**КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН УЛУТТУК ИЛИМДЕР АКАДЕМИЯСЫ
БИОТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТУ**

**КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН УЛУТТУК ИЛИМДЕР АКАДЕМИЯСЫ
ТОО ФИЗИОЛОГИЯСЫ ЖАНА МЕДИЦИНА ИНСТИТУТУ**

Д 03.23.680 диссертациялык кеңеши

Кол жазма укугунда
УДК 619:615.375:578.821.21:577.112.6-083

Тайлакова Эльмира Талгатовна

РЕКОМБИНАНТТЫК ДНК ТЕХНОЛОГИЯСЫНЫН НЕГИЗИНДЕ КОЙ ЧЕЧЕГИНЕ КАРШЫ ВАКЦИНАНЫ ИШТЕП ЧЫГУУ

03.01.06 – биотехнология

Биология илимдеринин кандидаты окумуштуулук даражасын
изденип алуу үчүн жазылган диссертациянын
авторефераты

Бишкек – 2024

Иш Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтунун вирусология лабораториясында жана Казакстан Республикасынын Саламаттык сактоо министрлигинин Республикалык мамлекеттик ишканасына караштуу «Биологиялык коопсуздук көйгөйлөрү боюнча илим-изилдөө институтунун» молекулярдык биология жана гендик инженерия лабораториясында аткарылды.

Илимий жетекчиси: **Жунушов Асанкадыр Темирбекович**
ветеринария илимдеринин доктору, профессор, Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын академиги, Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтунун директору

Расмий оппоненттери: **Середа Алексей Дмитриевич**
биология илимдеринин доктору, профессор, Россия Федерациясынын Федералдык мамлекеттик бюджеттик илимий мекемесине караштуу «Федералдык вирусология жана микробиология илим-изилдөө борборунун» вирустардын геномикасы лабораториясынын башкы илимий кызматкери

Чекиров Кадырбай Бекбалаевич
биология илимдеринин кандидаты, доцент, Кыргыз-Түрк «Манас» университетинин биология бөлүмүнүн башчысы

Жетектөөчү уюм: Коммерциялык эмес акционердик коому «С. Сейфуллин атындагы Казак агротехникалык илим-изилдөө университети», ветеринария жана мал чарбачылыктын биотехнология факультетинин микробиология жана биотехнология кафедрасы (Казахстан Республикасы, Астана ш., Женис пр., 62).

Диссертациянын коргоосу 2024-жылдын 19-апрелде саат 13-00дө биология илимдеринин доктору (кандидаты) окумуштуулук даражасын коргоо боюнча Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институту жана тең уюуштуруучу Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Бийик тоо физиологиясы жана медицинасы институтуна караштуу Д 03.23.680 диссертациялык кеңешинин отурумунда өткөрүлөт. Дареги: 720071, Бишкек ш., Чүй просп., 265, 303-кабинет. Диссертацияны коргоонун видеоконференциясынын шилтемеси - https://vc.vak.kg/b/032-kpg-yve-qhh

Диссертация менен Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын китепканасынан (720071, Бишкек ш. Чүй просп., 265а) жана https://vak.kg/d_03_23_680/111151/ сайтынан таанышууга болот.

Автореферат 2024-жылдын 12-мартында таркатылды.

Диссертациялык кеңештин окумуштуу катчысы
биология илимдеринин кандидаты А. А. Казыбекова

ИШТИН ЖАЛПЫ МҮНӨЗДӨМӨСҮ

Диссертациянын темасынын актуалдуулугу. *Poxviridae* тукумундагы *Capripoxvirus*ту козгогон кой чечеги географиялык жактан өтө кеңири таралган, эпизоотия учурунда улуттук экономиканын ушул секторуна олуттуу экономикалык зыяндарды келтирүү менен көптөгөн өлкөлөрдө кой чарбасы үчүн ар дайым коркунуч алып келген. Ылаң бардык Түштүк-Чыгыш жана Борбордук Азияда, Индия жарым аралында, ошондой эле түндүк жана борбордук Африкада кеңири таралган. Акыркы жылдарда эпизоотиялык абалдын салыштырмалуу туруктуулугуна карабастан, Казакстан Республикасынын аймагына чек арага чектеш республикалардан инфекциянын кирип кетүү жана жайылуу коркунучу жогору [Weekly Disease Information, 2016, https://wahis.woah.org/#/event-management]. Эл аралык эпизоотиялык бюронун (ЭЭБ) маалыматы боюнча кой чечеги жаныбарлардын өзгөчө коркунучтуу ылаңдарынын тизмесине кирген [В. Н. Сюрин, 2001]. Кой чечегин алдын алуу үчүн инактивацияланган жана тирүү вакциналар иштелип чыккан. Ар кайсы өлкөлөрдүн окумуштууларынын изилдөөлөрү көрсөткөндөй, инактивацияланган вакциналар кыска мөөнөттүү иммунитетти камсыз кылат, баалары дагы кымбат жана башка бир катар олуттуу кемчиликтери бар [I. J. Prasad, 1973; M. P. Yadav, 1986]. Кой чечек вирусунун аттенуирленген штаммдарынан иштелип чыккан тирүү вакциналар койлордо кеминде бир жылга созулган иммунитетти камсыз кылат [В. В. Гуненков, 1993; Ф. П. Курченко, 1991]. Тирүү вакциналар калдык вируленттүүлүктүн жана жапайы типтеги патогендүүлүктүн реверсиясынын коркунучун сактайт, ошондой эле, айлана-чөйрөнү контаминациялоонун булагы болуп саналат. Рекомбинанттык вакциналар классикалык инактивдештирилген вакцинанын бир катар олуттуу кемчиликтерине ээ эмес жана тирүү аттенуацияланган вакциналардан айырмаланып, чектөөсүз колдонулушу мүмкүн. Вакцинанын бул түрүнүн негизги артыкчылыгы анын реактогендүүлүгүнүн төмөндүгүндө жана тирүү вирустун жоктугунда. Алгачкы изилдөөлөрдө *Capripoxvirus* тукумунун өкүлдөрү үчүн серологиялык реакцияларда кеминде 12 иммуногендик протеин аныкталган [Y. P. S. Malik, 2010; D. S. Sambyal, 1978].

Эрүүчү антигендердин иммуногендүүлүгү жана коргоочулугу эксперименталдык жактан далилденген [H. G. Hein, 1999]. Бирок, бүгүнкү күнгө чейин алардын айрымдары гана аныкталган [V. Bhanot, 2009]. Ошондой эле A4 (P17), A12, A27 (P18) каприпоксвирустарынын рекомбинанттык белокторун диагностикалык тесттерде колдонуу мүмкүнчүлүгү да көрсөтүлгөн [Е. С. Орлова, 2006].

Вириондогу татаал түзүлүш жана көп сандагы белок поксвирустардын иммуногендик белокторун аныктоону кыйындатат. *Poxvirus* белокторунун иммуногендик жана протективдик касиеттери *Orthopoxvirus* тукумунун

өкүлдөрү үчүн эң көп изилденген: уй жана чечек вирустары, алардын негизинде рекомбинанттык вакциналарды иштеп чыгуу боюнча изилдөөлөр жүргүзүлүүдө [J. W. Hooper, 2003; C. Fogg, 2006; A. Berhanu, 2008]. Казакстан Республикасынын Саламаттык сактоо министрлигинин Республикалык мамлекеттик ишканасына караштуу «Биологиялык коопсуздук көйгөйлөрү боюнча илим-изилдөө институтунда» (КР БККИИ) кой чечек вирусун изилдөө боюнча изилдөө иштери жүргүзүлдү. Натыйжада вакцинанын алгачкы геномдук структурасы жана кой чечек вирусунун вируленттик штаммдары аныкталды [E. R. Tulman, 2002]; бул козгогучтун штаммдарын дифференциациялоо үчүн рестрикциялык анализдик ыкма иштелип чыккан, ар кандай вирус камтыган материалдардан кой чечегин аныктоого ПТР жүргүзүү үчүн оптималдуу шарттар тандалып алынган [N. T. Sandybayev, 2003]. «Казакстан Республикасында 2006-2008-жылдарга биотехнологиялык кластерди түзүүнүн заманбап технологияларын иштеп чыгуу» боюнча Ц.0382 программасынын алкагында БККИИнин кызматкерлери тарабынан кой чечек вирусунун А33 белокту экспрессиялоочу рекомбинанттык ДНКны алуу боюнча иштерди жүргүзүлдү. Азыркы учурда кой чарбасы мал чарбасынын негизи болуп саналган Казакстандын жана чектеш мамлекеттердин айыл чарбасы үчүн поксвирустарга каршы жаңы муундагы вакциналарды түзүү боюнча илим-изилдөөлөр өтө актуалдуу милдет болуп саналат. Ар кандай экологиялык жана техногендик факторлордун таасиринин фонунда коркунучтуу жугуштуу оорулардын жана өзгөчө вирустук этиологиянын козгогучтарынын жаңы варианттарынын пайда болушун жокко чыгарууга болбойт. Мындай таасирдин белгилери бир катар вирустардын антигендик касиеттеринин жана патогендүүлүгүнүн өзгөрүшүнөн, ошондой эле ылаңдын өзүндө байкалат. Мындай учурларда патогендерди диагностикалоо жана алдын алуу үчүн молекулярдык-биологиялык жана гендик инженерия ыкмаларын колдонуу инфекцияны аныктоодо жана анын оор кесепеттерин жоюуда стратегиялык каталарды болтурбоого мүмкүндүк берет.

Диссертациянын темасынын приоритеттүү илимий багыттар, ири илимий программалар (долбоорлор), билим берүү жана илимий мекемелер тарабынан жүргүзүлүүчү негизги илимий-изилдөө иштери менен байланышы. Диссертациялык иш Казакстан Республикасынын Саламаттык сактоо министрлигинин Республикалык мамлекеттик ишканасына караштуу «Биологиялык коопсуздук көйгөйлөрү боюнча илим-изилдөө институтунда» 2015-2017-жылдар үчүн «Кой чечек ылаңынын алдын алуу боюнча рекомбинанттык вакцина» аттуу № 0115РК01983 мамлекеттик каттоодон өткөн республикалык илимий гранттын алкагында аткарылган.

Изилдөөнүн максаты. Бактериялык экспрессияланган вирустук белоктордун негизинде кой чечектин алдын алуу үчүн рекомбинанттык вакцинаны иштеп чыгуу.

Изилдөөнүн милдеттери:

1. Рекомбинанттык плазмидаларды куруу, генди экспрессиялоо жана кой чечек вирусунун рекомбинанттык белокторун тазалоо.

2. Кой чечек вирусунун рекомбинанттык белокторунун иммуногендик жана антигендик касиеттерин изилдөө.

3. Рекомбинанттык вирустук белоктордун негизинде вакцинаны өндүрүү технологиясын иштеп чыгуу.

4. Кой чечекке каршы рекомбинанттык вакцина үлгүлөрүнүн коопсуздугун, иммуногендүүлүгүн, протективдүүлүгүн жана сакталуусун изилдөө.

Алынган натыйжаларынын илимий жаңылыгы. Молекулярдык биологиянын жана гендик инженериянын заманбап ыкмаларын колдонуу менен кой чечек вирусунун бактериалдык экспрессияланган рекомбинанттык белоктору алынды SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122(A33) и SPPV141 (B5). SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33) жана SPPV141 (B5) - жаныбарлардагы вирусту нейтралдаштыруучу антителолорду өндүрүүнү шарттай тургандыгы аныкталган. Рекомбинанттык вакцинаны чыгаруунун технологиясы иштелип чыккан. Вирустук белоктордун негизинде рекомбинанттык гидроокисьалюминдик вакцина алынган SPPV060 (L1), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33). Рекомбинанттык вакцинанын коопсуздугу жана туруктуулугу изилденген. Рекомбинанттык вакцинанын иммуногендик натыйжалуулугу жана протективдүүгү изилденген.

Жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн натыйжасында ойлоп табууга Казакстан Республикасынын Юстиция министрлигинин Республикалык мамлекеттик мекемесинин «Улуттук интеллектуалдык менчик институту» тарабынан берилген № 32951 номери менен патент алынган.

Алынган натыйжаларынын практикалык маанүүлүгү. Рекомбинанттык ДНК технологиясын колдонуу менен жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн натыйжасында кой чечек вирусуна каршы коопсуз, иммуногендик жана натыйжалуу вакцина иштелип чыкты.

Жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн негизинде ветеринардык-биологиялык өнөр жай үчүн төмөнкү рекомбинанттык вакциналарды өндүрүү технологиясы боюнча ченемдик-техникалык документтер (ЧТД) иштелип чыккан: кой чечегинин алдын алуу үчүн рекомбинанттык вакцинаны уюштуруу стандарты [СТ 405-1919-04 ГП-099-2017], кой чечегинин алдын алуу үчүн рекомбинанттык вакцинаны өндүрүү жана көзөмөлдөө боюнча

нускама, кой чечегине каршы рекомбинанттык вакцинаны колдонуу боюнча көрсөтмө.

Практикалык колдонуу үчүн сунушталган ЧТД БККИИнин окумуштуулар кеңешинде жактырылган жана 2017-жылдын 23-октябрында институттун башкы директору тарабынан бекитилген.

Ошондой эле, 2017-жылдын 24-июлундагы 65/09-06 менен 2017-жылдын 1-августундагы 66/09-06 комиссиялык сыноолордун актысы жана илимий-изилдөө (диссертациялык) иштердин натыйжаларын өндүрүшкө киргизүү актысы да алынды.

Иштелип чыккан рекомбинанттык вакцинаны кой чечектин алдын алуунун коопсуз каражаты катары ветеринарияда колдонууга болот. Ошондой эле, изилдөөлөрдүн натыйжасында алынган кой чечектин бактериалдык экспрессияланган рекомбинанттык белоктору диагностикалык каражаттарды өндүрүүдө колдонулушу мүмкүн.

Алынган натыйжаларынын экономикалык маанилүүлүгү. Иш үй жана жапайы жаныбарлардын ден соолугун сактоого багытталган жана маанилүү. Жаныбарларды эмдөө мал чарба фермаларын чыгашалардан коргойт, жугуштуу козгогучтардын үй жаныбарларынан жапайы жаныбарлардын популяциясына жугушун жок кылат, бул биологиялык ар түрдүүлүктү сактоого жана экологиялык системалардын туруктуулугуна оң таасирин тийгизет. Ошондой эле мал чарбачылыгын өнүктүрүүгө, биологиялык ар түрдүүлүккө, азык-түлүк коопсуздугун жана тамактанууну камсыз кылууга таасир этүүчү малдын чечек ыланынын алдын алуу.

Диссертациянын коргоого коюлуучу негизги жоболору:

1. Рекомбинанттык плазмиддик ДНК ген экспрессиясын камсыз кылат, анын натыйжасында иммуногендик жана антигендик касиетке ээ кой чечек вирусунун рекомбинанттык белоктору пайда болот.

2. Рекомбинанттык вакцинаны өндүрүүнүн иштелип чыккан технологиясы, анын ичинде өндүрүш учурундагы көзөмөлдүк пункттар жана даяр препараттар, стандартташтырылган иммунобиологиялык препаратты өндүрүүгө мүмкүндүк берет.

3. Рекомбинанттык вакцина иммундук жооптун өнүгүшүн камсыздайт жана төрт жолку саюудан кийин натыйжалуу болот.

Изденүүчүнүн жеке салымы. Иштин бардык бөлүмдөрү автордун жеке катышуусу менен аткарылган.

Изилдөөнүн натыйжаларын апробациялоо. Иштин негизги натыйжалары: эмгек сиңирген окумуштуу, профессор В. Л. Зайцевдин 90 жылдыгына арналган «Биологиянын, биотехнологиянын, экологиянын жана биологиялык коопсуздуктун актуалдуу көйгөйлөрү» аттуу Эл аралык илимий-практикалык конференциясында (Алматы, 2015); Жаш

окумуштуулардын II Эл аралык конференциясында: биотехнологдор, молекулярдык биологдор жана вирусологдор (Новосибирск, 2015); XXI International Poxvirus Asfavirus and Iridovirus Conference, (Strasbourg, 2016), Эл аралык «Астана Биотех» симпозиумунда (Астана, 2018), XXII International Poxvirus, Asfarvirus and Iridovirus Conference (Taiwan, 2018), Биологиялык коопсуздук көйгөйлөрү боюнча илим-изилдөө институтунун 60 жылдыгына арналган «Биотехнология жана биологиялык коопсуздук: жетишкендиктер жана өнүгүү келечеги» аттуу Эл аралык илимий-практикалык конференциясында (Алматы, 2023).

Диссертациянын натыйжаларынын басылып чыгарылышы. Диссертациянын материалдарынын негизинде 5 илимий макала жарыкка чыккан, анын ичинен 1 макала «Web of science» системасы тарабынан индекстелген мезгилдүү илимий басылмада, 1 макала РИНЦ системалары аркылуу индекстелүүчү импакт-фактору 0,1ден кем эмес илимий басылмада, 2 макала рецензияланган илимий мезгилдүү басылмалардын тизмесине кирген илимий басылмаларда чыккан жана № 32951 Казакстан Республикасынын 1 патенти алынган.

Диссертациянын түзүлүшү жана көлөмү. Диссертация 159 бетте компютердик текстте терилген, киришүүдөн, адабий серептен, эксперименталдык изилдөөлөрдүн материалдарынан жана методдорунан, жеке изилдөөлөрдүн натыйжалары жана аларды талкулоодон, корутундудан, тыянактардан, практикалык сунуштамалардан, колдонулган адабияттардын 218 тизмесинен жана 4 тиркемелерден турат. Иш 11 таблица жана 22 сүрөт менен иллюстрацияланган.

ДИССЕРТАЦИЯНЫН НЕГИЗГИ МАЗМУНУ

Киришүүдө жүргүзүлгөн иштин актуалдуулугу, анын максаты жана милдеттери, илимий жаңылыгы, практикалык жана экономикалык мааниси, диссертациянын коргоого коюулуучу негизги жоболору, изилдөөнүн натыйжаларынын апробациясы көрсөтүлгөн.

1-бап. Адабий сереп. Диссертациялык иштин темасы боюнча адабий маалыматтарды талдоонун жыйынтыгы көрсөтүлгөн. Тарыхый маалыматтардын сыпаттамасы, кой чечектин жалпы мүнөздөмөсү, кой чечеги боюнча дүйнөдөгү эпизоотиялык кырдаал, кой чечегинин алдын алуу жана диагностикасы боюнча маалыматтар, кой чечектин антигендик белоктору жана рекомбинанттык белокторду түзүүчү ген экспрессия системалары жөнүндө маалыматтар берилген.

2-бап. «Изилдөөнүн материалдары жана ыкмалары». иштин жүрүшүндө колдонулган негизги ыкмалары жана изилдөө объектисин мүнөздөгөн маалыматтар чагылдырылган.

Изилдөө объектиси: кой чечек вирусунун «НИСХИ» штаммы, кой чечек вирусунун рекомбинанттык белоктору. Изилдөөнүн айрым этаптарын жүргүзүүдө Казакстан Республикасынын Республикалык мамлекеттик ишканасына караштуу «Биологиялык коопсуздук көйгөйлөрү боюнча илим-изилдөө институтунун» (КР БККИИ) микроорганизмдер коллекциясынан алынган EVC_02 штамм эктромелия вирусу, эпизоотиялык кой чечек вирусу, штамм «А», кой чечек вирусу rSPPV(TK-)EGFP КР БККИИнин молекулярдык биология жана генетикалык инженерия лабораториясында алынган.

Изилдөө предмети. Рекомбинанттык технологияларды колдонуу менен кой чечекке каршы вакцинаны иштеп чыгуу.

Изилдөө ыкмалары. Диссертациялык ишти аткарууда төмөнкү методдор колдонулган: молекулярдык-генетикалык, вирусологиялык, иммунологиялык жана биотехнологиялык.

Гендерди экспрессиялоо үчүн плазмидаларды куруу рекомбинанттык белокторду түзүүчү кой чечек вирусунун максаттуу белокторунун аминокислота ырааттуулугун талдоо жолу менен, андан кийин Vector NTI 10.0.1 программасын колдонуу менен спецификалык праймерлерди долбоорлоо жана синтездөө жолу менен ишке ашырылган. Кой чечек вирусунун «НИСХИ» штаммынын геномдук ДНКсынан гендердин нуклеотиддик ырааттуулугун күчөтүү иштерин жүргүздүк. Күчөтүү продуктулары өндүрүүчүнүн көрсөтмөлөрүнө ылайык pGEM-T-vector клондолгон. Плазмидаларда кыстаруу бар экендиги EagI менен рестрикциялоо анализи менен тастыкталган. Секвенирлөөдөн кийин туура ырааттуулуктар pET26b(+) клондолду. Компетенттүү *E.coli* клеткалары рекомбинанттык плазмиддик ДНК менен өзгөртүлгөн.

Кой чечек вирусунун рекомбинанттык белокторун алуу үчүн ген экспрессиясы *E.coli* бактериялык клеткаларында жүргүзүлдү, индуктор катары изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) колдонулган.

Кой чечек вирусунун рекомбинанттык белокторун тазалоо денатурациялоочу жана гибриддик шарттарда HisPur Cobalt Superflow агарозасын колдонуу менен аффиндик хроматография аркылуу аткарылды.

Чычкандарды иммунизациялоо кой чечек вирусунун белокторунун иммуномоделдештирүү касиеттерин баалоо үчүн вестерн блотунда белок препараттары менен иммунизацияланган чычкандардын кан сывороткасын изилдөө жолу менен ишке ашырылган жана EVC_02 ectromelia вирусунун штаммын колдонуу менен вирусту нейтралдаштыруу реакциялары жүргүзүлгөн.

Laemmli боюнча кой чечек вирусунун алынган рекомбинанттык белоктордун тазалыгынын жана аныктыгынын дэңгээлин баалоо үчүн **ДСН-**

ПААГ-электрофорез жана вестерн блоту [U. K. Laemmli, 1970] же His (C-term)-AP каршы антителолорду же эксперименталдык жол менен кой чечек вирусун жуктурган койлордон алынган антисыворотканы колдонуу менен иммунодетациялоо жолу менен ишке ашырылды.

Белоктордун концентрациясын аныктоону Lowry [O. H. Lowry, 1951] ыкмасы менен жүргүздүк. **Тазалыгын аныктоо** 28085-2013 ГОСТу боюнча.

Сорбцияланган препараттарда белоктордун санын аныктоо десорбцияны колдонуу менен, андан кийин белоктун көлөмүн аныктоо аркылуу ишке ашырылган.

Иммуноферменттик анализ 6 lg $ТЦД_{50}$/мл кой чечек вирусун колдонуу менен гумоpалдык иммундук жооптун деңгээлин аныктоо үчүн колдонулган.

Вирусту нейтралдаштыруу реакциясы 5,5 lg $ТЦД_{50}$/млден кем эмес активдүүлүгү менен rSPPV(TK-)EGFP кой чечек вирусун колдонуу менен ишке ашырылган.

Рекомбинанттык вакцинанын коопсуздугун аныктоо үчүн 6-8 жумалык чычкандарга (n=10) 0,2 мл 3 жолудан булчуңга жана койлорго (n=4) 1 жумалык интервал менен 1 мл 21 күн аралыгы менен үч жолу эмдөө жүргүзүлдү. Жаныбарлардын көзөмөл тобуна плацебо (ФБР/ГОА) берилди.

Рекомбинанттык вакцинанын иммуногендүүлүгүн жана протективдүүлүгүн аныктоо койлорду (n=4) 8-9 айлык кезинде иммунизациялоо жолу менен жүргүзүлдү; рекомбинанттык вакцина булчуңга (практикага сунушталган ыкма) 1 мл үч жолу 21 күн аралыгында сайылды. Терс көзөмөлдүк топтун койлоруна (n=2) стерилденген физиологиялык эритиндилер да ушундай эле жол менен эмделген. Биринчи эмдөөдөн кийин 9 жума бою жумасына бир жолу кандын үлгүлөрү ИФАда сывороткадагы антителолордун топтолуу деңгээлин аныктоо үчүн алынган. Вакцинанын протективдүүлүгүн аныктоо үчүн OIE Terrestrial Manual ылайык көзөмөлдүк инфекцияны жуктуруу жүргүзүлдү.

Алынган маалыматтарды **статистикалык анализ** Microsoft Excel жана GraphPad Prism версиясындагы 6.0 компьютердик программаларын колдонуу менен бир тараптуу дисперсияны анализдөө, андан кийин Даннеттин көп салыштыруу тести жана Тьюкинин ыкмасы менен жүргүзүлдү. $P<0,05$ маанилери статистикалык мааниге ээ болду.

3-бапта жеке изилдөөлөрдүн натыйжалары көрсөтүлгөн.

3.1 Рекомбинанттык плазмиддердин курулушу, генди экспрессиялоо жана рекомбинантты кой чечек вирусунун белокторун тазалоо. Кой чечек вирусунун максаттуу белокторунун гендеринин нуклеотиддик жана аминокислота тизмегинин анализи SPPV060 (ортолог L1),

SPPV074 (ортолог H3), SPPV122 (ортолог A33) жана SPPV141 (ортолог B5) кой чечек вирусунун төрт белогунун N- же C-терминалында трансмембраналык домендердин бар экендигин көрсөттү. Ал эми бул домендер SPPV095 (ортолог A4) жана SPPV117 (ортолог A27) белокторунун аминокислота тизмегинде жок болгон.

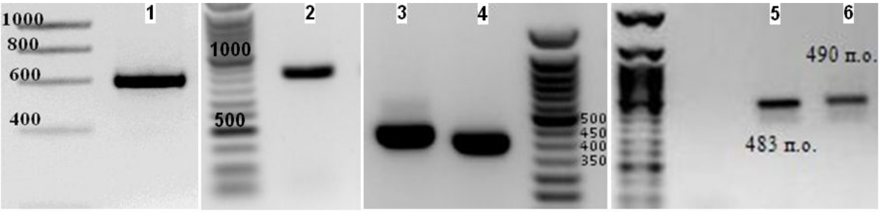
Домендери бар бул аймактарды эске алуу менен спецификалык праймерлер иштелип чыккан (3.1-таблица)

3.1-таблица. – Кой чечек вирусунун гендерин амплификациялоо үчүн колдонулган праймерлер

Ген	Праймер	Ырааттуулук
sppv060	L1R-f	5'-tcc*atg*ggagcagccgca-3'
	L1R-r	5'-ttgttaagctttctgccatttt-3'
sppv074	H3L-f	5'-ctcc*atg*gttataccaatcgttggtcgcgaaatttcaga-3’
	H3L-r	5'- cgctcgagtcactagtgatggtgatggtgatgaaatgaaaccaatggatg-3’
sppv095	A4L-f	5’-cccat*atg*gacttatgaaaaaatatac-3’
	A4L-r	5’-gcggccgctttgctgttattatcatcc-3’
sppv117	A27L-f	5’-gcatctcgagtcactttagtgttgtaattcttcctgttt-3’
	A27L-r	5’-gcatcat*atg*gacagagcgttatcaatctttccaggcga-3’
sppv122	A33R-f	5’-cccat*atg*catcatcatcatcatcatgcattttttaat-3’
	A33R-r	5’-ccctcgagttattaaagttcatcatgaaaaaaagatcttacacagtaata-3’
sppv141	B5R-f	5’-cccat*atg*atgttattgattttattatgt-3’
	B5R-r	5’-gcggccgctaatattttatcaaagta-3’

Эскертүү: чектөө сайттары асты сызылган, баштоо кодону курсив менен жазылган.

С использованием праймеров указанных в данной таблице были амплифицированы целевые гены вируса оспы овец (рисунок 3.3).

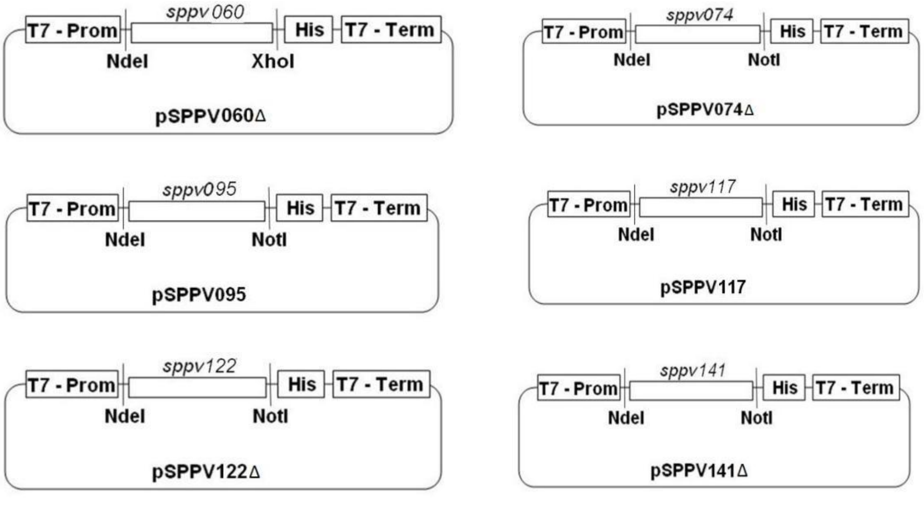


3.3-сүрөт – Кой чечек вирусунун ген продуктуларынын ПЦР электрофоретикалык профили.

1 – sppv060, 2 – sppv074, 3 – sppv117, 4 – sppv122, 5 – sppv095, 6 – sppv144.

Sppv060, sppv074, sppv095, sppv117, sppv122, sppv141 гендердин амплификациялык продуктуларынын өлчөмү тиешелүүлүгүнө жараша 570, 850, 483, 460, 435, 490 түздү.

Андан кийин, кой чечек вирусунун гендеринин ПЦР продуктулары кийинки секвенирлөө жана туура конструкцияларды тандоо үчүн pGEM-T векторуна клондолгон. Максаттуу гендердин туура ырааттуулугу pET26 b(+) экспрессия векторуна T7 фагдын промоторунун көзөмөлүндө субклондолду. Sppv074, sppv117, sppv122, sppv095 жана sppv141 гендери NdeI жана NotI сайттарында, sppv060 гени NdeI жана XhoI сайттарында клондолгон. Изилдөөлөрдүн натыйжасында 6 конструкция (pSPPV060Δ, pSPPV074Δ, pSPPV095, pSPPV117, pSPPV122Δ жана pSPPV141Δ) T7 промоторунун көзөмөлүндө *E.coli* бактериялык системасында кой чечек вирусунун гендерин экспрессиялоо үчүн алынган (3.4-сүрөт).



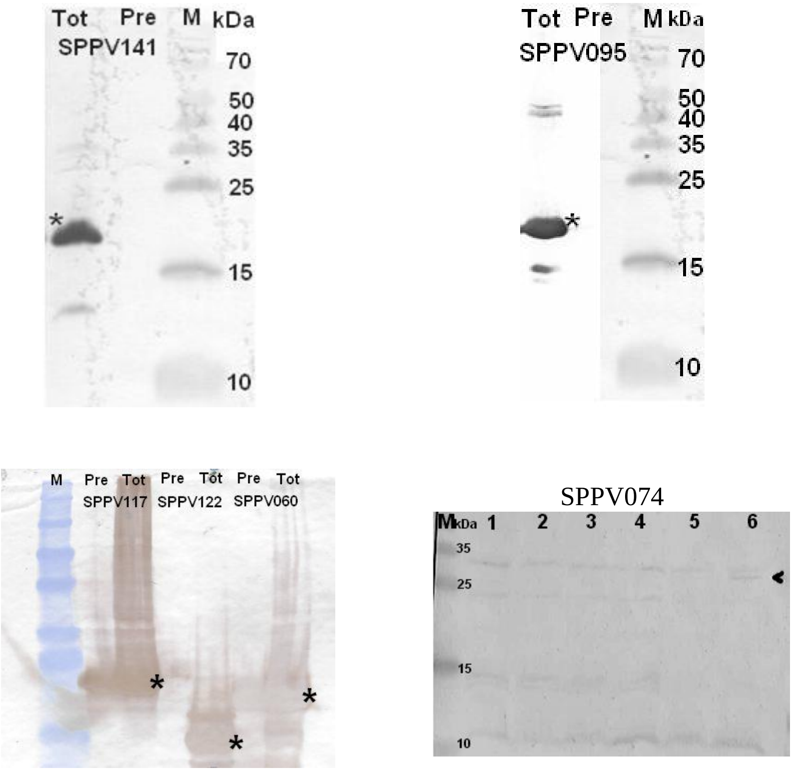
3.4-сүрөт – Кой чечек вирусунун белокторун экспрессиялоо үчүн рекомбинанттык плазмиддердин схемалык көрүнүшү.

T7-prom – фагдын промотору а T7, T7-term – фагдын терминатору, His – алты гистиддин ырааттуулугу.

Рекомбинанттык белокторду тазалоо жана детекциялоо үчүн C- же N-ге алты гистидиндин HIS-Tag6 молекуласын кошуу менен аминокислота тизмеги өзгөртүлгөн. pSPPV060Δ, pSPPV074Δ, pSPPV095, pSPPV117, pSPPV122Δ жана pSPPV141Δ рекомбинанттык плазмиддерди камтыган T7

E.coli бактерия клеткаларын индукциялоонун натыйжасында белоктордун экспрессиясы аныкталган, алардын молекулалык салмагы SPPV060 – 22 кДа, SPPV074 – 33кДа, SPPV095 – 20 кДа, SPPV117 – 19 кДа, SPPV122 – 17 кДа жана SPPV141 – 22 кДа түзгөн.

Чычканга каршы HIS иммуноглобулиндерин колдонуу менен клетка лизаттарынын вестерн блот анализи SPPV060, SPPV074, SPPV095, SPPV117, SPPV122 жана SPPV141 белок экспрессиясынын бар экендигин тастыктады (3.7-сүрөт).

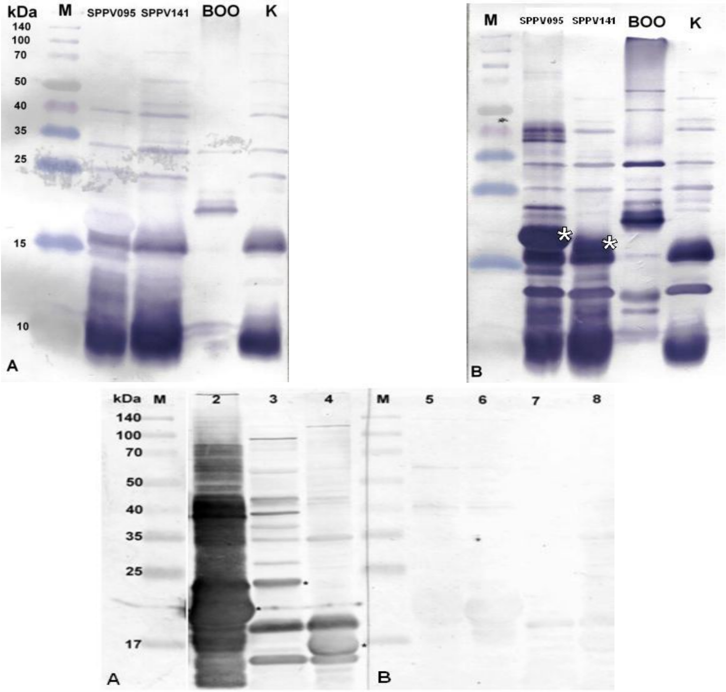


3.4-сүрөт – Полигистидиндик сывороткaны колдонуу менен рекомбинанттык плазмиддер pET менен трансформацияланган *E.coli* штаммынын клетка лизатынын белокторунун иммуноблоту.

M –молекулярдык таразанын маркери (Thermo Scientific); Pre – индукцияга чейинки клеткалык лизат; Tot – индукциядан кийин IPTG, * – белоктун локализациясы.

Сүрөттөн көрүнүп тургандай, полигистидинге антителолор максаттуу белоктордун тиешелүү өлчөмүндөгү белоктор менен байланышкан, бул белок молекуласында His-Tag бар экендигин тастыктайт. Бул бизге рекомбинанттык белокторду иммобилизацияланган металл-аффиндик хроматографияны колдонуу менен андан ары тазалоого мүмкүндүк берди, натыйжада жогоруда аталган белоктордун тазаланган фракциялары пайда болду.

Ошондой эле, рекомбинанттык белоктордун иммунодетекциясы анти-КЧВ койлордун иммуноглобулиндерин колдонуу менен ишке ашырылган (3.8-сүрөт).



3.8-сүрөт – Чечек вирусун эксперименталдык түрдө жуктурган койлордон алынган сывороткаi колдонуу менен рекомбинанттык плазмиддер pET менен трансформацияланган *E.coli* клетка лизатынан белокторду иммуноблотингдөө.

А – нормадагы сыворотка менен көзөмөлдөө, В – спецификалык сывороткаларды колдонуу менен, М – молекулярдык таразанын маркери (Thermo-Scientific, США), КЧВ – кой чечегинин вирусу, К – көзөмөлдөө, таза плазмид pET26, 2 – SPPV117, 3 – SPPV060, 4 – SPPV122, * – максаттуу белоктун локализациясы менен өзгөртүлгөн *E.coli* штаммынын Т7 клетканын лизаты.

Ошентип, пайда болгон рекомбинанттык плазмиддер кой чечек вирусу менен экспериментальдык түрдө ооруган койлордон алынган сыворотка менен өзгөчө өз ара аракеттенүүчү максаттуу вирустук белокторду түзүүчү гендердин экспрессиясын камсыз кылат. Кой чечек вирусунун рекомбинанттык белокторунун максаттуу гендерин экспрессиялаган *E.coli* штаммдары КР БККИИнин микроорганизмдер коллекциясына депонирленген.

Ген экспрессиясынын абалын оптималдаштыруу максатында түнкү культуранын урук концентрациясынын таасири жана индукцияга чейинки инкубациянын узактыгы, индукциянын температурасы жана экспрессия деңгээлине индуктордун концентрациясы изилденген. Изилдөөнүн натыйжасында түнкү культуранын себүү концентрациясы 1:50 пропорциясында жана индуктор кошулганга чейин өсүү убактысы 60 мүнөт болгондо максаттуу белоктун эң көп өлчөмү аныкталган.

Андан кийин, рекомбинанттык белоктун жогорку чыгуусун камсыз кылуучу бардык максаттуу КЧВ гендердин экспрессиясын индукциялоо үчүн оптималдуу протокол тандалды. Изилдөөлөрдүн натыйжасында максаттуу гендердин экспрессиясынын белгиленген оптималдуу параметрлери 3.2-таблицада көрсөтүлгөн.

3.2-таблица. – Бактериялык клеткалардагы кой чечек вирусунун максаттуу гендеринин экспрессиялык параметрлери

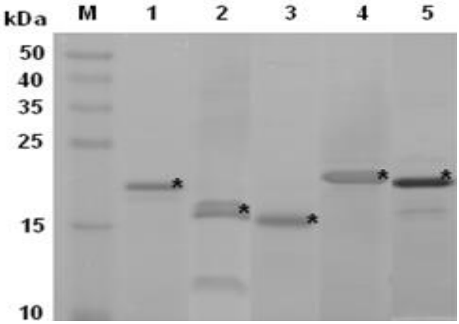
Ген	**Параметрлер**		
	Температура, °С	**ИПТГ, мМ**	**Узактыгы, ч**
sppv060	30	0,500	4
sppv074	18	1,000	18
sppv095	37	0,500	4
sppv117	25	0,125	3
sppv122	30	0,250	4
sppv141	25	0,250	4

Андан ары ар бир рекомбинанттык белок үчүн тазалоо шарттары 90% деңгээлден төмөн эмес тазалыгы менен максималдуу белокту камсыз кылуу үчүн тандалган.

3.3-таблица. – Рекомбинанттык белокторду тазалоо шарттары

Белок	Эригичтиги	Тазалоо шарттары	1 л, мг (n=3) белоктун чыгышы
SPPV060	Включения	денатурирующие	56,0±5,2
SPPV074	Включения	денатурирующие	2,0±0,5
SPPV095	Включения	гибридные	50,3±3,6
SPPV117	Растворимый	нативные	35,7±4,1
SPPV122	Включения	денатурирующие	32,5±2,7
SPPV141	Включения	денатурирующие	2,8±0,4

ДСН-ПААГ-электрофорезинде тазаланган белоктук препараттарды анализдөө рекомбинанттык белокторду тазалоонун жогорку деңгээлин көрсөттү (3.15-сүрөт).



3.15-сүрөт – Тазаланган белок препараттарынын электрофорездик анализи.

M – молекулярдык таразанын маркери, 1 – SPPV095, 2 – SPPV117, 3 – SPPV122, 4 – SPPV141, 5 – SPPV060, * – белоктун локализациясы.

3.2 Рекомбинанттык кой чечек вирусунун белокторунун иммуногендик жана антигендик касиеттерин изилдөө. Белоктун ар бир варианты үчүн 5 литрден индукцияланган культура өндүрүлгөн. Тазалоо ар бир белокко ылайыктуу шарттарда жүргүзүлдү. Натыйжада 250 мг SPPV060 жана SPPV095 белоктору, 180 мг SPPV117 белоктору, 160 мг SPPV122 белоктору жана 10 мг SPPV141 белоктору алынган. Белоктун орточо концентрациясы 1,0 мг/мл болгон. Алынган белоктук препараттар вакцинанын эксперименталдык жана лабораториялык серияларын даярдоодо колдонулган.

Рекомбинанттык белоктордун иммуномодулятордук активдүүлүгүн баалоо үчүн иммунизацияланган чычкандардын кан сывороткасы вестерн блот анализинде сыналган. Натыйжада, бардык белоктордун клетка лизаттары рекомбинанттык белоктор менен иммунизацияланган лабораториялык жаныбардан алынган сыворотка менен оң реакцияга ээ экендиги аныкталган.

Андан ары изилденген сывороткалар кой чечек вирусунун жана эктромелия вирусунун нейтралдаштыруу реакциясында сыналган.

Натыйжада, бардык пайда болгон белоктор чычкандарда антителолордун пайда болушуна түрткү бере тургандыгы аныкталган. Ошол эле учурда SPPV060, SPPV074, SPPV117, SPPV122 жана SPPV141 белокторуна антителолор вирустарды нейтралдаштыруучу активдүүлүктү көрсөтүп, профилактикалык каражаттарды иштеп чыгууда колдонулушу мүмкүн.

3.3. Рекомбинанттык вирустук белоктордун негизинде суббирдик вакцинаны даярдоонун технологиясын иштеп чыгуу. Койлорду иммунизациялоо үчүн алюминий гидроксидине адсорбцияланган белоктордун үч концентрациясы сыналды: бир дозада 300 мкг, 150 мкг жана 75 мкг белок. Эмдөө 28 күн аралык менен эки жолу жүргүзүлдү. Контроль катары тирүү аттенуацияланган НИСХИ вакцинасы жана фосфат-туз буфердик эритмеси колдонулган. Натыйжада, вирустук инфекциядан коргоо үчүн рекомбинанттык белокторду оптималдуу пайдалануу ар бир белоктун бир дозасына 75 мкг концентрацияда экендиги аныкталган (SPPV060, SPPV095, SPPV117 жана SPPV122).

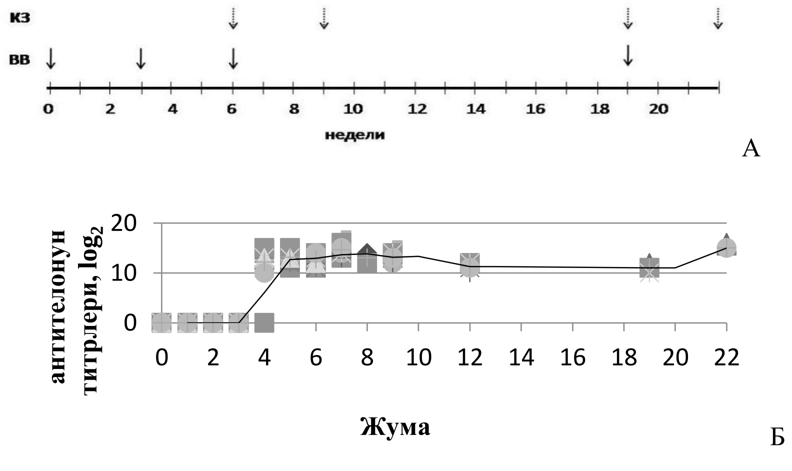
Адъювантты тандоо боюнча изилдөө жүргүзүлдү. Адъюванттын эки түрү сыналган: Montanide ISA-71 жана алюминий гидроксиди. Натыйжада адъюванттарды колдонууда гуморалдык реакциянын деңгээли таза белоктук препараттар менен иммунизациялоого караганда бир кыйла жогору экендиги аныкталды. Алюминий гидроксиди рекомбинанттык вакцина үчүн адъювант катары тандалган.

Рекомбинанттык алюминий гидроксидинин вакцинасын өндүрүүнүн технологиялык схемасы түзүлдү, анда өндүрүштүн ар бир этабында дарыга болгон талаптар, ошондой эле сапатты көзөмөлдөө ыкмалары чагылдырылган. Иштелип чыккан технология боюнча вакцинанын үч лабораториялык сериясы чыгарылып, даяр продукциянын сапатына көзөмөл жүргүзүлдү. Вакцинанын бардык лабораториялык сериялары талаптарга жооп берген жана вакцинаны даярдоонун иммунобиологиялык касиеттерин жана ар кандай температурада сактоодо анын туруктуулугун изилдөө үчүн колдонулган.

Вакцинанын коопсуздугу чычкандарда терс көзөмөлдүк топ менен салыштырып, жаныбарлардын аман калуу деңгээлин, жалпы абалын, жүрүм-турумун жана салмагынын динамикасын баалоо менен аныкталган. Натыйжада чычкандардын бир дагы тобунда байкоо жүргүзүүнүн бүткүл мезгилинде жаныбарлардын өлүмү болбогондугу аныкталган.

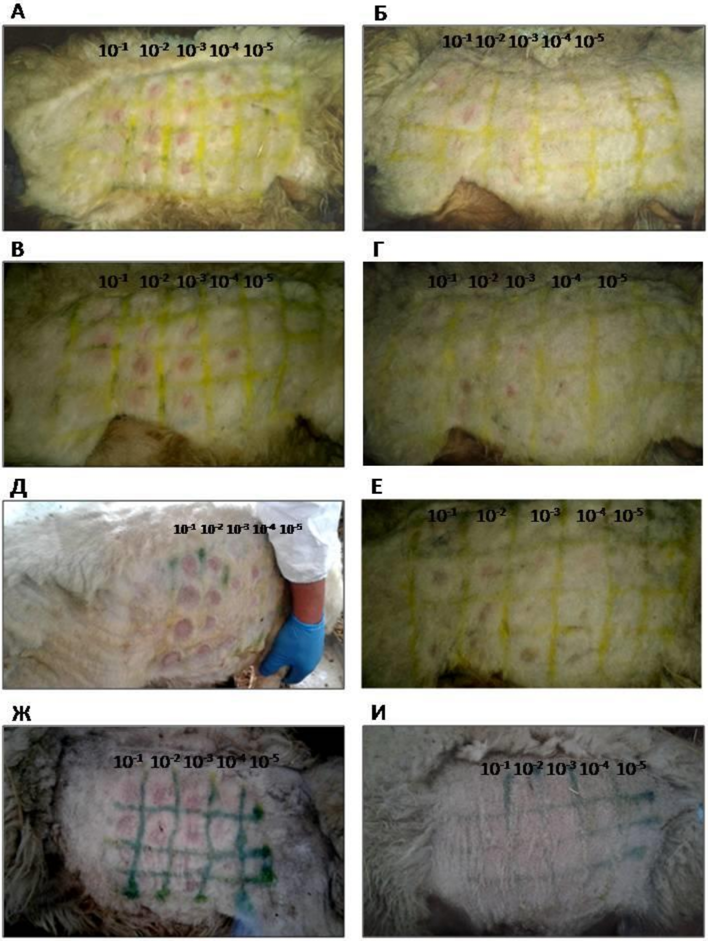
Рекомбинанттык алюминий гидроксидинин вакцинасынын иммуногендик эффективдүүлүгү жана протективдүүлүгү койлордо изилденген. Жаныбарлар (16 жаныбар) 21 күндүк интервал менен үч жолу 1 мл дозада (75×4 мкг белок) эмдөөдөн өткөрүлдү. Контролдук топко (8 жаныбар) PBS берилген. Жаныбарлар 6 ай бою байкоого алынган. Гуморалдык иммундук жооптун деңгээли ИФА боюнча аныкталган (3.23-сүрөт), эпизоотиялык кой чечек вирусу менен инфекциядан коргонуу деңгээли контролдук жугузуу ыкмасы менен бааланган (3.24-сүрөт).

Жаныбарлардын организминдеги максаттуу вирустук белокторго каршы антителолор экинчи эмдөөдөн кийин пайда болот жана вакцинаны үчүнчү жолу киргизгенден эки жума өткөндөн кийин максималдуу (14 $\log_2$) топтолушуна жетет (3.24-сүрөт, В). Вакцинаны үчүнчү жолу киргизгенден үч айдан кийин антитело титринин олуттуу төмөндөшү байкалган (11 $\log_2$).



3.23-сүрөт – Кой чечегине каршы рекомбинанттык вакцинанын иммуногендик эффективдүүлүгүн жана протективдүүлүгүн аныктоо.

А – экспериментти орнотуу схемасы, КЗ – контролдук жугузуу, ВВ –вакцинаны киргизүү, Б – иммунизацияланган койдун канындагы антителолордун деңгээли, сызыктар антитело титрлеринин орточо маанисин көрсөтөт.



3.23-сүрөт – Кой чечекке каршы рекомбинанттык алюминий гидроксидинин вакцинасы менен иммунизацияланган койлорду контролдук жугузуу.

А, В, Д, Ж – контролдук жаныбарлар, Б, Г, Е, И – иммундук жаныбарлар, А, Б – экинчи эмдөөдөн үч жума өткөндөн кийин инфекцияны контролдук жугузуу, В, Г – үчүнчү эмдөөдөн үч жума өткөндөн кийин инфекцияны контролдук жугузуу, Д, Е – үчүнчү эмдөөдөн үч айдан кийин инфекцияны контролдук жугузуу, Ж, И – төртүнчү эмдөөдөн үч жума өткөндөн кийин инфекцияны контролдук жугузуу.

Убакыттын өтүшү менен иммунизацияланган жаныбарлардын инфекциясын контролдук жугузуу, кош эмдөөдөн кийин вирустун титринин төмөндөшү 1,5 lg (3.7-сүрөт А жана В) болуп, үч эселенгенден кийин – 2.0 lg (3.7-сүрөт В жана Г) түзгөндүгүн көрсөттү. Үчүнчү эмдөөдөн үч ай өткөндөн кийин, гуморалдык иммунитеттин деңгээлинин төмөндөшүнүн фонунда иммундук жана контролдук жаныбарларда вирус титрлеринин айырмасы кайрадан 1,5 lg болду (3.7-сүрөт Д жана Е). МЭБ көрсөтмөлөрүнө ылайык, вакцина иммундук жана контролдук жаныбарлардын вирус титрлеринин 2,5 lg айырмасы менен инфекциядан 100% коргоону камсыз кылат. Антителонун титринин жогорулашына алып келген вакцинаны төртүнчү жолу киргизүү чечими кабыл алынды (3.6-сүрөт, В, 22-жума). Контролдук инфекциянын натыйжасында эмделген малда ылаңдын клиникалык белгилери (кызаруу, некроз, папула) табылган эмес. Вирус сайылган жерде кичине эле шишик байкалган (3.7-сүрөт Ж жана И). Натыйжада, төрт жолу сайылгандан кийин мал жугуштуу ылаңдардан 100% корголгону аныкталган.

Вакцинанын лабораториялык серияларынын үлгүлөрүнүн сакталуу мөөнөтүн изилдөө үчүн ар кандай температуралык 4 °С, 25 °С жана 37 °С шарттарда (эксперименттин узактыгы 12 ай) сактоого коюлду. Вакцина препаратын сактоодо сапатын көзөмөлдөө төмөнкү көрсөткүчтөр боюнча жүргүзүлдү: аныктыгы, белоктун курамы, биологиялык активдүүлүгү. Натыйжада, кой чечегине каршы вакцина 4°С температурада 12 ай бою (байкоо мезгили) өзүнүн касиетин сактай тургандыгы аныкталган.

3.4. Вакцинага комиссиянын сыноолору. Комиссиялык сыноолорду өткөрүү үчүн технологиялык процесстин бардык талаптарына жооп берген 3 сериядагы вакциналар даярдалган. 2017-жылдын 14-апрелинде № 54П буйругу менен бекитилген сыноо программасына ылайык, кой чечекке каршы рекомбинанттык алюминий гидроксидинин вакцинасын даярдоо технологиясы, коопсуздугу жана иммуногендүүлүгү боюнча комиссиялык сыноолор өткөрүлдү. Ал эми изилдөөнүн жыйынтыгы боюнча 2017-жылдын 24-июлунда 65/09-06 жана 2017-жылдын 8-январында 66/09-06 номери менен тиешелүү актылар түзүлдү. Жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн негизинде Уюштуруу стандарты СТ 405-1919-04 ГП-099–2017 «Кой чечекке каршы рекомбинанттык алюминий гидроксидинин вакцинасы», даярдоо боюнча нускамалар жана убактылуу көрсөтмөлөр түзүлдү. Ченемдик-техникалык документтерди КР БККИИнин башкы директору бекиткен.

КОРУТУНДУЛАР:

1. Рекомбинанттык плазмиддер - pSPPV060Δ, pSPPV074Δ, pSPPV095, pSPPV117, pSPPV122Δ жана pSPPV141Δ кой чечек вирусунун иммуногендик белокторун түзүүчү гендердин экспрессиясы үчүн курулган. Бактериялык штаммдар - вирустук белоктордун продуценттери алынган. Рекомбинанттык вирустук белоктордун генди экспрессиялоонун жана тазалоонун оптималдуу шарттары аныкталды. Тазалыгы 90% кем эмес 1 литр клетка суспензиясынан максаттуу продукту SPPV060 үчүн 56±5,2 мг, SPPV074 үчүн 2,0±0,5 мг, SPPV095 үчүн 50,3±3,6 мг, SPPV117 үчүн 35 ±4,1 мг. , SPPV122 – 32,5±2,7 мг жана SPPV141 – 2,8±0,4 мг түздү.

2. Рекомбинанттык белоктордун спецификалуулугу чечек вирусу менен эксперименталдык жактан жуктурулган койлордун сывороткаларын колдонуу менен вестерн блотинг менен ырасталды. SPPV060, SPPV074, SPPV117, SPPV122 жана SPPV141 белоктору вирусту нейтралдаштыруучу антителолордун иштелип чыгышына түрткү берет.

3. Кой чечегине каршы рекомбинанттык алюминий гидроксидинин вакцинасын чыгаруунун технологиясы иштелип чыкты. Препараттын курамына 4 рекомбинанттык белоктор - SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122 ар биринин концентрациясына 75 мкг/доза жана 0,5% алюминий гидроксиди кирген. Рекомбинанттык белокторду алюминий гидроксидине сорбциялоонун оптималдуу параметрлери аныкталды.

4. Рекомбинанттык алюминий гидроксидинин вакцинасы лабораториялык жана максаттуу жаныбарлар үчүн зыянсыз, иммуногендүү жана төрт жолку эмдөөдөн кийин жаныбарларды вирустук инфекциядан коргоону камсыз кылат. Вакцина 4 °С температурада 12 ай бою өз касиеттерин сактайт.

ПРАКТИКАЛЫК СУНУШТАР:

Жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн негизинде ветеринардык-биологиялык өнөр жай үчүн рекомбинанттык вакциналарды өндүрүү технологиясы боюнча төмөнкү ченемдик-техникалык документтер иштелип чыккан: кой чечегинин алдын алуу үчүн рекомбинанттык вакцинаны өндүрүү жана контролдоо боюнча нускама, кой чечегинин алдын алуу үчүн рекомбинанттык вакцина боюнча уюмдун стандарты [СТ 405-1919-04 ГП-099–2017], кой чечекке каршы рекомбинанттык вакцинаны колдонуу боюнча көрсөтмө. Рекомбинанттык ДНК технологиясынын негизинде кой чечегине каршы вакцина жасап чыгаруу боюнча ченемдик-техникалык документация КР БККИИнин окумуштуулук кенешинде жактырылып жана институттун башкы

директору тарабынан бекитилди. Иштелип чыккан рекомбинанттык вакцинаны кой чечектин алдын алуунун коопсуз каражаты катары ветеринарияда колдонууга болот. Ошондой эле, изилдөөлөрдүн натыйжасында алынган кой чечек вирусунун бактериалдык экспрессияланган рекомбинанттык белоктору диагностикалык каражаттарды өндүрүүдө колдонулушу мүмкүн.

ДИССЕРТАЦИЯНЫН ТЕМАСЫ БОЮНЧА ЖАРЫККА ЧЫККАН ЭМГЕКТЕРДИН ТИЗМЕСИ:

1. Тайлакова, Э. Т. Бактериальная экспрессия генов вируса оспы овец, кодирующих антигенные белки SPPV095 и SPPV141, для разработки средств специфической профилактики нового поколения [Текст] / Э. Т. Тайлакова, О. В. Червякова // Биотехнология. Теория и практика. – 2016. – № 2. – С. 81-87; То же: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: https://elibrary.ru/item.asp?id=26555349.
2. Recombinant Sheep Pox Virus Proteins Elicit Neutralizing Antibodies [Text] / [O. V. Chervyakova, V. L. Zaitsev, B. K. Iskakov, E. T. Tailakova et al.] // Viruses. – 2016, Basel. – Vol. 8, № 6 – P. 159-171; То же: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL:https://www.mdpi.com/1999-4915/8/6?listby=date&view= default&section_ id= 50.
3. Разработка стратегии контроля качества и стандартизации вакцины на основе рекомбинантных белков вируса оспы овец [Текст] / [Э. Т. Тайлакова, М. М. Касенов, К. Т. Султанкулова, А. Т. Жунушов и др.] // Известия Национальной академии наук Кыргызской Республики. – 2019. – № 5. – С. 40-47; То же: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL:https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44096504.
4. Рекомбинантные плазмидные ДНК pET/SPPV060ΔTM, pET/SPPV095, pET/SPPV117, pET/SPPV122ΔTM, pET/SPPV141ΔTM, обеспечивающие синтез рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, штаммы бактерий E. coli T7 – продуценты рекомбинантных вирусных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141, и рекомбинантные белки вируса оспы овец SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 для создания диагностических тест-систем и конструирования субъединичных вакцин против оспы овец [Текст] / [О. В. Червякова, Э. Тайлакова, В. М. Строчков, В. Л. Зайцев и др.] // Пат. №32951 Республика Казахстан, МПК:A61K 39/12 (2006.01), C12N 15/09 (2006.01), C12N 15/11 (2006.01), C12N 15/33 (2006.01), C12N 15/70 (2006.01), C12Q 1/02 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). Гвардейский. НИИПББ. – № 2 017/0127.1; заявл.16.02.2017; опубл. 23.07.2018, Бюл. № 27. –

16 с.: ил. То же: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL:https://gosreestr.kazpatent.kz/Invention/DownLoadFilePdf?patentId=276448&lang=ru.

5. Определение оптимальной иммунизирующей дозы рекомбинантной вакцины против оспы овец [Текст] / [Э. Т. Тайлакова, К. Т. Султанкулова, А. Т. Жунушов, О. В. Червякова] // Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. – 2023. – № 6. – С. 30-33; То же: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL:https://elibrary.ru/item.asp?id=54898929.

Тайлакова Эльмира Талгатовнанын «Рекомбинанттык ДНК технологиясынын негизинде кой чечегине каршы вакцинаны иштеп чыгуу» деген темада 03.01.06 – биотехнология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты окумуштуулук даражасын изденип алуу үчүн жазылган диссертациясынын

РЕЗЮМЕСИ

Негизги сөздөр: кой чечек, рекомбинанттык белок, рекомбинанттык вакцина, иммуногендүүлүк, протективдүүлүк.

Изилдөө объектиси: кой чечек вирусунун «НИСХИ» штамы, кой чечек вирусунун рекомбинанттык белоктору.

Изилдөө предмети: рекомбинанттык технологияны колдонуу менен кой чечегине каршы вакцинаны иштеп чыгуу.

Иштин максаты: бактериялык экспрессияланган вирустук белоктордун негизинде кой чечектин алдын алуу үчүн рекомбинанттык вакцинаны иштеп чыгуу.

Изилдөө ыкмалары: молекулярдык-генетикалык, вирусологиялык, иммунологиялык жана биотехнологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңылыгы. Молекулярдык биологиянын жана гендик инженериянын заманбап ыкмаларын колдонуу менен кой чечек вирусунун бактериалдык экспрессияланган рекомбинанттык белоктору алынды SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122(A33) и SPPV141 (B5). SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33) жана SPPV141 (B5) - жаныбарлардагы вирусту нейтралдаштыруучу антителолорду өндүрүүнү шарттай тургандыгы аныкталган. Рекомбинанттык вакцинаны чыгаруунун технологиясы иштелип чыккан. Вирустук белоктордун негизинде рекомбинанттык гидроокисьалюминдик вакцина алынган SPPV060 (L1), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33). Рекомбинанттык вакцинанын коопсуздугу жана туруктуулугу изилденген. Рекомбинанттык вакцинанын иммуногендик

натыйжалуулугу жана протективдүүгү изилденген. Изилдөөнүн натыйжасында ойлоп табууга патент алынган.

Колдонуу боюнча сунуштар: иштелип чыккан рекомбинанттык вакцина «Кой чечекти алдын алуу үчүн рекомбинанттык алюминий гидроксиддик вакцина» койлорду эмдөө үчүн сунушталды. Бул изилдөөлөрдүн натыйжалары, кой чечегине каршы коопсуз рекомбинанттык вакцинаны, ошондой эле диагностикалык тест-системаларды иштеп чыгууда колдонуу үчүн сунушталат.

Колдонуу жааты: биотехнология, вирусология, вакцинология, ветеринария, майда мүйүздүү малдардын ыландарын алдын алуу. Ошондой эле, рекомбинанттык белоктор боюнча алынган маалыматтар диагностикалык каражаттарды иштеп чыгуу үчүн колдонулушу мүмкүн.

РЕЗЮМЕ

диссертации Тайлаковой Эльмиры Талгатовны на тему: «Разработка вакцины против оспы овец на основе технологии рекомбинантных ДНК» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология

Ключевые слова: оспа овец, рекомбинантный белок, рекомбинантная вакцина, иммуногенность, протективность.

Объект исследования: вирус оспы овец штамм «НИСХИ», рекомбинантные белки вируса оспы овец.

Предмет исследования: разработка вакцины против оспы овец с использованием рекомбинантных технологии.

Цель исследования: разработка рекомбинантной вакцины для профилактики оспы овец на основе бактериально-экспрессированных вирусных белков.

Методы исследования: молекулярно-генетические, вирусологические, иммунологические и биотехнологические.

Полученные результаты и их новизна. Используя современные методы молекулярной биологии и генной инженерии были получены бактериально-экспрессированные рекомбинантные белки вируса оспы овец SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122(A33) и SPPV141 (B5). Установлено, что SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33) и SPPV141 (B5) индуцируют выработку вируснейтрализующих антител в организме животных. Разработана технология получения рекомбинантной вакцины. Получена рекомбинантная гидроокисьалюминиевая вакцина на основе вирусных белков SPPV060 (L1), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33). Изучены безвредность и

сохраняемость рекомбинантной вакцины. Изучены иммуногенная эффективность и протективность рекомбинантной вакцины. В результате исследований получен патент на изобретение.

Рекомендации по использованию: разработанная рекомбинантная вакцина «Рекомбинантная гидроокисьалюминиевая вакцина для профилактики оспы овец» предложена для вакцинации овец. Результаты данных исследований рекомендуется использовать при разработке безопасной рекомбинантной вакцины против оспы овец, а также диагностических тест-систем.

Область применения: биотехнология, вирусология, вакцинология, ветеринария, профилактика заболевания мелкого рогатого скота. Также данные полученные по рекомбинантным белкам могут быть использованы для разработки средств диагностики.

SUMMARY

dissertation of Tailakova Elmira Talgatovna on the title «Development of a vaccine against sheep pox based on recombinant DNA technology» for the competition of a candidate of biological sciences in the specialty 03.01.06 – biotechnology

Key words: sheeppox, recombinant protein, recombinant vaccine, immunogenicity, protection.

Objects of research: sheeppox virus strain «NISHI», recombinant proteins of the sheeppox virus.

Subject of research: development of a vaccine against sheeppox using recombinant technology**.**

Purpose of the work: development of a recombinant vaccine for the prevention of sheeppox based on bacterially expressed viral proteins.

Research methods: molecular genetics, virological, immunological, biotechnological.

The results obtained and their novelty. Using modern methods of molecular biology and genetic engineering, bacterially expressed recombinant proteins of the sheeppox virus SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122(A33) and SPPV141 (B5) were obtained. It has been established that SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33) and SPPV141 (B5) induce the production of virus-neutralizing antibodies in animals. A technology for producing a recombinant vaccine has been developed. A recombinant aluminum hydroxide vaccine was obtained based on the viral proteins SPPV060 (L1), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33). The safety and

persistence of the recombinant vaccine have been studied. The immunogenic efficacy and protectiveness of the recombinant vaccine were studied. As a result of the research, a patent for the invention was obtained.

Recommendations for use: the developed recombinant vaccine «Recombinant aluminum hydroxide vaccine for the prevention of sheeppox» is proposed for vaccination of sheep. The results of these studies are recommended for use in the development of a recombinant vaccine against sheeppox and diagnostic test systems.

Application area: biotechnology, virology, veterinary, vaccinology, also, data obtained on recombinant proteins can be used to develop diagnostic tools.

Кеңсе кагазы. Тираж 20 нуска.
Форматы 60х84/16, көлөмү 1,75 б.т.