

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.62; 578.74
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-419-425>

Поступила в редакцию 22.01.2018
Received 22.01.2018

Л. М. Кравченко, К. В. Кудин, В. А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

Аннотация. Серьезный экономический ущерб свиноводству по всему миру наносит репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС). Это вирусное инфекционное заболевание, против которого живые ослабленные и инактивированные вакцины не всегда успешны. В связи с этим надежды на повышение эффективности профилактики данного заболевания связывают с разработкой нового типа препаратов – ДНК-вакцин, которые способны индуцировать развитие как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. Такие вакцины состоят из плазмидного или вирусного вектора, в который встроены гены потенциально иммуногенных белков возбудителя инфекционного заболевания. Экспрессия этих генов осуществляется в клетках вакцинированного животного, что приводит к синтезу белков-антигенов, которые индуцируют запуск иммунного ответа.

Представленная в данной работе генетическая конструкция, разработанная на основе коммерческого плазмидного вектора pVAX1, может быть использована для создания ДНК-вакцины против РРСС. Модифицированный вектор содержит открытые рамки считывания двух структурных белков вируса РРСС, участок гена инвариантной цепи, кодирующий сигнал лизосомной локализации, а также регуляторные элементы, необходимые для экспрессии клонированных генов в клетках млекопитающих.

Ключевые слова: репродуктивно-респираторный синдром свиней, ДНК-вакцина, инвариантная цепь, МНС II, генетическая конструкция

Для цитирования: Кравченко, Л. М. Генетическая конструкция для создания ДНК-вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома свиней / Л. М. Кравченко, К. В. Кудин, В. А. Прокулевич // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 419–425. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-419-425>

L. M. Kravchenko, K. V. Kudzin, U. A. Prakulevich

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

DESIGN OF GENETIC CONSTRUCTION FOR CREATION DNA VACCINE AGAINST PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME

Abstract. The porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) caused the serious economic damage to swine breeding around the world. It is a viral infective disease against which live attenuated and inactivated vaccines are not always successful. Development of new types of drugs such as DNA vaccines is necessary for improving the protection against the virus. DNA vaccines induce the development of both a cellular and humoral immune response. Such vaccines consist of a plasmid or viral vector with genes of potentially immunogenic proteins. The expression of these genes realized in cells of the vaccinated animal. It leads to the synthesis of antigen proteins triggering the immune response. The purpose of this work is to create a genetic construction that can be used as DNA vaccine against PRRS virus. The construction consists of the commercial vector pVAX1 and open reading frame of two structural proteins of PRRS virus, a lysosomal localization signal sequence of the invariant chain gene and regulatory elements necessary for the expression of cloned genes in mammalian cells.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome, DNA vaccine, invariant chain, MHC II, genetic construction

For citation: Kravchenko L. M., Kudzin K. V., Prakulevich U. A. Design of genetic construction for creation DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 4, pp. 419–425 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-419-425>

Введение. В ветеринарной практике для защиты и снижения заболеваемости животных инфекциями вирусной этиологии используются живые аттенуированные и инактивированные вакцины. Однако такие препараты имеют свои недостатки, в частности инактивированные вакцины обладают относительно низкой эффективностью, так как зачастую вызывают развитие только

антителозависимого ответа без активации цитотоксических Т-лимфоцитов [1]. Использование живых ослабленных вакцин сопряжено с достаточно высоким уровнем риска реверсии к дикому штамму, что сопровождается приобретением вирулентности [2]. В связи с этим большое внимание уделяется разработке инновационных иммунобиологических препаратов, в частности ДНК-вакцин, которые способствуют формированию длительного напряженного иммунитета. Предполагается, что разработка и применение таких вакцин позволит повысить эффективность профилактики как инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии, так и аллергических, аутоиммунных, а также онкологических болезней. Эффективная защитная реакция на внедрение в организм животного различных патогенов обеспечивается ДНК-вакцинами за счет индукции клеточного и гуморального иммунных ответов [3].

ДНК-вакцина представляет собой плазмидный или вирусный вектор, который содержит различные регуляторные элементы, в том числе обеспечивающие экспрессию клонируемых генов в эукариотических клетках. Гены возбудителя инфекционного заболевания встраивают в такой вектор, и рекомбинантная молекула доставляется в организм животного, где в цитоплазме клеток синтезируется белок патогена, который в данном случае выступает в качестве антигена и стимулирует развитие иммунной реакции. Удобство ДНК-вакцин заключается в том, что для иммунизации достаточно небольшого количества препарата [2], а простота конструирования рекомбинантной ДНК и технологичность ее накопления позволяют снизить затраты на производство.

Именно с разработкой ДНК-вакцин связывают большие надежды на успешную борьбу с вирусом репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС). Данный вирус является причиной серьезных экономических потерь в свиноводческих хозяйствах по всему миру. Для профилактики РРСС используются традиционные живые модифицированные и убитые вирус-вакцины, но они обладают низкой эффективностью, а против некоторых штаммов вируса вообще бессильны [4, 5]. Против данного синдрома до сих пор не разработаны действенные профилактические и терапевтические меры [6].

Первые случаи заболевания РРСС были зарегистрированы в США в 1987 г., а в 1990 г. вирус обнаружили и в Европе [7]. Инфекционный агент, вызывающий данный синдром, относится к одноцепочечным полиаденилированным (+)РНК вирусам из семейства Arteriviridae. Вирусный геном размером около 15 кБ содержит 10 открытых рамок считывания, которые кодируют биосинтез 22 белков [6]. Генетические различия, выявленные при изучении патогена, позволили выделить два типа вируса РРСС: европейский (тип 1) и североамериканский (тип 2). Генотипы вирусных изолятов, принадлежащих к одному типу, могут отличаться на 20 % вследствие возникающих случайных мутаций и рекомбинаций в РНК [8]. Проникновение вируса в организм животного происходит через слизистые оболочки респираторного, пищеварительного или полового тракта, а размножение – в макрофагах в области ворот инфекции. Клинические проявления синдрома включают респираторные заболевания, нарушение репродукции, аборт, рождение мертвого потомства и высокую смертность молодняка [9].

Исследование экспериментальных ДНК-вакцин на животных показало, что продукты экспрессии вирусных генов, входящих в состав ДНК-вакциновой конструкции, позволяют активировать цитотоксический иммунный ответ [10]. Однако обеспечить эффективный гуморальный иммунитет только за счет синтеза вирусных белков весьма затруднительно: формирующегося уровня антител, как правило, недостаточно для нейтрализации продуктов патогена.

В связи с этим для получения защитной иммунной реакции с участием антител необходимо повысить эффективность презентации кодируемых ДНК-вакциной антигенов соответствующим иммунокомпетентным клеткам – Т-лимфоцитам. Известно, что для запуска антителозависимого иммунного ответа необходимо связывание молекул главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II, major histocompatibility complex), которые расположены на поверхности антигенпредставляющих клеток, с определенными рецепторами Т-лимфоцитов. При этом эффективное взаимодействие с Т-лимфоцитами и их активация наблюдаются только в случае предварительного связывания молекул МНС II с фрагментами чужеродного белка, которое осуществляется в лизосомных компартментах клетки. Молекулы МНС II перемещаются в такие компартменты по транс-Гольджи сети только в комплексе с инвариантной цепью (Ii) [11]. На N-концевой части

белка Ii располагается сигнальная последовательность размером 30 аминокислотных остатков (а. о.), которая способствует направлению пептидов в лизосомы [12]. Предполагается, что присоединение этой сигнальной последовательности к антигенам, кодируемым ДНК-вакциной, позволит обеспечить эффективное взаимодействие с белками МНС II, усилив тем самым их презентацию соответствующим иммунокомпетентным клеткам.

Цель данного исследования – разработка генетической конструкции, которая может стать основой для создания ДНК-вакцины против вируса РРСС.

Материалы и методы исследования. Сконструированная последовательность размером 1323 пары оснований (п. о.) и праймеры к ней (см. таблицу) были синтезированы фирмой Integrated DNA Technologies (США).

Нуклеотидные последовательности вирусных белков и инвариантной цепи брали из базы данных GeneBank: белок М – Gene ID:1494890; GP5 – Gene ID:1494885; Ii – Gene ID:396660.

Основные параметры разработанных праймеров
Basic parameters of the designed primers

Сиквенс праймера 5'→3'	К-во нуклеотидов	Температура плавления, °С	GC, %	Ампликон, п. о.
ACGACTGCTAGCACCATGGAG	21	63,6	57,1	1323
ACTACTCTCGAGCTAAGGCCGG	22	64,8	59,1	

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в смеси, приготовленной согласно инструкции производителя реагентов (Thermo Fisher Scientific, США), используя программируемый амплификатор Veriti™ (Applied Biosystems, США). Параметры циклов амплификации: первичная денатурация – 5 мин при 94 °С, затем 30 циклов: денатурация при 94 °С – 15 с, отжиг праймеров при 55 °С – 15 с, элонгация при 72 °С – 1,2 мин, заключительная полимеризация при 72 °С – 5 мин.

Для клонирования синтетической последовательности применяли коммерческий плазмидный вектор pVAX1 (Thermo Fisher Scientific, США), позволяющий встраиваемым генам экспрессироваться в клетках млекопитающих.

Бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue (F' Tn10 proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nalr) thi hsdR17 (rk– mk+) glnV44 relA1 lac) из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ использовали для клонирования рекомбинантных плазмид.

Проведение Ca²⁺-зависимой трансформации и электрофорез ДНК осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [13] с помощью ферментов и буферных систем фирмы Thermo Fisher Scientific (США).

Для выделения рекомбинантной векторной ДНК из клеток *E. coli* использовали реактивы QIAprep Spin MiniPrep Kit (Qiagen, Германия).

Процедуры очистки ДНК от ферментов и солей после рестрикции, лигирования и электрофореза осуществляли с помощью набора реактивов QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия).

Результаты и их обсуждение. Как было описано выше, в состав ДНК-вакциновой конструкции встраивают вирусные гены, продукты которых должны активировать иммунный ответ. Исходя из этого, первоочередной задачей являлось определение белков вируса РРСС, которые обладают наибольшей потенциальной иммуногенностью. Мишенями для распознавания иммунной системой в первую очередь выступают поверхностные структурные вирусные белки. В состав вируса РРСС входит 8 структурных белков, при этом 5 из них (GP2, GP3, GP4, E, GP5a) являются минорными и присутствуют в вирусе в небольшом количестве, поэтому не рассматривались нами в качестве мишеней [14].

В качестве потенциальных антигенов могут выступать три главных структурных белка вируса РРСС: N, M и GP5. Вирусный белок N достаточно консервативный, обладает высокой иммуногенностью и способен индуцировать образование нейтрализующих антител [15]. Однако мы остановили свой выбор на белках M и GP5, которые участвуют в формировании вирусной

оболочки и образуют гетеродимер, связанный дисульфидным мостиком. Оба белка содержат эпитопы, способные индуцировать образование нейтрализующих антител [7]. Гликопротеин GP5 ответственен за прикрепление вируса к клеткам-мишеням благодаря непосредственному взаимодействию с соответствующими рецепторами, а белок М, являясь наиболее консервативным среди всех структурных белков патогена, вовлечен в сборку вирусных частиц [16]. Поверхностное расположение данных белков способствует их распознаванию антигенпредставляющими клетками, такими как макрофаги и дендритные клетки, а низкая вариабельность аминокислотного состава позволяет сформировать иммунный ответ эффективный против различных штаммов вируса.

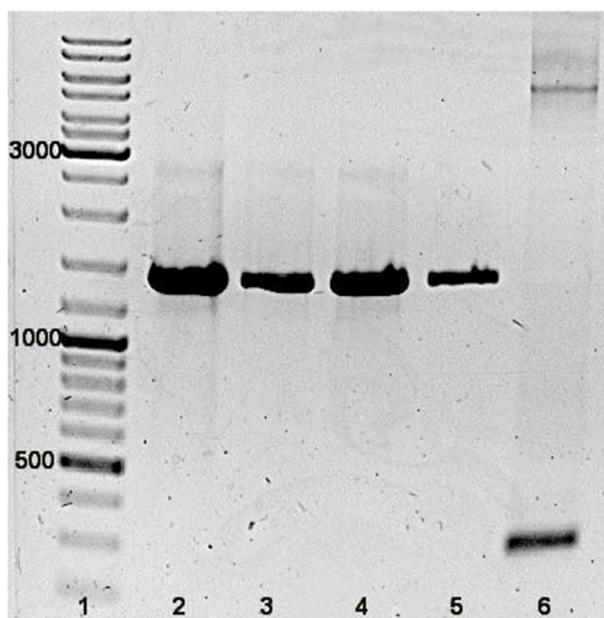
Синтетическую нуклеотидную последовательность, содержащую открытые рамки считывания (ОРС), кодирующие два вирусных белка – М (606 а. о.) и GP5 (522 а. о.) и несколько регуляторных последовательностей, встраивали в коммерческий плазмидный вектор рVAX1. Такой вектор обеспечивает проникновение и сохранение рекомбинантной ДНК в клетках организма животного, а также позволяет клонируемым генам экспрессироваться в клетках млекопитающих. На 5'-конце синтетического олигонуклеотидного фрагмента располагается участок, кодирующий сигнал лизосомной локализации инвариантной цепи (90 а. о.). Стартовый кодон перед фрагментом Ii окружает последовательность Козак (ACCATGG), которая важна для инициации



Рис. 1. Схема сконструированной последовательности: NheI, XhoI – сайты рестрикции, использованные для клонирования; Козак – последовательность Козак ACCATGG; Ii – сигнал лизосомной локализации инвариантной цепи МНС II; М – мембранный белок вируса; линкер – глицин-пролиновый мотив; Gp5 – гликопротеин вируса; стоп-кодон – TAG

Fig. 1. Schematic depiction of constructed sequence: NheI, XhoI – sites for restriction enzymes; Козак – Kozak sequence ACCATGG; Ii – lysosomal localization signal of МНС II; М – membrane protein of the virus; linker – glycine-proline sequence; Gp5 – glycoprotein of virus; stop codon TAG

Размер ДНК, п. о.



Номер образца

Рис. 2. Электрофореграмма ДНК после ПЦР-анализа образцов трансформированных клеток: 1 – маркеры молекулярного веса GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); 2–5 – фрагменты сконструированной последовательности; 6 – смесь реагентов ПЦР без ДНК-матрицы

Fig. 2. DNA electropherogram after PCR of transformants: 1 – markers of molecular weight of DNA GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); 2–5 – fragments of constructed sequence; 6 – PCR reaction mixture without DNA

трансляции в клетках эукариот. Далее за этим участком располагаются ОРС, кодирующие вирусные белки М и GP5. Нуклеотидные последовательности, соответствующие белкам М и GP5, разграничены линкерным участком, кодирующим глицин–пролин–глицин–пролин. Предполагается, что наличие такого участка в полипептиде будет способствовать стабилизации третичной структуры и предотвращать взаимодействие аминокислотных участков двух вирусных белков [17]. Максимальное сохранение нативной конформации белков особенно важно для эффективного представления их фрагментов в составе МНС II иммунокомпетентным клеткам, так как не все участки белка несут эпитопы, которые инициируют образование нейтрализующих антител [18]. К 3'-концу сконструированного фрагмента добавлен терминирующий кодон (TAG). Взаиморасположение элементов в синтетической последовательности, начиная с 5'-конца, представлено на рис. 1.

Сконструированную и синтезированную последовательность размером 1323 п. о. амплифицировали, а затем клонировали в вектор pVAX1 по сайтам рестрикции для ферментов NheI и XhoI. Полученной конструкцией трансформировали клетки *E. coli* XL-1 Blue, в которых происходила его наработка. Наличие нужной области в плаزمиде, выделенных из трансформированных клеток бактерий, подтверждено с помощью ПЦР-анализа с использованием соответствующих праймеров. На электрофореграмме образцов после ПЦР идентифицированы фрагменты ДНК размером около 1300 п. о., что соответствует размеру клонированной синтетической последовательности (рис. 2).

Заключение. В результате проведенной работы получен штамм *E. coli* XL-1 Blue, содержащий рекомбинантную плазмиду с нуклеотидной последовательностью, кодирующей два белка вируса РРСС и сигнал лизосомной локализации. Данная генетическая конструкция может быть использована для дальнейшей разработки ДНК-вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома свиней.

Список использованных источников

1. Liu, M. A. DNA vaccines: a review / M. A. Liu // *J. Int. Med.* – 2003. – Vol. 253, N 4. – P. 402–410.
2. Shedlock, D. J. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity / D. J. Shedlock, D. B. Weiner // *J. Leuk. Biol.* – 2000. – Vol. 68, N 6. – P. 793–806.
3. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines / C. Coban [et al.] // *Human Vaccines.* – 2008. – Vol. 4, N 6. – P. 453–457. <https://doi.org/10.4161/hv.4.6.6200>
4. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy / G. Labarque [et al.] // *Vaccine.* – 2004. – Vol. 22, N 31–32. – P. 4183–4190. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.05.008>
5. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV / M. Scortti [et al.] // *Vet. Rec.* – 2007. – Vol. 161, N 24. – P. 809–813.
6. Evaluation of different DNA vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in pigs / S. Petri [et al.] // *Vaccines.* – 2013. – Vol. 1, N 4. – P. 463–480. <https://doi.org/10.3390/vaccines1040463>
7. Production and evaluation of virus-like particles displaying immunogenic epitopes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) / A. Murthy [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16, N 12. – P. 8382–8396. <https://doi.org/10.3390/ijms16048382>
8. Lu, Z. H. Beyond the whole genome consensus: unravelling of PRRSV phylogenomics using next generation sequencing technologies / Z. H. Lu, A. L. Archibald, T. Ait-Ali // *Virus Res.* – 2014. – Vol. 194. – P. 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.004>
9. Rossow, K. D. Porcine reproductive and respiratory syndrome / K. D. Rossow // *Veterinary Pathology.* – 1998. – Vol. 35, N 1. – P. 1–20.
10. Wang, R. Induction of antigen-specific cytotoxic t lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine / R. Wang // *Science.* – 1998. – Vol. 282, N 5388. – P. 476–480. <https://doi.org/10.1126/science.282.5388.476>
11. MHC class II transport from lysosomal compartments to the cell surface is determined by stable peptide binding, but not by the cytosolic domains of the β - and α -chains / C. Théry [et al.] // *J. Immun.* – 1998. – Vol. 161, N 5. – P. 2106–2113.
12. Встраивание сигнала направления в лизосомы инвариантной цепи изменяет деградацию обратной транскриптазы ВИЧ-1, повышая ее иммуногенность / Е. С. Стародубова [и др.] // *Acta Naturae.* – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 66–73.
13. Current protocols in molecular biology / ed. : F. M. Ausubel [et al.]. – 2nd ed. – New York : John Wiley & Sons, 1993. – 4410 p.
14. Immune responses in mice vaccinated with virus-like particle composed of the GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / H.-M. Nam [et al.] // *Arch. Virol.* – 2013. – Vol. 158, N 6. – P. 1275–1285. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1612-z>

15. Wootton, S. K. Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / S. K. Wootton, E. A. Nelson, D. Yoo // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 1998. – Vol. 5, N 6. – P. 773–779.
16. Immune responses in pigs induced by recombinant DNA vaccine co-expressing swine IL-18 and membrane protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / X. Zhang [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13, N 5. – P. 5715–5728. <https://doi.org/10.3390/ijms13055715>
17. Improved immunogenicity of DNA constructs co-expressing the GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by glycine-proline-glycine-proline (GPGP) linker in mice / M.-Y. Chia [et al.] // *Taiwan Vet. J.* – 2011. – Vol. 37, N 1. – P. 12–23.
18. Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus Ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) / Q. Zheng [et al.] // *Virus Genes.* – 2007. – Vol. 35, N 3. – P. 585–595. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0161-5>

References

1. Liu M. A. DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine*, 2003, vol. 253, no. 4, pp. 402–410.
2. Shedlock D. J., Weiner D. B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000, vol. 68, no. 6, pp. 793–806.
3. Coban C., Koyama S., Takeshita F., Akira S., Ishii K. J. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. *Human Vaccines*, 2008, vol. 4, no. 6, pp. 453–457. <https://doi.org/10.4161/hv.4.6.6200>
4. Labarque G., van Reeth K., Nauwynck H., Drexler C., van Gucht S., Pensaert M. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine*, 2004, vol. 22, no. 31–32, pp. 4183–4190. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.05.008>
5. Scortti M., Prieto C., Alvarez E., Simarro I., Castro J. M. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Veterinary Record*, 2007, vol. 161, no. 24, pp. 809–813.
6. Petrini S., Ramadori G., Villa R., Borghetti P., de Angelis E., Cantoni A. M., Corradi A., Amici A., Ferrari M. Evaluation of different DNA vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in pigs. *Vaccines*, 2013, vol. 1, no. 4, pp. 463–480. <https://doi.org/10.3390/vaccines1040463>
7. Murthy A., Ni Y., Meng X., Zhang Ch. Production and evaluation of virus-like particles displaying immunogenic epitopes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, vol. 16, no. 12, pp. 8382–8396. <https://doi.org/10.3390/ijms16048382>
8. Lu Z. H., Archibald A. L., Ait-Ali T. Beyond the whole genome consensus: unravelling of PRRSV phylogenomics using next generation sequencing technologies. *Virus Research*, 2014, vol. 194, pp. 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.004>
9. Rossow K. D. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Pathology*, 1998, vol. 35, no. 1, pp. 1–20.
10. Wang R. Induction of antigen-specific cytotoxic t lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science*, 1998, vol. 282, no. 5388, pp. 476–480. <https://doi.org/10.1126/science.282.5388.476>
11. Théry C., Brachet V., Regnault A., Rescigno M., Ricciardi-Castagnoli P., Bonnerot C., Amigorena S. MHC class II transport from lysosomal compartments to the cell surface is determined by stable peptide binding, but not by the cytosolic domains of the β - and α -chains. *Journal of Immunology*, 1998, vol. 161, no. 5, pp. 2106–2113.
12. Starodubova E. S., Isagulians M. G., Kuzmenko Y. V., Latanova A. A., Krotova O. A., Karpov V. L. Fusion to the lysosome targeting signal of the invariant chain alters the processing and enhances the immunogenicity of HIV-1 reverse transcriptase. *Acta Naturae*, 2014, vol. 6, no. 1, pp. 61–68.
13. Ausubel F. M., Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (eds.). *Current protocols in molecular biology*. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, 1993. 4410 p.
14. Nam H.-M., Chae K.-S., Song Y.-J., Lee N.-H., Lee J.-B., Park S.-Y., Song Ch.-S., Seo K.-H., Kang S.-M., Kim M.-Ch., Choi I.-S. Immune responses in mice vaccinated with virus-like particle composed of the GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of Virology*, 2013, vol. 158, no. 6, pp. 1275–1285. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1612-z>
15. Wootton S. K., Nelson E. A., Yoo D. Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1998, vol. 5, no. 6, pp. 773–779.
16. Zhang X., Wang X., Mu L., Ding Z. Immune responses in pigs induced by recombinant DNA vaccine co-expressing swine IL-18 and membrane protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, vol. 13, no. 5, pp. 5715–5728. <https://doi.org/10.3390/ijms13055715>
17. Chia M.-Y., Hsiao S.-H., Chan H.-T., Do Y.-Y., Huang P.-L., Chang H.-W., Tsai Y.-C., Lin C.-M., Cheng C.-H., Pang V. F., Jeng C.-R. Improved immunogenicity of DNA constructs co-expressing the GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by glycine-proline-glycine-proline (GPGP) linker in mice. *Taiwan Veterinary Journal*, 2011, vol. 37, no. 1, pp. 12–23.
18. Zheng Q., Chen D., Li P., Bi Z., Cao R., Zhou B., Chen P. Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus Ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes*, 2007, vol. 35, no. 3, pp. 585–595. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0161-5>

Информация об авторах

Кравченко Лидия Михайловна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lidia_kravchenko@tut.by

Кудин Кирилл Валерьевич – науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kiryl.kudin@gmail.com

Прокулевич Владимир Антонович – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: prokulevich@mail.ru

Information about the authors

Lidia M. Kravchenko – Junior researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lidia_kravchenko@tut.by

Kiryl V. Kudzin – Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kiryl.kudin@gmail.com

Uladzimir A. Prakulevich – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: prokulevich@mail.ru