

Клонування та надекспресія фрагмента гена структурного білка E1 штама Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней в *Escherichia coli*

С. Д. Кириленко*, О. М. Дерябін¹, О. Л. Кириленко, О. Г. Дерябіна¹, В. О. Бусол²

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

¹Інститут ветеринарної медицини Української ААН
252151, Київ, вул. Донецька, 30,

²Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини Української ААН
310023, Харків, вул. Пушкінська, 83

З використанням зворотньо-транскриптажної полімеразної ланцюгової реакції клоновано та секвеновано фрагмент гена білка E1 вірулентного штама Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней довжиною 775 пар нуклеотидів. Отримано експресію цього фрагмента в E. coli у вигляді злитого з глутатіон-S-трансферазою білка. Молекулярна маса частини білка E1 збігалася з розрахованою теоретично та становила близько 31 кДа. Рекомбінантний білок знаходився головним чином у нерозчинній фракції, його кількість становила до 15 % від загального білка клітини. Обговорюються можливості застосування отриманого рекомбінантного білка.

Вступ. Класична чума свиней (КЧС) — одне з найнебезпечніших вірусних інфекційних захворювань свиней, яке щорічно наносить великі економічні збитки тваринництву в багатьох країнах світу, в тім числі і в Україні. Збудником КЧС є вірус роду *Pestivirus*, віднесений до родини *Flaviviridae* [1]. Інші представники роду пестивірусів — вірус вірусної діареї (ВВД) великої рогатої худоби та вірус прикордонної хвороби (ВПХ) овець. Геном вірусу КЧС (ВКЧС) представлений одним позитивним ланцюгом РНК розміром 12,5 тис. нуклеотидів, молекулярна маса — біля 4 МДа, коефіцієнт седиментації 42 S. Геном має одну велику відкриту рамку зчитування, яка кодує загальний поліпротеїн-попередник розміром біля 3898 амінокислотних залишків. У клітинах, інфікованих пестивірусами, субгеномні РНК не виявлені [2].

Серед ідентифікованих структурних білків ВКЧС — капсидного *gp14* (С), глікопротеїнів *gp44/48* (E2), *gp33* (E3) і *gp51—55* (E1) [3] — самим імуногенним є E1: використання його рекомбінантного аналога як субодиночної вакцини (навіть без трансмембранної області) було достатнім для формування у тварин протективної імунної відповіді [4]. Вірусонейтралізуючі антитіла є специфічними, головним чином, до E1 [5], а також до E2.

*Correspondence address.

Для білка E1 ВКЧС показано [19], що його амінокінцева частина несе дві структурно незалежні антигенні субодиниці, на одній з яких знаходяться висококонсервативний домен А та домен D, а на другій — неконсервативні В та С.

Для специфічної профілактики захворювання КЧС використовують інактивовані та живі вакцини, лапінізовані (пасовані на кролях як на неспецифічних хазяях) та отримані на культурах клітин. Однак існуючі вакцини не забезпечують повного захисту свиней від інфекції. У той же час все частіше зустрічаються слабовірулентні штами, які викликають імунну толерантність і довгочасне вірусоносійство, що призводить до появи атипичних форм КЧС. Все вищезгадане, а також наявність перехресних реакцій з іншими пестивірусами у серологічних дослідженнях ускладнюють діагностику КЧС і диференціацію вірусу КЧС від інших пестивірусів. Одним з перспективних шляхів вирішення цієї проблеми є отримання методами генної інженерії рекомбінантних продуктів для специфічної профілактики та діагностики захворювання [6].

Метою даної роботи було отримання фрагмента кодуєчої частини гена структурного найімуногеннішого білка оболонки E1 (*gp51—55*) вірулентного штама Ші-Минь ВКЧС та експресії його в *E. coli*; саме такого фрагмента, який несе антигенну субодиницю з антигенними доменами А та D.

Матеріали та методи. *Реактиви.* В роботі використано наступні реактиви: глікоген — «Invitrogen»; трис, бромистий етидій — «Calbiochem» (США); EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота), DTT (дитіотреїтол), твін-20, сульфат амонію, хлорид гуанідину — «Fluka» (Швейцарія); DS-Na (додецилсульфат натрію), агароза — «BioRad» (США); хлорид магнію — «Merck» (ФРГ); акриламід, бісакриламід, персульфат натрію, TEMED, гліцин — «Reanal» (Угорщина); ДНК фага лямбда — «Біопол» (Росія); дезоксинуклеотидтрифосфати — «Pharmacia» (Швеція); бактотриптон, бактоагар, дріжджовий екстракт — «Difco» (США); бромфеноловий синій — «Serva» (ФРГ); ПЕГ 8000, гліцерин — «Sigma» (США); ампіциліну натрієва сіль — ВО «Дарниця» (Україна); всі інші реактиви — виробників країн СНД та вітчизняних виробників з кваліфікацією не нижче хч; IPTG (ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид) та Z-Gal (аналог 5-бромо-4-хлоро-3-індоліл- β -D-галактозиду) були синтезовані та люб'язно надані А. Г. Терентьевим (ІМБІГ НАНУ).

Ферменти: протеїназа К — «Sigma»; РНКазин — «Promega»; ДНК-полімераза *BioTaq* — «Біомастер» (Росія); *SacI* — «Біопол»; *BamHI* — «Amersham» (Велика Британія); *EcoRI*, *PstI* та ДНК-лігаза фага T4 — «Fermentas» (Латвія); зворотна транскриптаза із вірусу мієлобластозу птахів була виділена у відділі біосинтезу НК та люб'язно надана В. М. Кавсаном (ІМБІГ НАНУ).

Штами та культури. У роботі використовували вірулентний штам ВКЧС Ші-Минь, адаптований до перевивної культури клітин нирки свині РК-15, на рівні 37-го пасажу в даній системі (цей штам в Україні і Росії використовується для контрольного зараження свиней при перевірці імуногенних властивостей вакцин); патматеріал з господарства, де спостерігалася гостра хвороби, діагностований на наявність ВКЧС референтним методом. Усі маніпуляції з інфекційним матеріалом здійснювалися у лабораторії епізоотології Інституту ветеринарної медицини (ІВМ) УААН. Штам Ші-Минь та зразок патматеріалу (експертиза № 67) для виділення віріонної РНК ВКЧС були люб'язно надані провідним науковим співробітником Л. П. Гришок. Для генноінженерних маніпуляцій та отримання рекомбінантного білка використовувався штам *E. coli* JM109. Як вектор загального призначення була використана плазмідна *pUC18*; для експресії — *pGEX-2T* фірми «Pharmacia».

Виділення віріонної РНК. Інфіковану вірусом культуру клітин через 72 год культивування промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), після чого клітини руйнували, тричі проморожуючи в мінімальному об'ємі, та освітлювали лізат центрифугуванням. Віріонну РНК виділяли за схемою [7] з модифікаціями. В пробірки Eppendorf вносили 5 мкл глікогена (20 мг/мл), 5 мкл трис-НСІ (1 М, рН 8,0, 25 °С), 5 мкл EDTA (500 мМ), 10 мкл протеїнази К (10 мг/мл) та по 450 мкл вірусного матеріалу, додавали по 20 мкл DS-Na (10 %) та інкубували протягом 30 хв у водяній бані при 56 °С. Препарат екстрагували фенолом, двічі — сумішню фенол — хлороформ та двічі — хлороформом. Додавали 2,5 об'єма етилового спирту з 300 мМ ацетатом натрію. Пробірки витримували 1 год чи протягом ночі при -20 °С, центрифугували 10 хв у центрифугі Eppendorf, осад промивали по чергово 70 %-м та 96 %-м етанолом і висушували.

Олігонуклеотидні затравки. Комп'ютерний аналіз і підбір олігонуклеотидних праймерів, що фланкують фрагмент гена E1 ВКЧС, проводили з програмним забезпеченням Primer Detective (Clontech Labs, v. 1.01). Як вихідну матрицю було використано послідовність ВКЧС штама *Brescia* (GenBank, ідентифікаційний номер M31768). Прямий праймер Chum-A має послідовність 5'-ТТАСССАСТТСССГТГАСАТТССГ-3' та локалізацію 2647—2668, зворотний (Chum-B, 5'-ТАТСТТССТСССААСГТГСС-3') локалізується на послідовності РНК штама *Brescia* в позиціях 3492—3471. Олігонуклеотидні праймери синтезували за фосфорамідитним методом на ДНК-синтезаторі Gene Assembler Special («Pharmacia») з використанням відповідних реактивів цієї ж фірми.

Зворотньо-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР). Зворотню транскрипцію препарату вірусної РНК проводили в об'ємі 20 мкл у присутності 25 мМ трис-НСІ (рН 8,7, 25 °С), 50 мМ хлориду натрію, 10 мМ хлориду магнію, 1 мМ DTT, 200 мМ кожного з чотирьох дезоксинуклеотидтрифосфатів, по 7 пмоль прямого та зворотного праймерів, 10 од. акт. РНКазину та 5 од. акт. зворотної транскриптази із вірусу мієлобластозу птахів. Реакцію здійснювали у водяній бані при 42 °С протягом 1 год. По 2,5 мкл матеріалу брали для ПЛР. У пробірки вносили 2,5 мкл буферу 10×Tth (170 мМ сульфату амонію, 670 мМ трис-НСІ, рН 8,8 (25 °С), 0,1 % твін-20), 1 мкл хлориду магнію (25 мМ, кінцева концентрація в ПЛР-реакційній суміші з урахуванням магнію, привнесеного з ЗТ-сумішню, була 2 мМ), 1 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатів (5 мМ кожний), по 3,5 мкл прямого та зворотного праймерів (1 оптична одиниця в 1 мл при 260 нм), 2 од. акт. полімерази *Biotaq* та воду до об'єму 25 мкл, після чого додавали 2 краплі мінеральної олії. ПЛР проводили на термоциклері Gene Aтаq Controller («Pharmacia») за звичайною методикою [8] з модифікаціями для нашого об'єкту у наступному режимі: 94 °С — 1 хв, 57 °С — 2 хв і 70 °С — 2 хв. У першому циклі тривалість усіх стадій була збільшена до 3 хв, а в останньому (стадія елонгації, 70 °С) — була подовжена до 10 хв. Кількість циклів становила 35. По 10 мкл реакційних сумішей брали для розділення методом гель-електрофорезу в 1,5 %-й агарозі в буфері 0,5×TBE. Візуалізацію та фотографування гелів після забарвлення бромистим етидієм проводили на транслюмінаторі («ЛКВ») під ультрафіолетовим світлом.

Генноінженерні маніпуляції проводили у відповідності з рекомендаціями Маніатіса [9]. Плазмідну ДНК виділяли за методом лужного лізису [10]. Бактерії трансформували за методом [11]. Після фенольної екстракції матеріал ПЛР гідролізували по чергово ендонуклеазами рестрикції *EcoRI* та *SacI* в умовах, рекомендованих виготовлювачем, з проміжною фенольною екстракцією. Фрагмент 775 п. н. було елюйовано з 1 %-ї агарози за методом заморожування з фенолом [12] та клоновано в плазмідний вектор *pUC18*

по сайтах пізнавання *EcoRI* та *SacI*. Первинну послідовність фрагмента отриманої плазміди *pUC18-775* було визначено за методом Сангера [13] на автоматизованому лазерному секвенаторі А. Л. Ф. фірми «Pharmacia» з використанням Auto Read Sequencing Kit цієї ж фірми. Фрагмент *BamHI-EcoRI* плазміди *pUC18-775* розміром 794 п. н. було переклоновано по відповідних сайтах в експресуючий вектор *pGEX-2T* («Pharmacia») зі збереженням рамки зчитування, отримавши, таким чином, вектор *pGEX-794*.

Одержання рекомбінантного білка. Індукцію культури *E. coli* JM109, що несли експресуючі плазміди, здійснювали у відповідності з рекомендаціями фірми «Pharmacia». Нічну культуру розводили 1:100 у середовищі LB з 100 мкг/мл ампіциліну, нарощували до густини 0,3 опт. од. на довжині хвилі 540 нм та додавали індуктор IPTG до концентрації 0,1 мМ, після чого інкубували ще протягом 3—4 год з енергійною аерацією при 37 °С. Клітини збирали центрифугуванням, відмивали ЗФР та руйнували на ультразвуковому дезінтеграторі MSE (6 циклів по 10 с з перервами у 20 с на льоду). Матеріал центрифугували протягом 5 хв у центрифугу Ерпендорф. Аліквоти осаду та супернатанту брали для білкового денатуруючого електрофорезу в 12,5 %-му ПААГ по Лемлі [14].

Результати та обговорення. Оскільки нуклеотидну послідовність геномної РНК штама Ші-Минь ще не було визначено, як вихідну матрицю для розрахунків було використано послідовність ВКЧС штама *Brescia*. Останню пояснюється тим, що картування геномної області, яка кодує структурні білки цього штама, було виконане з синтезом відповідних пептидів і перевіркою специфічності отриманих на них антисироваток з нативними афінно очищеними вірусними білками [3]. Відомо, що геномні послідовності різних штамів ВКЧС мають досить високу гомологію [15] і тому використання гетерологічної послідовності було цілком виправданим.

Виходячи з послідовності РНК цього штама, було підібрано та синтезовано праймери *Chum-A* та *Chum-B*, які фланкують фрагмент гена білка *E1* з сайтами пізнавання ендонуклеазами рестрикції *SacI* (з 5'-кінця фрагмента, позиція 2673 на РНК штама *Brescia*) та *EcoRI* (з 3'-кінця фрагмента, позиція 3448). На рис. 1, доріжка 6, показано фрагмент ЗТ-ПДР з праймерами *Chum-A* та *Chum-B* та віріонною РНК вірусу КЧС, яка була виділена з патматеріалу. Розмір фрагмента збігається з розрахованим теоретично значенням 845 п. н. Після обробки цього фрагмента ендонуклеазою рестрикції *SacI* розмір його зменшився до 819 п. н. (доріжка 5). Обробка *EcoRI* не призводить до подальшого зменшення розміру до 775 п. н. (доріжка 4), тому що, вірогідно, наявність нуклеотидних замінів в РНК польового ізоляту по відношенню до штама *Brescia* призводить до втрати

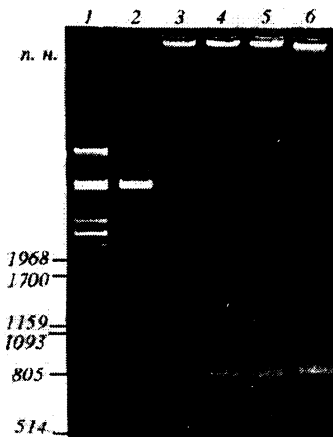


Рис. 1. Електрофореграма рестриктних фрагментів рекомбінантних плазмід та продуктів ПДР: 1 — маркер величини фрагментів ДНК (гідроліз ДНК фага лямбда рестриктазою *PstI*, розміри фрагментів вказані зліва); 2 — фрагменти гідролізу ендонуклеазами рестрикції *BamHI* та *EcoRI* рекомбінантної плазміди *pUC18-775*; 3 — те саме, що 2, але плазміди *pGEX-794*; 4 — продукт ЗТ-ПДР з праймерами *Chum-A* та *Chum-B* та РНК ВКЧС польового ізоляту, гідролізований ендонуклеазами рестрикції *SacI* та *EcoRI*; 5 — той же продукт, гідролізований тільки *SacI*; 6 — той же продукт без обробки рестриктазами

відповідного сайту пізнавання. На доріжці 3 показано фрагменти подвійного гідролізу *SacI* та *EcoRI* рекомбінантної плазмиди *pUC18-775*, у якій по цих сайтах клоновано фрагмент 775 п. н. кДНК штама Ші-Минь. В цьому штамі зберігаються як сайт *SacI*, так і *EcoRI* (даних не наведено).

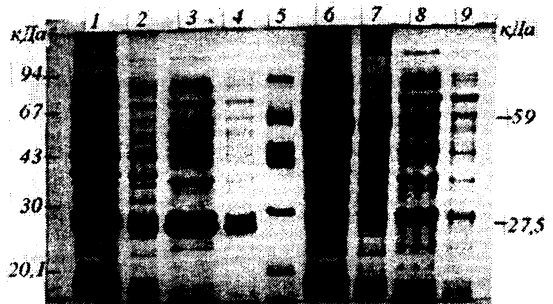
Клонований фрагмент у складі *pUC18-775* було секвеновано та його послідовність порівняно з відповідними послідовностями референтних штамів ВКЧС [16]. Це дало змогу зробити висновок стосовно того, що клонований фрагмент дійсно походить від кДНК вірусу КЧС. На доріжці 2 наведено фрагменти подвійного гідролізу *EcoRI* та *VamHI* рекомбінантної плазмиди *pGEX-794*. У ній вищезгаданий фрагмент знаходиться у формі злитого з глутатіон-S-трансферазою гена під контролем індукційного промотора *P_{lac}*. Індукція цієї плазмиди в *E. coli* призводить до синтезу злитого білка розміром близько 59 кДа (рис. 2), у якому 27,5 кДа походить від глутатіон-S-трансферази, а 31 кДа являє собою рекомбінантно відтворену внутрішню частину білка *E1* (*gp51-55*) ВКЧС штама Ші-Минь. На послідовності геномної РНК штама *Brescia* білок *E1* кодується нуклеотидними залишками 2428—3535 [3], розрахована маса неглікозильованого білка становить близько 44 кДа, тобто нами було відтворено значну частину (близько 70 %) білка *E1*. N-кінець згаданого фрагмента містить попередньо картовані антигенні домени А та D [19], С-кінець його частина безпосередньо межує з гідрофобним трансмембранним доменом (кодується нуклеотидами 3454—3507 на РНК штама *Brescia*) [3].

Рекомбінантний білок 59 кДа знаходиться головним чином у нерозчинній фракції (доріжки 6—9) на відміну від контрольної індукції вихідної плазмиди *pGEX-2T* (доріжки 1—4), де білок 27,5 кДа знаходиться як у нерозчинній фракції (осад), так і в розчинній (супернатант). Білок 59 кДа розчиняється у 8 М хлористому гуанідині, але випадає в осад при діалізі супроти низькосольових буферних розчинів (даних не наведено).

Ведуться роботи з отримання розчинної форми білка 59 кДа з застосуванням стабілізуючих домішок під час діалізу [17], а також методом коекспресії зі спеціальними білками шаперонами, наприклад, *GroE* або тіоредоксином [18].

Експресія в *E. coli* супроводжується утворенням неглікозильованої форми вірусного білка, що може накладати певні обмеження на його антигенні та імуногенні властивості. Зменшення імуногенної активності у неглікозильованих білків, імовірно, викликане зниженням їх резистентності до протеолізу і швидкою деградацією *in vivo*. У білковій інженерії запропоновано правило, згідно з яким амінокислота на N-кінці білка може визначати час його деградації *in vivo*. У нашому випадку рекомбінантний білок *E1*, експресований з вектора *pGEX-794*, після відщеплення тромбіном від носія глутатіон-S-трансферази несе на амінокінці залишок глутамінової

Рис. 2. Електрофореграма білкового DS-Na-електрофорезу препаратів індукованих культур *E. coli* JM109, що несуть експресуючі вектори *pGEX-2T* або *pGEX-794*: 1, 2 — різні кількості препарату осаду після озвучення індукованої культури JM109[*pGEX-2T*]; 3, 4 — те саме для супернатанту; 5 — маркер молекулярної маси білкових продуктів (LMW Kit фірми «Pharmacia»); 6, 7 — різні кількості препарату осаду після озвучення індукованої культури JM109[*pGEX-794*]; 8, 9 — те саме для супернатанту



кислоти, яка здатна подовжувати час деградації порівняно з багатьма іншими залишками. Для подальшого підвищення стабільності існують методи, які дозволяють маскувати центри протеолізу на білку.

Іншим важливим стабілізуючим фактором білкової молекули є насиченість її дисульфідними зв'язками. Кількість і позиції цистеїнових залишків, що формують ці зв'язки, взагалі відносяться до розряду консервативних характеристик вірусних глікопротеїнів. Принципове значення для збереження антигенних властивостей *E1* мають цистеїнові залишки Cys-792 (нумерація подана у відповідності з такою на загальному поліпротеїні-попереднику штама *Brescia*), що утворює дисульфідний місток з Cys-856, і Cys-818 з Cys-828, які беруть участь у формуванні доменів А і D [19]. В експресованому нами білку позиції цих амінокислотних залишків збережені [16], але питання відносно правильного згортання поліпептидного ланцюга і утворення дисульфідних зв'язків між ними потребує подальшого вивчення.

Відомо, що для правильного згортання поліпептиду *in vivo* часто необхідне глікозилювання, але внесок олігосахаридних ланцюгів до оформлення антигенної унікальності глікопротеїнів ВКЧС ще не визначений. Для білка *E1* ВКЧС було показано [16], що більшість моноклональних антитіл, отриманих до *E1* референтного штама *Alfort* ВКЧС і нейтралізуючих вірус у стандартних серологічних реакціях, реагувала з бактеріальним, злитим з глутатіон-S-трансферазою, фрагментом білка *E1*.

Одержані результати являють собою початковий етап досліджень антигенних і імуногенних властивостей білків ВКЧС. Рекombінантний білок та антитіла до нього передбачається використати для спроб виявлення пестивірусів серологічними методами; при вивченні антигенної різноманітності *E1* у штамів ВКЧС різного походження (вірулентних, вакцинних та польових ізолятів); вивченні механізмів, що визначають формування резистентності до КЧС у вакцинованих тварин, у яких відсутні вірусонейтралізуючі антитіла.

С. Д. Кириленко, О. М. Дерябин, О. Л. Кириленко, Е. Г. Дерябина, В. О. Бусол

Клонирование и суперэкспрессия фрагмента гена структурного белка *E1* штамма Ши-Мынъ вируса классической чумы свиней в *Escherichia coli*

Резюме

С использованием обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции клонирован и секвенирован фрагмент гена белка *E1* вирулентного штамма Ши-Мынъ вируса классической чумы свиней длиной 775 пар нуклеотидов. Получена экспрессия этого фрагмента в *E. coli* в виде слитого с глутатион-S-трансферазой белка. Молекулярная масса части белка *E1* совпала с рассчитанной теоретически и составила около 31 кДа. Рекombинантный белок находится, главным образом, в нерастворимой фракции, его количество составляет до 15 % общего белка клетки. Обсуждаются возможности применения полученного рекombинантного белка.

S. D. Kirilenko, O. M. Deriabin, O. L. Kirilenko, E. G. Deriabina, V. O. Busol

Cloning and overexpression of the part of envelope protein *E1* gene of classical swine fever virus (Strain Shi-Min) in *Escherichia coli*

Summary

A fragment of *E1* gene of virulent strain Shi-Min of classical swine fever virus (CSFV) 775 bp in length has been cloned using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Primary sequence of the cloned fragment has been determined. This fragment has been fused to glutathione-S-transferase and expressed in *E. coli*. Molecular weight of the part of *E1* protein was estimated to be 31 kD as expected. The recombinant protein has been found mainly in insoluble fraction, its yield was up to 15 % of the total cellular protein. Possible use of the protein is discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Collett J. M., Anderson D. K., Retzel E. Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae // *J. Gen. Virol.*—1988.—69, N 6.—P. 2637—2643.
2. Collett M. S., Moennig V., Horzinek M. C. Recent advances in pestivirus research // *Ibid.*—1989.—70, N 2.—P. 253—266.
3. Moormann R. J., Warmerdam P. A., Van der Meer B. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope E1 // *Virology.*—1990.—177, N 1.—P. 184—198.
4. Van Rijn P. A., Bossers A., Terpstra C. et al. A deletion subunit vaccine against classical swine fever virus and accompanying diagnostic test based on envelope glycoprotein E1 // *Abstr. Third Congr. Eur. Soc. Vet. Virol.*—Interlaken, 1994.—W3—7.
5. Greiser-Wilke I., Moennig V., Coulbaly C. O. Z. et al. Identification of conserved epitopes on a hog cholera virus protein // *Arch. Virol.*—1990.—111, N 3—4.—P. 213—225.
6. Moser C., Ruggli N., Tratschin J. D., Hofmann M. A. Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2 // *Immunobiology of viral infections. Proc. 3rd Congr. Eur. Soc. Vet. Virol.*—Interlaken, 1994.—P. 327—330.
7. Rasschaert D. Etude d'un coronavirus, le virus de la gastro-enterite transmissible du porc: identification des genes structuraux et non-structuraux et localization d'un site antigenique majeur sur la sequence de la glycoproteine de spicule E2 // *These de docteur en sciences.*—Paris, 1988.—P. 18.
8. Saiki R. K., Bugavan T. L., Horn C. T. et al. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA DQ- α DNA with a thermostable DNA polymerase // *Nature.*—1986.—324, N 6093.—P. 163—166.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. The second edition.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
10. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucl. Acids Res.*—1979.—7, N 6.—P. 1513—1523.
11. Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells // *Ibid.*—1990.—18.—P. 6169.
12. Hojman F. A novel electrophoretic strategy allows detection of very low amounts of circular retroviral DNA by PCR // *Meth. Mol. and Cell. Biol.*—1990.—2.—P. 66—69.
13. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 12.—P. 5463—5467.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227.—P. 680.
15. Classical swine fever virus and related infections // Ed. B. Liess.—Boston: Martinus Nijhoff Publ, 1988.
16. Кириленко С. Д., Дерябін О. М., Кириленко О. Л., Трояновський Б. М. Порівняльний філогенетичний аналіз кодуєчої частини генів структурного білка E1 штама ШІ-Минь та інших штамів вірусу класичної чуми свиней // *Цитологія та генетика.*—1997.—№ 6.—(У друці).
17. Seroude L., Cribbs D. L. Differential effects of detergents on enzyme and DNA-binding activities of a glutathione-S-transferase — homeodomain fusion protein // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22, N 20.—P. 4356—4357.
18. Yasukawa C., Kanei-Ishii T., Maekawa J. et al. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin // *J. Biol. Chem.*—1995.—270, N 43.—P. 25328—25331.
19. Van Rijn A., Miedema G. M. K., Wensvoort G. et al. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus // *J. Virol.*—1994.—68, N 6.—P. 3934—3942.
20. Weiland E., Stark R., Haas B. et al. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer // *Ibid.*—1990.—64, N 8.—P. 3563—3569.