

жоғарылайтынын, ал өсу деңгейіне жоғарғы сатысына жеткен ооциттердің белсенділігін төмендейтіні белгілі. Ооциттердің өсу барысында балау тесті ретінде бриллиант кристалдары бояуын пайдалану әдісінің (brilliant cresyl blue - BCB) экстракорпоральдық әдіспен ұрықтандыруға қабілетті ооциттер сұрыптауға мүмкіндік беретіні дәлелденген.

Кілт сөздер: донорлық ооциттер, brilliant cresyl blue (BCB - тест), ооцит-кумулюс кешендерін өсіру, фолликулогенез, мейоз.

Kuzmina T.I., Ussenbekov Y.S., Bimenova J.J.

ON THE RESULTS OF BCB (BRILLIANT CRESYL BLUE) TEST BOVINE OOCYTES THAT HAVE FINISHED GROWTH PHASE IN VIVO OR IN VITRO

Annotation

The article presents the results of the study of the functional state of oocytes of cows (the growth phase of completion) using vital brilliant crystalline dye (brilliant cresyl blue - BCB) - an indicator of activity of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase. Established that the enzyme activity in the growing oocyte increases, the time of completion of growth - is reduced. The use as a diagnostic test for in vivo testing of oocytes diamond crystalline dye (brilliant cresyl blue - BCB) allows the selection of competent oocytes suitable for in vitro fertilization.

Keywords: donor oocytes, brilliant cresyl blue (BCB - test), the cultivation of the oocyte-cumulus complex, folliculogenesis, meiosis.

ӘОЖ 619:616.921.5;636.3

Майлыбаева А.М., Рыскельдинова Ш.Ж., Асанжанова Н.Н., Қыдырбаев Ж.Қ.,
Еспембетов Б.А., Сармыкова М.К., Табынов Қ.Қ.

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты

ТҰМАУ ВИРУСТЫҚ ВЕКТОРЛАРЫНЫҢ БРУЦЕЛЛЕЗДІК OMP19 ЖӘНЕ CU-ZN SOD ПРОТЕИНДЕРІН ЭКСПРЕССИЯЛАЙТЫН ГЕНЕТИКАЛЫҚ ЕНДІРМЕЛЕРІНІҢ ТҰРАҚТЫЛЫҒЫН БАҒАЛАУ

Аңдатпа

Тұмау вирустық векторларының бруцеллездік Omp19 және CU-ZN SOD протеиндерін экспрессиялайтын генетикалық ендірімдерінің тұрақтылығын бағалау мәліметтері көрсетілген. Аталмыш зерттеу жұмыстарының нәтижесі бойынша шекті сұйылту арқасында алынған Flu-NS1-124-Omp19-H5N1 және Flu-NS1-124-SOD-H5N1 вирустық конструкциялардың тауық эмбриондарындағы әр түрлі пассаж деңгейінде бруцеллездік ендірімдердің тұрақтылығы анықталды.

Кілт сөздер: бруцеллез, бруцеллездік ендіріме, вектор, экспрессия, эмбрион, биологиялық белсенділік, генетикалық тұрақтылық, тұмау вирусы.

Кіріспе

Бруцеллез ауылшаруашылық малдарының арасында жиі кездесетін инфекциялық ауру. Қазіргі уақытта бруцеллездің алдын алу үшін *B. abortus* S19, RB51 вакциналары шаруашылықтарда қолданады. Аталған вакциналардың тиімділігімен қатар бірнеше кемшіліктері де бар: буаз малдың іш тастауы, вакцинацияланған сиыр сүтінің құрамында вакциндік штамдардың кездесуі, аурудың жануарлар мен адамдар арасында қайталап

таралуына себеп болуы мүмкін [1, 2]. Сондықтан, бруцеллезге қарсы тиімді және қауіпсіз вакцина дайындау өзекті мәселелердің бірі болып табылады.

Осы мәселені шешу мақсатында Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институтында (БҚПФЗИ) рекомбинантты тұмау вирусы негізінде OMP19 немесе CU-ZN SOD бруцеллез белоктарын экспрессиялайтын бруцеллезге қарсы векторлық вакцина жасау технологиясы даярланды.

Даярланған вакцинаның протективтілігі *B. abortus* S19 штамынан алынған қолданыстағы препаратынан кем түспеді [3, 4], ал қауіпсіздігі қолданыстағы вакциналардан (*B. abortus* S19, 82, RB51) басым түсті [5, 6]. Векторлық вакцинаның тағы бір артықшылығы әр түрлі жастағы ірі қараға (ІҚМ), буаз малға, бруцеллезден сау және бруцеллезбен ауыратын малдарға егуге болады.

Сонымен қатар жануарларды прайм (H5N1 субтипті вектормен) және бустерлі (H1N1 субтипті вектормен) вакцинациялау әдістері қолданылды. Бұл әдіс жануарларды бірінші вакцинациялаудан кейінгі қалыптасқан иммундық фонды вирустық векторлармен тиімді өтуіне жағдай жасайды. Ірі қара малы (ІҚМ) бустерлі вакцинациялаудан кейінгі иммунды жауаптың ұзақтылығы 12 айға дейін сақталады [7]. Бруцеллезге қарсы даярланған вакцина буаз малдарға қауіпсіз [5] және буаз малдарды *B. melitensis* қоздырушысы тудыратын аурулардан қорғайды [8].

Векторлық вакцинаны дайындауда (технологиялық сатысында) бруцеллездік ендірімелердің тұрақтылығын анықтау маңызды сатылардың бірі болып табылады. Бруцеллездік ендірімелердің кері генетика әдісін қолдана отырып, рекомбинантты тұмау вирусына орналастыру арқылы алынған вакцина малдардың протективті иммунитетінің пайда болуын толығымен қамтамасыз етеді.

Зерттеудің мақсаты тұмау вирусы векторлары NS1-124-Omp19 (H5N1), Flu-NS1-124-SOD (H5N1) орналасқан бруцеллездік ендірімелердің тұрақтылығын 1-ші және 14 пассаж аралығында пассаждау нәтижелерін анықтауға негізделген.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Тауық эмбриондарында вирустарды өсіру. Вирус суспензиясын 10 күндік тауық эмбриондарының аллантаис сұйықтығына еге отырып, 34°C температурада 48 сағатта инкубацияладық. Әдістеменің ережесіне сәйкес 48 сағаттан соң тауық эмбриондарын 4°C мұздатқышқа салқындатуға қойылды. Зерттеу барысында келесі вирустық векторларды Flu-NS1-124-Omp19 (H5N1), Flu-NS1-124-SOD (H5N1) ТЭ 1-ші, 5-ші және 14-ші пассаж деңгейінде өсіру көзделді.

Рекомбинантты вирус векторлары конструкцияларының инфекциялық және гемагглютининдік титрін анықтау. Рекомбинантты вирус векторлары конструкцияларының инфекциялық және гемагглютининдік титрін жалпы қолданылатын әдіспен анықтадық.

РНҚ-ны бөліп алу. Вирус суспензиясынан QIAmp Viral RNA Mini Kit, «Qiagen» жиынтығын қолданып вирустық РНҚ-ны бөліп алдық.

Кері транскрипция (КТ) - ПТР- анализі. КТ - ПТР өнімін жинау үшін «Invitrogen» фирмасынан Super Script III One-Step RT-PCR with platinum Taq жиынтығы және амплификациялау мақсатта GeneAmp PCR System 9700, «Applied Biosystems» термоциклері қолданылды. Амплификациялау мақсатында келесі параметрлерге жүгіндік: 98°C-та 30 с, 30 кезеңді – 94°C-та 20 с, 56°C-та 20 с, 68°C-та 3 мин, 68°C-та 7 мин.

Зерттеу жұмысының нәтижесін статистикалық өңдеу. Тәжірибеде алынған нәтижелерді түрлендіргіш айнымалы таңдаудың статистикалық өңдеуде баршаға белгілі тәсілін қолдандық. Орташа мәні (X), және оның орташа екі дәрежелі қатесі (m) анықталды. Аталған екі мәннің арасындағы ерекшеліктің нақтылығын GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) статистикалық программасымен анықтадық. *P* мәні > 0,05 болған жағдайда нақты болып есептелді.

Зерттеу нәтижелері және талдау

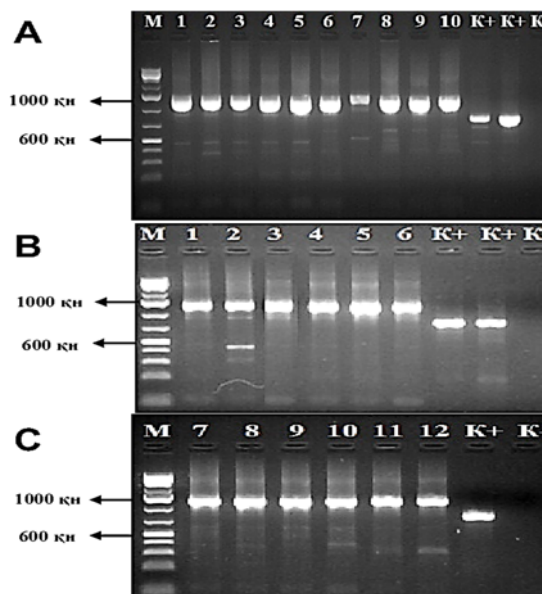
Зерттеудің нәтижесі бойынша, барлық вирусты конструкциялар тауық эмбриондарында репродуктивті қасиеттері бар екендігі дәлелденді. Вирус конструкцияларын тауық эмбриондарында пассаждау кезіндегі инфекциялық және гемагглютининдік титрі кестеде көрсетілген.

Кесте – Вирус конструкцияларын тауық эмбриондарында өсіру барысындағы инфекциялық және гемагглютининдік титрі

Тауық эмбриондарының пассаж деңгейі	Инфекциялық ($\log_{10}$ ЭИД ₅₀ /мл)/гемагглютининдік белсенділік	
	Flu-NS1-124-Omp19-H5N1	Flu-NS1-124-SOD-H5N1
1	7,95±0,22/1:16	7,12±0,08/1:8
3	8,28±0,08/1:16	7,95±0,14/1:16
5	8,03±0,30/1:32	8,03±0,08/1:16
7	8,12±0,22/1:32	7,87±0,30/1:16
10	8,20±0,14/1:16	7,95±0,14/1:32
12	8,45±0,14/1:16	8,12±0,22/1:16
14	8,03±0,30/1:32	7,95±0,22/1:16

Кестеден көріп отырғанымыздай, шекті сұйылту әдісімен алынған Flu-NS1-124-Omp19-H5N1 және Flu-NS1-124-SOD-H5N1 вирус конструкцияларының 14 пассаж бойы алынған нәтижелері бірқалыпты, олардың орташа инфекциялық титрі $7,12 \pm 0,08$ мен $8,45 \pm 0,14 \log$ ЭИД₅₀/мл аралығында болды. Шекті сұйылту әдісімен алынған Flu-NS1-124-Omp19-H5N1 және Flu-NS1-124-SOD-H5N1 вирус конструкцияларының инфекциялық көрсеткіштері, алдыңғы біздің зерттеу жұмыстарына [8-9] сәйкес келеді.

Зерттеу жұмыстары КТ-ПТР-да *NSI* гені, шекті сұйылту нәтижесінде алынған Flu-NS1-124-Omp19-H5N1 және Flu-NS1-124-SOD-H5N1 вирус конструкцияларының 14 пассаж бойы тауық эмбриондарында бруцеллездік ендірімелердің тұрақтылығын сақтайтындығын көрсетті (сурет).



Сурет – Тұмау вирустық векторларының тауық эмбриондарындағы бруцеллездік ендірімелердің тұрақтылығы.

А: Вектор Flu-NS1-124-Omp19 (М) – маркер; (1) - 4 пассаж; (2) - 5 пассаж; (3) 6 пассаж; (4) - 7 пассаж; (5) - 8 пассаж; А: Flu-NS1-124- SOD (6) - 4 пассаж; (7) – 5 пассаж; (8) – 6 пассаж; (9) – 7 пассаж; (10) – 8 пассаж; (К+) – А/NYMC X217(H3N2) тұмау вирусының бастапқы штамы, (К+) – А/PR/8/34(H1N1) тұмау вирусының бастапқы штамы, (К-) – теріс бақылау.

В: Вектор Flu-NS1-124-Omp19 (М) – маркер, (1) – 9 пассаж, (2) – 10 пассаж, (3) – 11 пассаж, (4) – 12 пассаж, (5) – 13 пассаж, (6) – 14 пассаж, (К+) - А/NYMC X217(H3N2) тұмау вирусының бастапқы штамы, (К+) – А/PR/8/34(H1N1) тұмау вирусының бастапқы штамы, (К-) – теріс бақылау.

С: Вектор Flu-NS1-124- SOD (М) – маркер, (7) – 9 пассаж, (8) – 10 пассаж, (9) – 11 пассаж, (10) – 12 пассаж, (11) – 13 пассаж, (12) – 14 пассаж, (К+) – А/PR/8/34(H1N1) тұмау вирусының бастапқы штамы, (К-) – теріс бақылау.

Зерттеу жұмыстары КТ-ПТР-да *NSI* гені, шекті сұйылту нәтижесінде алынған Flu-NS1-124-Omp19-H5N1 және Flu-NS1-124-SOD-H5N1 вирусты конструкциялары 14 пассаж бойы тауық эмбриондарында бруцеллездік ендірімелердің тұрақтылығын сақтайтындығын көрсетті. Құрамында бруцеллездық белоктары Omp19 және SOD бар вирусты конструкциялардың *NSI* гендерінің көлемі 1110 және 1242 кұрады және бруцеллездық ендірімелердің бар екендігін көрсетті.

Қорытынды

Қорыта келгенде, шекті сұйылту нәтижесінде алынған Flu-NS1-124-Omp19-H5N1 және Flu-NS1-124-SOD-H5N1 вирусты конструкциялар 14 пассажда тауық эмбриондарында бруцеллездік ендірімелер тұрақтылығын сақтады. Рекомбинантты тұмау вирусындағы бруцеллездік ендірімелердің тұрақтылығы жануарларда тұрақты протективті иммунитеттің пайда болуына негіз болады.

Әдебиеттер

1. Шувалова Е.П. Инфекционные болезни. – М.- 2005. – 836 с.
2. Schurig G.G, Sriranganathan N, Corbel M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future // Vet Microbiol. – 2002. – Vol.90. – P.479-496.
3. Tabynov K., Yespembetov B., Sansyzbay A. Novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on influenza A viruses expressing *Brucella* L7/L12 or Omp 16 proteins: evaluation of protection in pregnant heifers // Vaccine. – 2014.- 32(45). – P.5889-92.
4. Tabynov K., Kydyrbaev Zh., Ryskeldinova Sh., Yespembetov B., Zinina N., Assanzhanova N., Kozhamkylov Y., Inkarebekov D., Gotskina T., Sansyzbay A. Novel influenza virus vectors expressing *Brucella* L7/L12 or Omp 16 proteins in cattle induce a strong T-cell immune response, as well as high protectiveness against *B. abortus* infection // Vaccine. – 2014. - 32(18). – P .2034-41.
5. Tabynov K., Ryskeldinova Sh., Kydyrbaev Zh., Sansyzbay A. Safety of the novel influenza viral vector *Brucella abortus* vaccine in pregnant heifers // Ciencia Rural. – 2016. - 46(1). – P.114-118.
6. Tabynov K., Kydyrbaev Zh., Ryskeldinova Sh., Yespembetov B., Syrymkyzy N., Akzhunusova I., Sansyzbay A. Safety of the novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on recombinant influenza viruses expressing *Brucella* L7/L12 and OMP16 proteins, in cattle // Journal of Vaccines and Immunology. – 2014. -№1. – 101p.
7. Tabynov K., Yespembetov B., Ryskeldinova Sh., Zinina N., Kydyrbaev Zh., Kozhamkulov Y., Inkarebekov D., Sansyzbay A. Prime-booster vaccination of cattle with an influenza viral vector *Brucella abortus* vaccine induces a long-term protective immune response against *Brucella abortus* infection // Vaccine. – 2016. – 34. – P.438 – 444.

8. *Tabynov K., Ryskeldinova S., Sansyzbay A.* An influenza viral vector Brucella abortus vaccine induces good crossprotection against Brucella melitensis infection in pregnant heifers // Vaccine. – 2015. - 33(31). – P.3619 – 23.

9. *Садикалиева С.О. Тасыбаева А.С., Султанкулова К.Т., Шораева К.А., Бурашев Е.Д., Строчков В.М., Табынов К.К., Рыскельдинова Ш.Ж., Сандыбаев Н.Т., Сансызбай А.Р.* Оценка стабильности рекомбинантного вируса Flu-NS1-80 L7/L12 (H1N1), экспрессирующий бруцеллезный антиген // Мат. межд. научной конф. молодых ученых «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности». Гвардейский; 2013; 165-172 с.

Майлыбаева А.М., Рыскельдинова Ш.Ж., Асанжанова Н.Н., Кыдырбаев Ж.К.,
Еспембетов Б.А., Сармыкова М.К., Табынов К.К.

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВСТАВОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БРУЦЕЛЛЕЗНЫЕ БЕЛКИ OMP19 И CU-ZNSOD ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ГРИППА

Аннотация

Представлены данные по оценке устойчивости генетических вставок, экспрессирующих бруцеллезные белки Omp19 и CU-ZN SOD вирусных векторов гриппа. В результате проведенных исследований на куриных эмбрионах определена устойчивость бруцеллезных вставок вирусных конструкций Flu-NS1-124-Omp19-H5N1 и Flu-NS1-124-SOD-H5N1, полученных методом предельного разведения на разных пассажных уровнях.

Ключевые слова: бруцеллез, бруцеллезная вставка, вектор, экспрессия, эмбрион, биологическая активность, генетическая устойчивость, вирус гриппа.

Mailybaeva A.M., Ryskeldinova Sh.Zh., Asanzhanova N.N., Kydyrbaev Zh.K.,
Espembetov B.A., Sarmykova M.K., Tabynov K.K.

ASSESSMENT OF STABILITY OF GENETIC INSERTIONS EXPRESSING BRUCELLOSIS PROTEINS OMP19 AND CU-ZN SOD OF INFLUENZA VIRAL VECTORS

Annotation

The work shows the data of assessing the stability of the genetic inserts, which express brucellosis proteins Omp19 and CU-ZN SOD of influenza viral vectors. As a result of these studies on chicken embryo the stability of brucellosis inserts of viral constructs Flu-NS1-124-Omp19-H5N1 and Flu-NS1-124-SOD-H5N1, produced by limiting dilution, at different levels of passage were determined.

Keywords: brucellosis, brucellosis insertion, vector, expression, embryo, biological activity, genetic resistance, influenza virus.