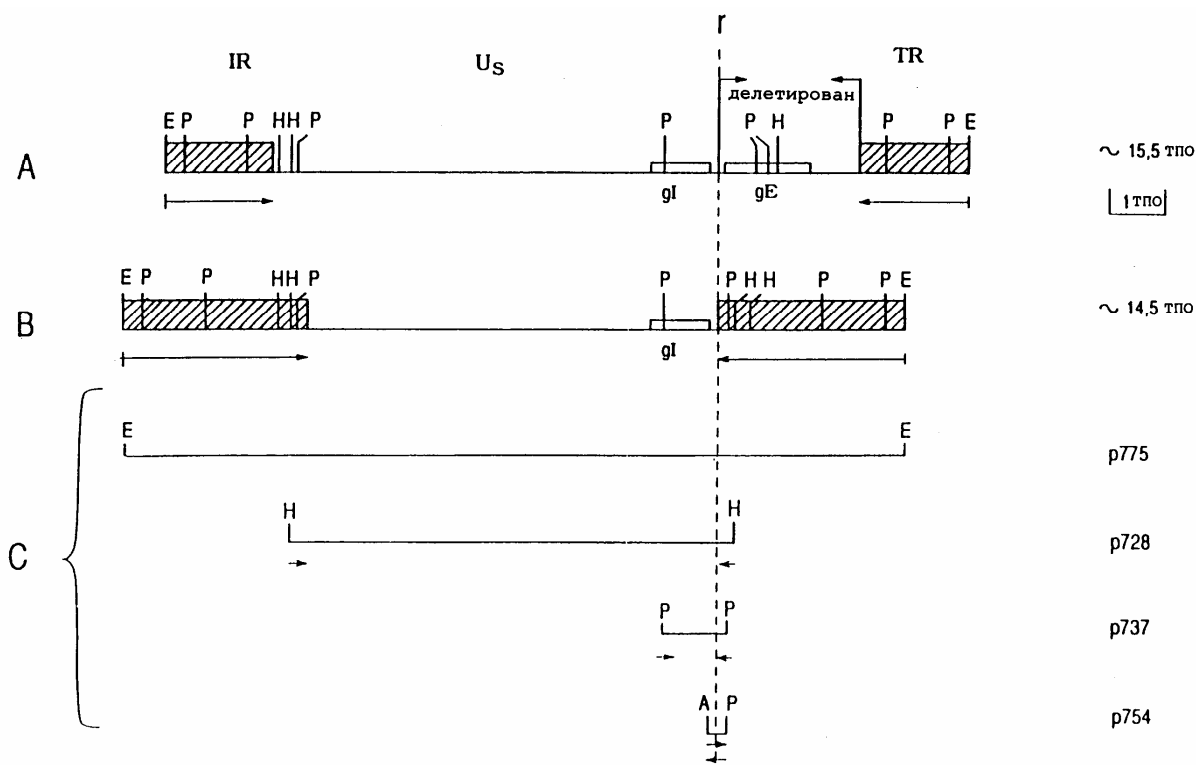


Фиг. 9

1272 GGCCACGTGGAAAGCTTGGGACTACAGCCTAGTCGTTACTTCGGACCGTTTGGTGCGCGCGGTCAACC
 HindIII
 GACCACACGCGCCCCGAGGCCGACGCCGACGCTCCCGAGCCAGGCCACCGCTCACCAGCGAGCCGGCGGGCGCG
 CCCACCGGGCCCGCGCCCTGGCTTGTGGTGCT'GGTGGGCGCGCTTGGAC'TCGCGGGACTGGTGGGCATCGCAGCCCTC
 GCCGTTTCGGGTGTGCGCGCGCCGCGCAAGCCAGAAGCGCACCTACGACATCCTCAACCCCTTCGGGCCCCGTATACACC
 AGCTTGCCGACCAACGAGCCGCTCGACGTTGGTGGTGGCAGTTAGCGACGACGAATTTTCCCTCGACGAAGACTCTTTT
 P₃ TaqI
 GCGGATGACGACAGCGACGATGACGGGCCGCTAGCAACCCCCCTGCGGATGCCTACGACCTCGCCGGCGCCCCAGAG
 CCAACTAGCGGGTTTGGCGGAGCCCCCGCAACGGCACGCGCTCGAGT'GCTCTGGGTTCAAAGTTTGGTTTAGGGAC
 TaqI P₄
 CCGCTTGAAGACGATGCCGCGCCAGCGCGGACCCCGCCGACACAGATTACACCGTGGTAGCAGCGGACTCAAGTCC
 ATCCTCCGCTAGGCGCCCCCCCCCCCCCGCGCTGTGCCGTCTGACGGAAAGCACCCGCGTGTAGGGCTGCATATAA
 EcoNI
 ATGGAGCGCTCACACAAAGCCTCGTGCGGCTGCTTCGAAGGCATGGAGAGTCCACGCAGCGTCGTC

2027

Фиг. 10



Фиг. 11

A

-----> gE промоторный участок ----->
 5' GAGCGGCCCCGACCGCCCGGGGTTGTTAAATGGGTCTCGCGGGCTCGTGGTTCCACACCGCCGGAGAA
 Г
 -----< инвертированный повтор -----<
 CCAGCGC | TGCGAGGGGGGCTTGGTGGCTGGCGACTCTTTAAGGCGTGCCGCCACGAGCAAGAAGACGGC
 |
 -----< инвертированный повтор -----<
 CTGTATGCTATGCTCCCGCCGGAATAATTTCCGGTGGTGGCCCTCGTCCAAGCCCTGCTGGTGAAAGTT 3'

B(I)

Г
 граница противоположного повтора : GGCACCGGTCCCGGA | TGCGAGGGGGGCTTGG
 (инвертированная последовательность) * * | *****
 рекомбинантный участок : CCGGAGAACCAGCGC | TGCGAGGGGGGCTTGG

B(II)

Г
 рекомбинантный участок : CCGGAGAACCAGCGC | TGCGAGGGGGGCTTGG
 ***** | * * * * *
 gE - участок дикого типа : CCGGAGAACCAGCGC | GAGCTTCGCTGCGTGTG
 | gE лидер ---->

Фиг. 12

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CTACCACGCCGCGGGCGACTGCTTCGTTATGCTGCAGACGACCGCGTTTCGCTCCTGCCC
Y H A A G A C F V M L Q T T A F A S C P

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
GCGCGTCGCGAACGACGCCTTTTCGCTCCTGCCTGCACGCCGACACGCGCCCCGCTCGCAG
R V A N D A F R S C L H A D T R P A R S

     130     140     150     160     170     180
     |      |      |      |      |      |
CGAGCGGCGCGCGAGCGCCGCGGTGAAAACCACGTGCTCTTCTCCATCGCCCATCCGCG
E R R A S A A V E N H V L F S I A H P R

     190     200     210     220     230     240
     |      |      |      |      |      |
CCCAATAGACTCAGGGCTCTACTTTCTGCGCGTCGGCATCTACGGCGGCACCGCGGGCAG
P I D S G L Y F L R V G I Y G G T A G S

     250     260     270     280
     |      |      |      |
CGAGCGCCGCGCGAGACGTCTTCCCTTGCGCGGTTTGTACACA
E R R R D V F P L A A F V H

```

Фиг. 13

обозначение сравнительная таблица : DAYHOFF.DAT; "штраф" gap 8

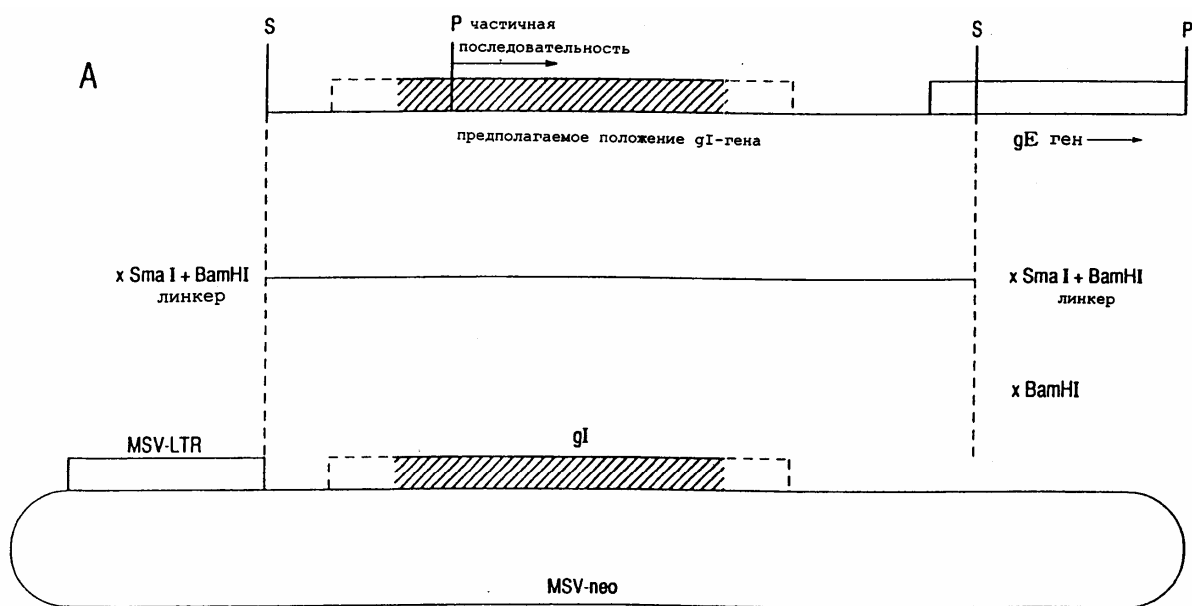
```

      1      10      20      30      40      50
BHVI  YHAAGD.CFVMLQTTAFASCPRVAN.AFRSCLHADTRP.ARSERRASAAVENHVLFSIA
      * :      : **** : *** ** :      : ***** : * :
PRV   RLDPKRA.CYTREYAAEYDLCPRVHHEAFRGCLR...KR.EPLARRASAAVEARRLLFVS
      : *      **** ** *      : *      : ** *
HSV1  YPMGHK.CPRVVHVTVTACPRRPAVAFALCRATDSTH.SPAYPTLELNLAQQPILRVQ
      * * * * : **** ** ** * *      : * :
VZV   YADTVAFGFRSVQVIRYDGCPRIRTSAFISCRYKHSWHYGNSTDRISTEPDAGVMLKIT
      1      10      20      30      40      50

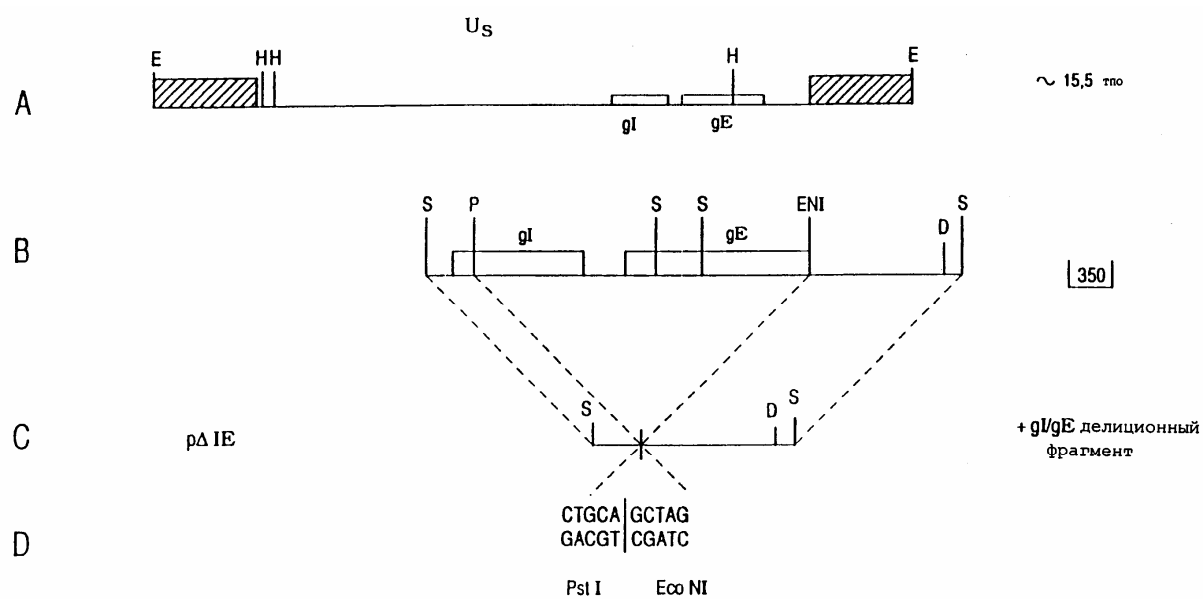
      60      70      80      90 93
BHVI  HPRPIDSGLYFLRVGIYGG.TAGSERRRDVFPLAAFVH
      : * * * * * **** * *      : * *
PRV   RPAPPDAGSYVLRVR..NG.TTDLFVLTALVPPRGRPHU
      * ** ***** : **** : *
HSV1  RATRDYAGVYVLRVWVGDAFNASLFVLGMAIAAEG
      : : ***** * : * : * : *
VZV   KPGINDAGVYVLLVRLDHSRSTDGFI LGVNVYTAG
      70      80      90 94

```

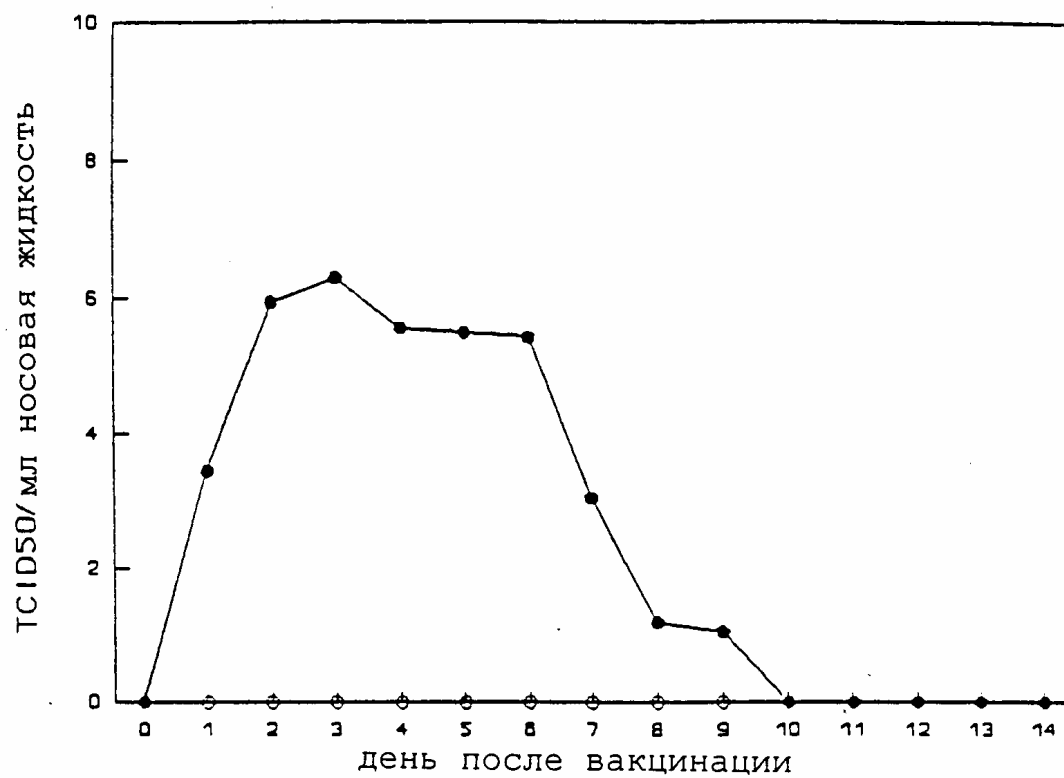
Фиг. 14



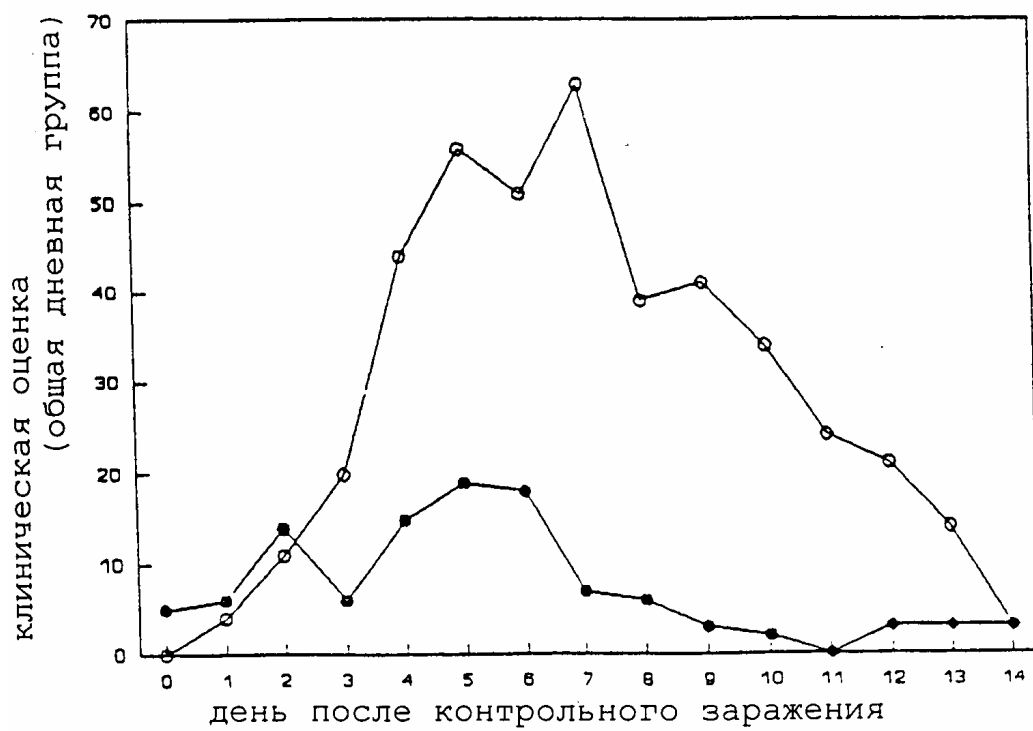
Фиг. 15



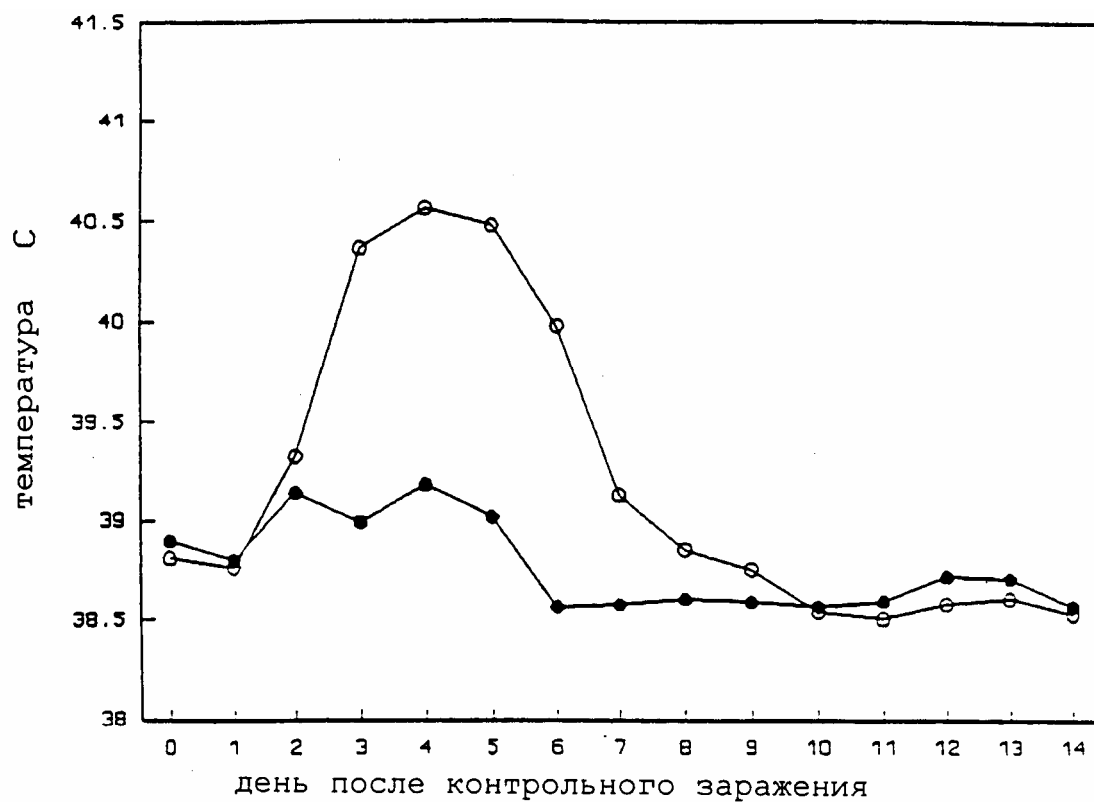
Фиг. 16



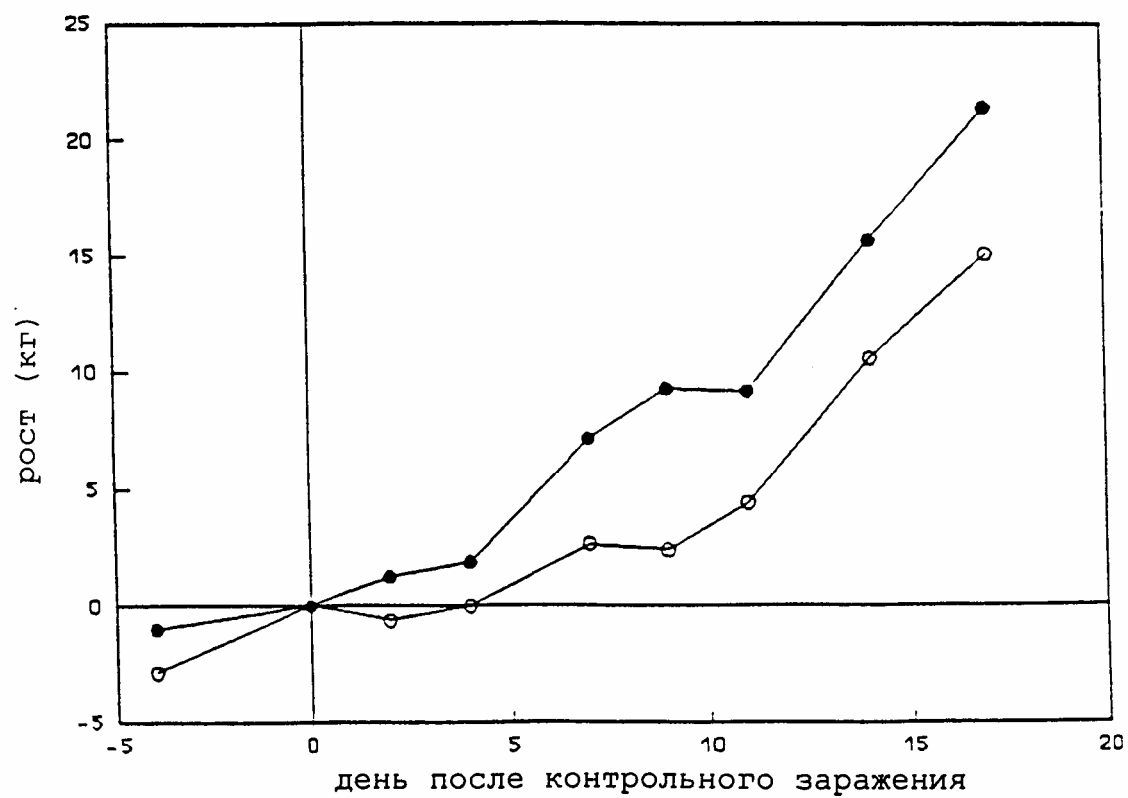
Фиг. 17



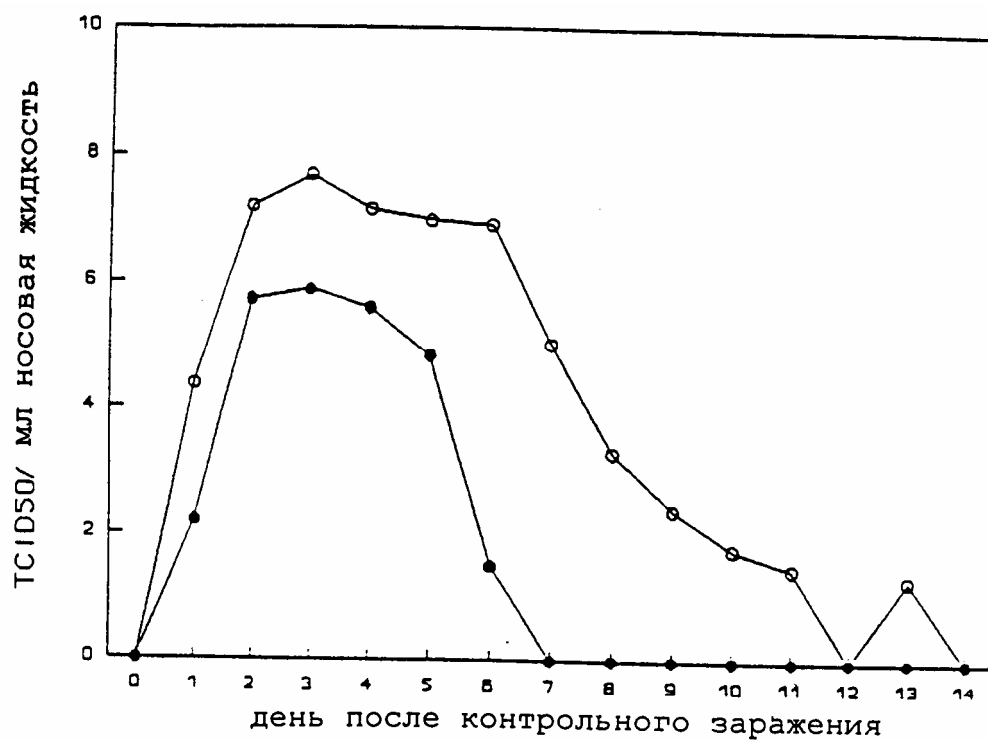
Фиг. 18



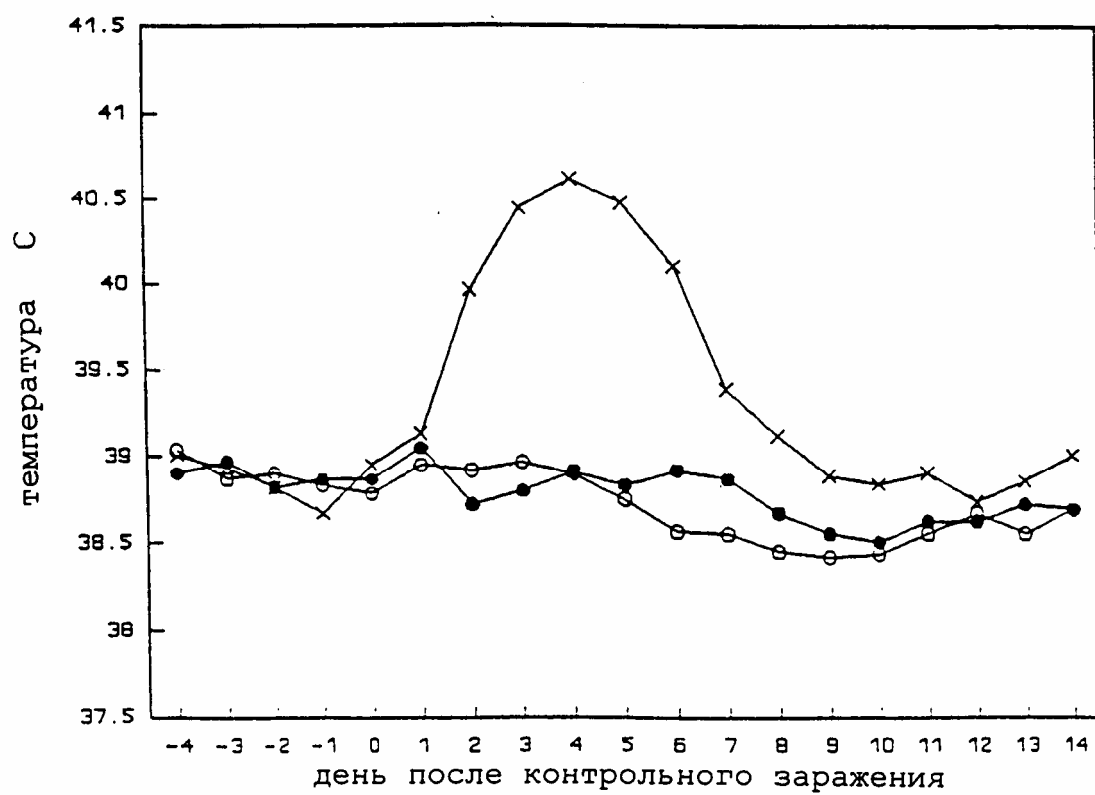
Фиг. 19



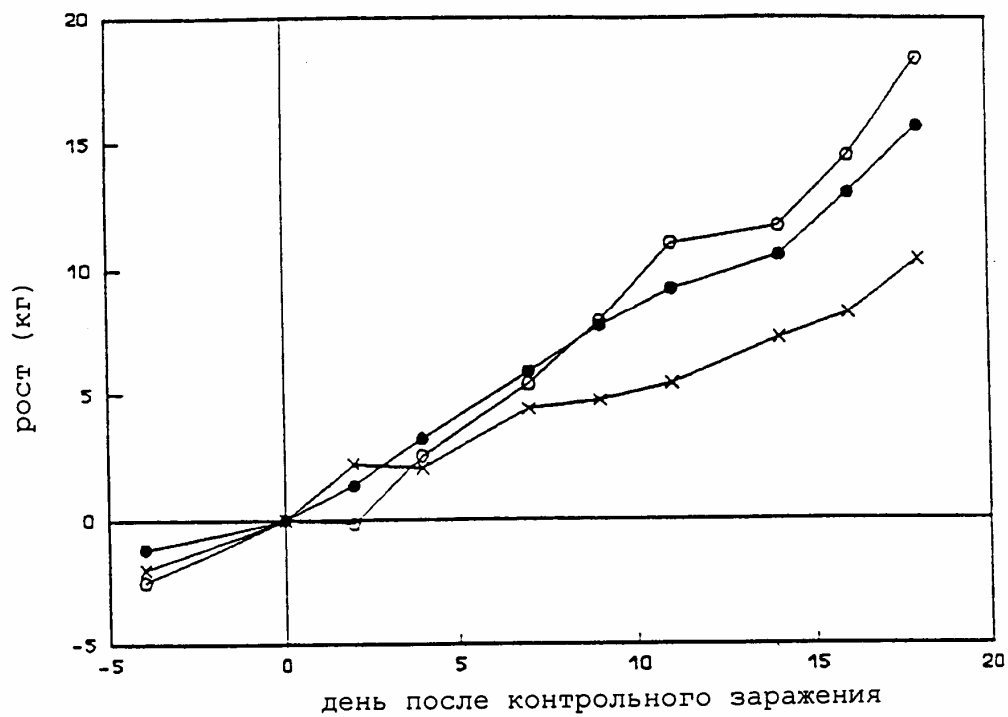
Фиг. 20



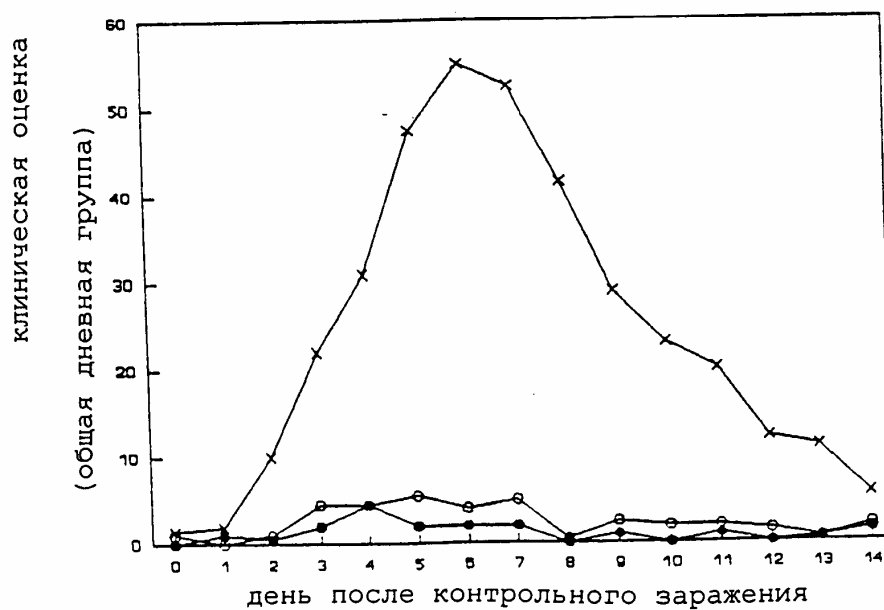
Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24

Тираж 50 экз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
 Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
 (03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03