

УДК 616.153.922

**Е.С.Дорофеева (4 курс, каф. ФХОМ),
А.П. Козлов, д.м.н..
(Биомедицинский центр, ГНЦ ГосНИИ ОЧБП)**

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТА ГЕНА КОНСТАНТНОЙ ЧАСТИ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПОДКЛАССА G1

До последнего времени выдвигаются серьезные сомнения в принципиальной возможности создания вакцины против ВИЧ/СПИД. Обнаружение естественного иммунитета к ВИЧ-1 (как клеточного, так и гуморального) у так называемых ВИЧ инфицированных долгожителей, а также у индивидуумов, которые остаются серонегативными, несмотря на интенсивную экспозицию ВИЧ-1, дают надежду на возможность создания вакцины против ВИЧ/СПИД. Одним из общепризнанных перспективных направлений в этой области считаются ДНК-вакцины (Collings №8-10), которые являются новым подходом к вакцинации и основаны на введении в клетки организма ДНК, кодирующей данный антиген.

В опытах на мышах (Dan H. Barouch et al., Jour. of Immun., 1998) и обезьянах (Dan H. Barouch et al., PNAS, 2000, Dan H. Barouch et al., Science, 2000) показано, что применение белка интерлейкина-2 совместно с ДНК вакциной, усиливает действие последней, увеличивая цитотоксический и антительный иммунные ответы. Так же показано, что еще более эффективным является применение слитого белка И-2/Ig, содержащего константную часть тяжелой цепи иммуноглобулина человека подкласса G1 (C_hhIgG1) и интерлейкин-2 (hИ2), или плазмидной конструкции, кодирующей и экспрессирующей И-2/Ig, так как данный слитый белок обладает большим временем жизни в крови.

Цель данной работы: создание генетической конструкции, содержащей фрагмент гена C_hhIgG1, и И-2 для создания рекомбинантных белков с увеличенным временем жизни.

Материалы и методы. Для создания данной конструкции применялись стандартные методы молекулярного клонирования нуклеиновых кислот. Получение и наработку генетического материала осуществляли методом ПЦР. В качестве матрицы для получения геномной копии C_hhIgG1 использовали высокомолекулярную плацентарную ДНК человека. Амплифицированный фрагмент был клонирован в плазмидный вектор pGEM^R-T Easy (Promega, США). Был проведен рестрикционный анализ полученной плазмиды. Нуклеотидная последовательность вставки была определена по Сенджеру с помощью автоматического секвенатора ALFexpress (Pharmacia Biotech, Швеция). Проведено сравнение известной нуклеотидной последовательности фрагмента гена C_hhIgG1 (GenBanc, ACCESSION AF237583) и нуклеотидной последовательности, содержащейся в полученной плазмиде.

Результаты. Разработана схема получения гена химерного белка, состоящего из кодирующей части hИ2 находящегося на 5' конце и фрагмента C_hhIgG1 на 3' конце. Написаны и синтезированы одноцепочечные олигонуклеотиды, фланкирующие данные последовательности, содержащие сайты рестрикции, удобные для клонирования и сшивки этих фрагментов между собой. Оптимизированы условия ПЦР для получения и наработки генов. Фрагмент C_hhIgG1 был клонирован, нуклеотидная последовательность подтверждена рестрикционным анализом и сиквенсом.

Выводы. Получена плазмидная конструкция рG-C_hIgG1, содержащая последовательность фрагмента гена C_hIgG1.