

Dr. Loukia Ekateriniadou
Associated Research Director
Hellenic Agricultural Organization DIMITRA
Veterinary Research Institute
Campus of Thermi
57001 Thermi
Greece
Tel +302310855384
e-mail ekateriniadou@vri.gr

REVIEW OF SCIENTIFIC CONSULTANT
For a dissertation of Tulepova Gulmira Kairbekovna
on the topic

“Development of a nano platform for a diagnostic drug brucellosis in cattle”
(Ірі қара малы бруцеллезіне диагностикалық препарат үшін нано-
платформа дайындау)

submitted for the PhD degree in 6D120100-veterinary Medicine

Theme: It is known that brucellosis is one of the most widespread zoonoses in the world and is a very dangerous and socially important infection that causes significant economic damage to livestock. Brucellosis affects not only farm animals, but also livestock. Animals with brucellosis produce antibodies against the field strain of brucellosis. Vaccinated animals produce antibodies against the vaccine strain of Brucella. Diagnostic drugs on the world market cannot differentiate between antibodies made against the field strain of brucellosis and antibodies made against the vaccine strain. As a result, vaccinated animals are diagnosed as sick, and animals are sent to slaughter in accordance with veterinary requirements. Because existing diagnostic kits are imprecise, non-specific and since it is not possible to detect antibodies to all strains of brucellosis, it is not possible to distinguish vaccinated animals, so the risk of brucellosis infection in cattle is high. The way to solve the problem of distinguishing animals proposed in the research work is based on the synthesis of brucellosis antigens in plants. In the field of biotechnology, plants are considered one of the most attractive objects as producers. The use of transgenic plants as a bioreactor allows obtaining large biomass in relatively small areas with relatively low labor costs and capital investments, which is an important advantage for agro-industrial production. Therefore, the doctoral student **aimed** to perfect the methods of creating a platform by developing brucellosis antigens in plants for a diagnostic kit against cattle brucellosis.

To achieve this goal, the following tasks were set:

1. Isolation of DNA genome from Brucella vaccine strain B.abortus rb19.
2. Determination of the nucleotide sequence of surface antigens of brucellosis according to the gene bank.

КЕЛЕСІ БЕТТІ ҚАРАҢЫЗ
СМОТРИТЕ НА ОБОРОТЕ

3. Isolation and preparation of surface Brucella antibodies Omp25 and Omp16 for cloning into bacterial cells.
4. Vectoring of plant virus products of modified capsid proteins.
5. Insertion of the surface brucellosis antigens Omp25 and Omp16 into the VLP platform.

Methods: classical methods of genetic engineering research. The main part of the work is PCR-amplification, molecular cloning of DNA fragments, sequencing, determination of the nucleotide sequence of surface antigens of brucellosis, cloning of viral vectors for expression in plants, metall-chelate affinity chromatography method, western blotting method, fluorescence polarization analysis, virus-capable particles VLPs/antigenic peptides in plants.

The design of primers for the construction of vectors, as well as for the amplification of heterologous genes, was carried out using the Primer-blast, NCBI module.

Preparation of reaction mixtures and physical conditions for digestion of DNA with endonucleases, grouping of DNA, reverse transcription and amplification of DNA were carried out according to the protocols attached to the enzymes. For all cloning and subcloning procedures, DNA quality was analyzed on a 1% agarose gel in TAE buffer, and DNA quantity was analyzed using a *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific) spectrophotometer. Reagents and equipment needed for molecular cloning of various DNA fragments, including restriction enzymes and alloyage of DNA fragments, were used.

Brucella for the study were obtained from the B.abortus rb19 strain. B.abortus rb19 genomic DNA was used to amplify the full-length open reading frame of the Omp25 gene (642 bp) using Taq DNA polymerase (Takara, Japan) as a template.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed using a Real Time StepOnePlus (Applied Biosystems) thermocycler with a reaction mixture prepared according to the manufacturer's instructions. DNA denaturation was performed at 94°C, 62 °C ,72 °C and final DNA elongation was performed at 72 °C for 10 minuts.

PCR – derived recombinant vectors were purified from an agarose gel using the Ron (BioRon, Germany) agarose gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Purified PCR products (ThermoFisher, USA) were ligated into the pTZ57R/T cloning vector according to the cloning strategy according to the manufacturer's attached instructions. Competent E.coli TOP10F cells were prepared for transformation. Recombinant vectors were transformed into competent E.coli TOP10F cells. Bacterial clones containing recombinant plasmid DNA were screened using PCR columns, and DNA from isolated plasmids was tested by enzymatic digestion of restriction sites. The DNA sequence of the fragments was analyzed by sequencing (Ion5, USA).

For subcloning of recombinant Omp25 expressed in the pET32a⁺ vector, plasmids were cut with NcoI and EcoRI restriction enzymes and sequenced using the purified Ron's Mini Kit (BioRon, Germany) recombinant plasmid kit. After cutting the DNA, electrophoresis was performed on a 1% light-melting agarose

gel, and DNA fragments were purified one by one. Purified DNA fragments were cloned into an expression vector with a 6-histidine tag (His-tag) at the C-end of the recombinant protein to facilitate purification. Alloying is carried out using standard methods and generally accepted methods of preparing grids of competence. Plasmid DNA isolation was performed according to the GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) kit manufacturer's protocol. PCR products were purified from an agarose gel according to the Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) manufacturer's instructions. Purified PCR products were ligated into a vector for *pET-19b* cloning. Sequencing of the Omp16 gene in the *pET-19b* vector was performed on an *Ion S5* (Thermo Fisher Scientific) genetic analyzer according to the manufacturer's protocol. Then, the Omp16 gene was cloned into the *pET-19b* vector at the *NdeI* and *XhoI* sites.

The plasmid was transformed into the preformed competent strain *TOP10F Escherichia coli*. The presence of the gene in the vector of selected clones was confirmed by PCR with specific primers for Omp16 and digestion at the cloning sites. In all stages, generally accepted methods were used for the purpose of DNA cloning: ligation, preparation of competent grids, transformation. *pET-19b + Omp16* positive construct was grown in LB medium supplemented with ampicillin for Omp16 expression. The expressed protein was purified from the insoluble phase of the lysate by Vari-gel TVG-SYS (Belgium) chromatography using 6M guanidine hydrochloride. The quality and affinity of the *rOmp16* purified protein was analyzed by western blotting on 10% SDS-PAGE. In the last stage, the amount of recombinant protein was estimated according to the Bradford method. Purified *rOmp16* was stored in a refrigerator at 20°C for further protein evaluation. Omp25 target genes were sequenced in intermediate constructs and individually subcloned into the pET19b expression vector. Clones without Omp25 mutations were used for subcloning. Subcloning was performed at the *NdeI* and *XhoI* cleavage sites, and the resulting constructs were designated *Pet19b-16 (Omp16)* and *Pet19b-25 (Omp25)*. Analysis of the presence of the target gene *pET-19b* was carried out separately by subcloning sites.

Tulepova Gumira Kairbekovna in the research work, a wide range of methods of molecular genetic engineering were discussed, including the technology of production of virus-like particles VLPs/antigenic peptides in plants and fluorescence polarization technology for detection of antibodies against brucellosis in blood, serum, plasma and milk. The assembly is based on peptide sequences mimicking strains of *Brucella abortus* that join with regions of VLP viral particles for subsequent synthesis in plants. Viron-*Brucella* was purified from the plant and used as a virus-protein complex to develop a new waxing kit. After purification, the VLPs/peptide complex is conjugated with a fluorescent dye. The serum is then mixed with this test kit. When the complex in the test liquid clots, an agglutination reaction occurs due to conjugation and recognition of the antigenic peptide sequence located on the surface of the VLP viral particle by the antibody. As a result, polarization occurs and a fluorescent light signal is emitted. Scanning of samples with the help of Fluorescence instrument allows to distinguish between antibodies of vaccinated animals from diseased animals on the basis of this unique

VLP-peptide display. The Omp16 gene, which encodes the surface antigen of brucellosis, was introduced into the plant with the help of A virus of grape leaves (vector).

Results: In the study, the prokaryotic expression vector pET-19b-OMP25 and pET-19b-OMP16 were established and induced for E.coli expression. SDS-PAGE and western-blotting, sequencing results confirmed these Omp16 and Omp25 genes. Omp16 not only plays a role in protective humoral immunity, but can also induce specific retinal immunity. The Omp25 gene was selected for cloning, expression and molecular analysis as a necessary component of the nano-platform with grape A virus as a dominant antigen *B. abortus RB19*. For immunological studies, positively charged pET32(a)⁺ and pET-19b expression vectors were used to obtain high expression of the recombinant protein. The pET plasmid vector is the most efficient system developed to date for the cloning and expression of recombinant E. coli proteins. The pET32 vector is designed for cloning and high expression of peptide sequences during ligation with Tha • TagTM proteins consisting of 109 amino acids.

As a result of the obtained researches, Omp16 and Omp25 surface antigens of the Brucellosis vaccine strain RB19 were cloned into vectors based on the modified genome of the grapevine virus, and were transformed into *Nicotiana benthamiana* plants with the help of agrobacterium. Also, their production and purification from plants were expressed for further analysis on antigenicity and immunogenicity. A platform construct consisting of target protein Omp16 and Omp25 from Brucellosis vaccine strain RB19 was constructed, and enhanced green fluorescent protein was used as a marker.

A vector for the production of modified capsid proteins of membrane proteins of plant viruses and *Brucella* was created. The platform was transformed into plants to express the surface antigen of the *Brucella* vaccine strain. An appropriate *Nicotiana benthamiana* host was selected to elicit brucellosis protein expression. Plants with high expression of the target protein were selected. Physico-chemical and structural characteristics of the vaccine strain of brucellosis antigen isolated from plants by histidine residue 6 binding chromatography method were carried out. Antigenic characteristics of the obtained brucellosis protein were determined using blood serum.

For the first time, brucellosis antigens were synthesized in plants by cloning genes encoding the sequence of membrane proteins of *Brucella*, and then transformed into plants with the help of vector agrobacterium. Finally, G.K. Tulepova, in research work, the platform combining the gene of grape virus A and gene of brucellosis antigen is a unique development, because it allows the synthesis of *Brucella* membrane proteins in plants. This, in turn, is the basis for developing a diagnostic set against brucellosis of agricultural animals. This platform can serve as a basis for the development of other important chimeric proteins for agriculture, including vaccines against highly dangerous livestock diseases.

Scientific novelty of the research work:

КЕЛЕСІ БЕТТІ ҚАРАҢЫЗ
СМОТРИТЕ НА ОБОРОТЕ

For the first time, based on a special method, a nano – platform has been created that provides rapid and accurate screening by detecting antibodies against the surface antigens of all three brucella vaccine strains rb19, rb51 and rb82. A nano – platform was created by expressing the gene encoding surface antigens in plants.

As a result of the research work, a 1 patent of Republic of Kazakhstan was obtained for one useful model “Method for obtaining brucellous antigen for diagnostics and prevention of brucellosis in farm animals”. “National Institute of Intellectual Property” RSE №35533. 25.02.2022.

Scientific research work №101 within the framework of the Grant Funding Program for Scientific Research in 2018-2020, subject: “Development of the ViroN-Brucella diagnostic kit for treatment of brucellosis of cattle in the territory of the Republic of Kazakhstan” 217- implemented according to the budget program project.

These new approaches to the fight against bovine brucellosis, developed by G.K.Tulepova during her doctoral work, will raise the level of Kazakhstani science in the field of veterinary, and will further develop our culture of scientific research, achieve world standards of bioengineering developments.

Written dissertation: The written dissertation consists of 90 pages, including 15 pages of appendixes, containing 11 figures and 6 tables. The list of references includes 119 references. This dissertation represents a large body of work and supplies a wide-ranging survey of recent methods and tools. G.K. Tulepova thoroughly analyzed the available literature data and devised a correct strategy to achieve his goals. She is fully acquainted with the up-to-date state of the research. The experimental workflow is well elaborated and the obtained results reflect that G.K. Tulepova analyzed the scientific literature dedicated to this topic and critically evaluated his own results and the data available in the literature. Generally, the thesis is clearly formulated, the work is easy to read and to follow and the chapters are grouped properly.

Publication of research results:

Judging from the introduction to the dissertation, there is sufficient approbation of research results in form of 8 scientific publications, including 3 in the proceedings to international scientific conferences, 3 of those published in publications, by the Recommendation Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, 1 in a journal, included into Scopus database «Advancements in Life Sciences» – International Quarterly Journal of Life Sciences. ISSN 2310-5380. Volume 11. Issue 2-May 2024-Pakistan (44%) and 1 patent of RK.

Conclusion: The dissertation of G. K. Tulepova entitled “Developing a nano platform for bovine brucellosis diagnostic product” represents an independent and completed research in the field of veterinary medicine. This study is distinguished by scientific novelty and significant scientific contribution in the field of theory and practice and meets the requirements of the Doctor of Veterinary.

Тулєрова Гулмира Кайрбековна (Тулепова Гульмира Кайырбековна)
worthy of conferring the degree of Doctor of Veterinary Sciences in the specialty
6D120100 – Veterinary Medicine.

Scientific consultant:
Associated Research
Director
Hellenic Agricultural
Organization DIMITRA
Veterinary Research
Institute

**Dr. Loukia
Ekateriniadou**



4.09.2024

Δρ. Αντώνης Ζοράγκας
Διευθυντής Ερευνών

КЕЛЕСІ БЕТТІ ҚАРАҢЫЗ
СМОТРИТЕ НА ОБОРОТЕ

Тулєпова Гульмира Кайырбековнанын
6D120100 – «Ветеринариялық медицина» мамандығы бойынша
философия (PhD) докторы дәрежесін алу мақсатында орындаған «Ірі
қара малы бруцеллезіне диагностикалық препарат үшін нано –
платформа дайындау» тақырыбындағы диссертациясына берілген
шетелдік ғылыми кеңесшінің

ПІКІРІ

Зерттеу жұмысының өзектілігі: Бруцеллез жер шарындағы ең көп таралған зооноздық аурулардың бірі. Ол мал шаруашылығына үлкен экономикалық шығын келтіріп қана қоймай, сонымен қатар қоғамдық денсаулық сақтау үшін маңызды проблема болып табылады.

Бруцеллезбен ауыратын жануарлар бруцеллез қоздырғышының далалық штамына қарсы антиденелер шығарады. Вакцинацияланған жануарлар вакцина штаммының бруцеллаларына қарсы антиденелер шығарады. Көптеген диагностикалық препараттар бруцеллездің далалық штамына дейін жасалған антиденелерден, вакцина штамына дейін жасалған антиденелерді дифференциалды түрде анықтай алмайды. Нәтижесінде, вакцинацияланған жануарларға ауру диагнозы қойылып, жануарлар ветеринарлық талаптарға сәйкес союға жиберіледі.

Қолданыстағы диагностикалық жиынтықтар нақты емес, ерекшелігі жоқ болғандықтан және бруцеллездің барлық штамдарына антиденелерді анықтай алмайтындықтан, вакцинацияланған жануарларды ауру жануарлардан ажыратып балауға мүмкіндік бермейтіндіктен, ірі қара малы бруцеллез жұқтыру қауіпі жоғары.

Зерттеу жұмысында ұсынып отырған малдарды ажыратып балау мәселесін шешу жолы бруцеллез антигендерін өсімдіктерде синтездеуге негізделген. Биотехнология саласында, өсімдіктер продуценттер ретінде ең тартымды объектілердің бірі болып табылады.

Биореактор ретінде трансгендік өсімдіктерді қолдану біркелкі аз еңбек шығындары мен капитал салымдары кезінде салыстырмалы түрде шағын алаңдарда үлкен биомасса алуға мүмкіндік беретіні, бұл агроөнеркәсіптік өндіріс үшін маңызды артықшылық болып табылады.

Сондықтан автор ірі қара мал бруцеллезіне қарсы диагностикалық жиынтық үшін бруцеллездік антигендерді өсімдіктерде дамытып платформа жасау әдістерін жетілдіруді **мақсат** еткен. Автор осы мақсатқа жету үшін мынадай міндеттер қойған: 1. V.abortus rb19 вакциндік штамм бруцелладан ДНҚ геномын бөліп алу;

2. Гендер банкі бойынша бруцеллездің беткейлік антигендерінің нуклеотидтік тізбегін анықтау;
3. Бактериялық торшаларға клондау үшін Omp25 және Omp16 беткейлік бруцеллез антигендерін бөліп алу және дайындау;
4. Өзгертілген капсидті ақуыздардың өсімдік вирустары өнімдеріне вектор жасау;

КЕЛЕСІ БЕТТІ ҚАРАҢЫЗ
СМОТРИТЕ НА ОБОРОТЕ

5. VLP платформасына *Omp25* және *Omp16* беткейлік бруцеллез антигендерін енгізу;

Зерттеу әдістері. ҒЗЖ-да гендік инженерияның классикалық әдістерін қолданылды. Жұмыстың басым бөлігі ПТР- амплификациялау, ДНҚ фрагменттерін молекулалық клондау, секвенирлеу және бруцеллездің беткейлік антигендерінің нуклеотидтік тізбегін анықтау, өсімдіктерде экспрессиялау үшін вирустық векторларын клондау, металл – хелатты аффиндік хроматография әдісі, вестерн-блоттинг әдісі, флуоресценттік поляризациялық талдау, өсімдіктердегі вирусқа қабілетті бөлшектер VLPs/антигендік пептидтерді өндіру әдістері қолданылған.

Векторларды құрастыруға арналған, сондай-ақ гетерологиялық гендерді амплификациялау үшін праймерлердің дизайны *Primer - BLAST*, *NCBI* модулінің көмегімен жүзеге асырылған.

Реакциялық қоспаларды дайындау және ДНҚ-н эндонуклеазалармен ыдырату, ДНҚ-н «топтастыру», ДНҚ-н кері транскрипциялау және амплификациялау жүргізудің физикалық жағдайлары ферменттерге қоса берілетін хаттамаларға сәйкес жүзеге асырылған. Клондау және субклондаудың барлық рәсімдері үшін ДНҚ сапасын TAE буферіндегі 1% агарозды гелінде талданып, ДНҚ саны *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific) спектрофотометрін пайдалана отырып талданған.

ДНҚ фрагменттерін рестрикциялау және ферменттерін топтастырумен қоса алғанда, ДНҚ-ның әртүрлі фрагменттерін молекулалық клондау үшін қажетті реактивтер мен жабдықтар пайдаланылған.

Зерттеу үшін бруцеллалар *B.abortus RB19* штаммынан алынған.

B.abortus RB19 геномдық ДНҚ *Taq* ДНҚ-полимеразасын (Takara, Japan) матрица ретінде пайдалана отырып, *Omp25* генін (642 bp) толық өлшемді ашық оқу шеңберін амплификациялау үшін қолданылған.

Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) өндірушінің нұсқаулығына сәйкес дайындалған реакциялық қоспасы бар Real Time StepOnePlus (Applied Biosystems) термоциклерін пайдалана отырып жүргізілген. ДНҚ-ны денатурациялау 94 °C, 62 °C және 72 °C режимінде жүргізілді және қорытынды ДНҚ-ны ұзарту 10 минут бойы 72 °C-та жүргізілген.

ПТР көмегімен алынған рекомбинантты векторлар өндірушінің нұсқауларына сәйкес Ron (BioRon, Германия) агарозды гельге арналған Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) көмегімен агарозды гелден тазартылған. Тазартылған ПТР өнімдері өндірушінің қоса берілген нұсқаулықтарына (ThermoFisher, USA) сәйкес T/A клондау стратегиясы бойынша pTZ57R/T клондау векторына байланған. Түрлендіру үшін құзыретті *E.coli TOP10F* торшалары дайындалған. Рекомбинантты векторларды құзыретті *E.coli TOP10F* торшаларына айналдырылған. Құрамында рекомбинантты плазмидтік ДНҚ бар бактериялық клондар ПТР колонкалары арқылы скринингтен өткен, ал оқшауланған плазмидтерден алынған ДНҚ шектеу орындарын ферментативті ыдырату арқылы тексерілген. Фрагменттердің ДНҚ тізбегі реттілік жолымен талданған (Ion5, USA). pET32a⁺ векторындағы экспрессияланған рекомбинантты *Omp25*

КЕЛЕСІ БЕТТІ ҚАРАҢЫЗ
СМОТРИТЕ НА ОБОРОТЕ

субклондау үшін плазмидтер тазартылған Ron's Mini Kit (BioRon, Germany) рекомбинантты плазмидтер жиынтығын пайдалана отырып, сондай-ақ *NcoI* және *EcoRI* рестрикциялық ферменттерімен кесіліп, реттелген. ДНҚ-ны кесіп болғаннан кейін, 1% жеңіл балқитын агарозды гельге электрофорез жасап, кезегінше ДНҚ фрагменттері тазартылған.

ДНҚ-ның тазартылған фрагменттері тазартуды жеңілдету үшін рекомбинантты белоктың С-ұшында алты-гистидин белгісі (His-tag) бар экспрессия векторына клондалған. Баулау (легиrowание) стандартты кезеңдері және құзыретті торшаларды дұрыс дайындау жалпы қабылданған әдістермен орындалған.

ДНҚ плазмидін бөліп алу GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) жиынтығын өндіруші хаттамасына сәйкес қолдану арқылы жүргізілген.

Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) өндірушінің нұсқаулығына сәйкес ПТР өнімдері агарозды гельден тазартылған. Тазартылған ПТР өнімдері *pET-19b* клондау үшін векторға байланған. *pET-19b* векторындағы *Omp16* генін реттеу өндірушінің хаттамасына сәйкес *Ion S5* (Thermo Fisher Scientific) генетикалық анализаторында жүзеге асырылған. Одан кейін *NdeI* және *XhoI* сайттары бойынша *Omp16* генін *pET-19b* векторына клондалған.

Плазмидті алдын ала дайындалған құзыретті торша *TOP10F Escherichia coli*-ге айналдырылған. Іріктеп алынған клондар векторында геннің болуы клондау сайттары бойынша *Omp16* және ыдырату үшін ерекше праймері бар ПТР әдісімен расталған. Барлық кезеңдерде ДНҚ-ны клондау мақсатында жалпы қабылданған әдістемелер қолданылған: топтастыру (легиrowание), құзыретті торшаларды дайындау және тасымалдау (трансформация).

pET-19b + Omp16 оң құрылымы *Omp16* экспрессиясы үшін ампициллин қосылған LB ортасында өсірілген.

Экспрессияланған ақуызды Vari-gel TVG-SYS (Бельгия) хроматография әдісімен 6М гуанидин гидрохлоридін пайдалана отырып, лизаттың ерімейтін фазасынан тазартылған.

rOmp16 тазартылған ақуыздың сапасы мен ұқсастығын (10%) *SDS-PAGE* вестерн-блоттинг әдісіне сәйкес талданған. Соңғы кезеңде рекомбинантты ақуыздың мөлшері Брэдфорд әдісі бойынша бағаланған. Тазартылған *rOmp16* ақуызды одан әрі бағалау үшін -20°C -та тоңазытқышта сақталады.

Omp 25 мақсатты гендері аралық құрылымдарда реттелген және жеке-жеке *Pet19b* экспрессиялық векторына субклондалған. Субклондау үшін *Omp25* мутациялары жоқ клондар пайдаланылған. Субклондау *NdeI* және *XhoI* ыдырату сайттары бойынша жүзеге асырылды, алынған конструкциялар *Pet19b-16 (Omp16)* және *Pet19b-25 (Omp25)* ретінде таңбаланған. *Pet19b* мақсатты геннің болуын талдау субклондау сайттары бойынша бөлініп жүзеге асырылған.

Тулупова Г.К. зерттеу жұмысында молекулярлық-гендік инженерияның кең спектрлі әдістеріне кеңінен тоқталып өтіп, соның ішінде өсімдіктердегі вирусқа қабілетті бөлшектер VLPs/антигендік пептидтерді өндіру

КЕЛЕСІ БЕТТІ ҚАРАҢЫЗ
СМОТРИТЕ НА ОБОРОТЕ

технологиясына және қандағы, сарысудағы, плазмадағы және сүттегі бруцеллезге қарсы антиденелерді анықтау үшін флуоресценттік поляризация технологиясына негіздеп жүргізілген.

Платформа өсімдіктерде кейіннен синтездеу үшін VLP вирустық бөлшектерінің аймақтарымен қосылатын *Brucella abortus* штаммдарына еліктейтін пептидтік тізбектерге негізделген. *Viron-Brucella* жаңа балау қою жиынтығын әзірлеу үшін өсімдіктен тазартылып және вирустық-ақуыздық кешен ретінде пайдаланылған. VLPs/пептид кешені тазартылғаннан кейін флуоресцентті бояғышпен конъюгацияланады. Содан кейін қан сарысуы осы тестіленетін жиынтығымызбен араластырылады. Тест сұйықтығының құрамындағы кешен ұйығанда конъюгация және VLP вирустық бөлшегінің бетінде орналасқан антигендік пептидтік реттілік антиденесінің тануы есебінен агглютинация реакциясы болады. Нәтижесінде поляризация пайда болып, флуоресценттеуші жарық сигналы шығарылады. Fluorescence құралының көмегімен сынамаларды сканерлеу осы бірегей VLP-пептидті дисплейдің негізінде ауру малдардан вакцинацияланған малдардың антиденелері арасында ажыратып балауға мүмкіндік береді.

Бруцеллездің беткейлік антигенін кодтайтын *Omp16* генді өсімдікке жүзім жапырақтарының А вирусы (вектор) көмегімен енгізеді.

Зерттеу жұмысының нәтижелері: зерттеу жұмысында *E.coli* экспрессиясы үшін прокариотикалық экспрессия векторы *pET-19b-Omp25*, *Omp16* орнатылған және индукцияланған.

SDS-PAGE және вестерн-блоттинг, секвенирлеу нәтижелерін *Omp16* мен *Omp25* гендерін растады. *Omp16* қорғаныштық гуморальдық иммунитетте рөл атқарып қана қоймай, сондай-ақ ерекше торшалық иммунитетті индукциялай алады.

Omp25 гені доминантты антиген *B.abortus RB19* ретінде клондау, экспрессиялау және жүзім А вирусы бар нано-платформаның қажетті компоненті ретінде молекулалық талдау үшін таңдалған. Иммунологиялық зерттеулер үшін, рекомбинантты ақуыздың жоғары экспрессиясын алу үшін оң зарядталған *pET32 (a)⁺* және *pET-19b* экспрессия векторлары пайдаланылған.

pET плазмидті векторы осы уақытқа дейін *E.coli* рекомбинантты ақуыздарды клондау және экспрессиялау үшін әзірленген ең тиімді жүйе болып табылады. *pET32* векторы 109 аминоқышқылынан тұратын $\text{Tha} \cdot \text{Tag}^{\text{TM}}$ ақуыздарымен топтастыру кезінде пептидтік тізбектерді клондауға және жоғары экспрессиясына арналған.

Алынған зерттеулер нәтижесінде бруцеллезге қарсы вакцина *RB19* штаммының *Omp16* және *Omp25* беткейлік антигендері жүзім вирусының өзгертілген геномы негізінде векторларға клонданып, *Nicotiana benthamiana* өсімдіктеріне агробактерия көмегімен айналған. Сондай-ақ оларды, өндіру және өсімдіктерден тазарту антигенділігі мен иммуногенділігі бойынша кейінгі талдау үшін экспрессия алынған. Бруцеллез вакцинасының *RB19* штаммынан *Omp16* және *Omp25* мақсатты ақуызынан тұратын

платформалық құрылым құрастырылды, ал маркер ретінде күшейтілген жасыл флуоресцентті ақуыз қолданылды.

Өсімдік вирустары мен бруцеллалардың мембраналық ақуыздарының модификацияланған капсидті ақуыздарын өндіруге арналған вектор құрылды. Бруцелла вакциндік штамының беткейлік антигенін экспрессиясын алу үшін платформа өсімдіктерге айналды. Бруцеллез ақуызының экспрессиясын алу үшін тиісті *Nicotiana benthamiana* иесі таңдалды.

Мақсатты ақуызды көп экспрессиялайтын өсімдіктер таңдалды. Гистидин қалдықтарын алты байланыстырушы хроматография әдісімен өсімдіктен бөліп алынған бруцеллез антигенінің вакциндік штамының физико-химиялық және құрылымдық сипаттамалары жүргізілді. Алынған бруцеллездің ақуызынан қан сарысуы көмегімен антигендік сипаттамалары анықталды.

Алғаш рет бруцеллез антигендері өсімдіктерде бруцеллалардың мембраналық ақуыздарының тізбегін кодтайтын, гендерді клондау жолымен синтезделді, содан кейін векторды агробактерия көмегімен өсімдікке айналдыру. Алғаш рет диагностикалық препарат үшін платформа жасалынған.

Соңында алып қосарым, докторант Тулепова Г.К. зерттеу жұмысындағы жүзім А вирусының гені мен бруцеллездік антигеннің гені біріктірілген платформа бірегей әзірleme болып табылады, өйткені ол бруцелланың мембраналық ақуыздарын өсімдіктерде синтездеуге мүмкіндік береді. Бұл өз кезегінде, ауыл шаруашылығы малдарының бруцеллезіне қарсы платформа әзірлеуге негіз болып табылады.

Бұл платформа ауыл шаруашылығы үшін басқа да маңызды химерлік ақуыздарды, оның ішінде малдарының аса қауіпті ауруларына қарсы вакциналарды әзірлеу үшін негіз бола алады.

Зерттеу жұмысының ғылыми жаңалығы:

- ❖ Алғаш рет арнайы әдіс негізінде бруцеллездің RB19, Rb51 және RB 82 барлық үш *Brucella* вакциналық штамдарын беткейлік антигендеріне қарсы антиденелерді анықтау арқылы жылдам және анық дәл балау қоюды қамтамасыз ететін нано-платформа жасалған.

Зерттеу жұмысының нәтижесінде бір пайдалы модельге патент алынған (№35533).

Ғылыми зерттеу жұмыстары №101 Ғылыми зерттеулерді Гранттық қаржыландыру бағдарламасы аясында 2018-2020 жж аралығында тақырыбы: «ҚР аумағында ірі қара малы бруцеллезіне сауықтыру үшін ViroN-*Brucella* диагностикалық жинағын әзірлеу» 217-бюджеттік бағдарламасы жобасы бойынша орындалған.

Тулепова Гульмира Кайырбековнаның докторлық зерттеу жұмысы кезінде әзірлеген ірі қара малы бруцеллезімен күресудегі бұл жаңа тәсілдер ветеринария саласындағы Қазақстандық ғылымның деңгейін жоғарылатады және ғылыми зерттеу мәдениетімізді одан әрі дамытуға, биоинженерлік әзірлемелердің әлемдік стандартына қол жеткізуге мүмкіндік береді.

КЕЛЕСІ БЕТТІ ҚАРАҢЫЗ
СМОТРИТЕ НА ОБОРОТЕ

Диссертацияның көлемі мен құрылымы. Диссертациялық жұмыс компьютерде терілген 90 беттік мәтіннен тұрады. Оның мазмұны кіріспеден, әдебиетке шолудан, зерттеу материалдары мен әдістерінен, зерттеу нәтижелерінен, зерттеу нәтижелерін талқылаудан, қорытындыдан және қосымша материалдардан тұрады. Диссертациялық жұмыста 6 кесте, 11 сурет, 15 қосымша бар. Пайдаланылған әдебиеттер тізімі 119 аталымнан тұрады.

Бұл диссертациялық жұмыс кең көлемді және соңғы үлгідегі әдістер мен құралдардың қолданып, кең шолу жасаған.

Тулеова Г.К. қолда бар әдебиет деректерін мұқият талдап, алдына қойған мақсат-міндеттеріне жетудің дұрыс стратегиясын жасаған. Ол заманауи зерттеу әдістерімен толығымен танысқан. Тәжірибелік жұмыс рәсімі өте жақсы дайындалған, және алынған зерттеу нәтижелері Тулепова Г.К.-ның осы тақырып бойынша ғылыми әдебиет көздеріне талдау жасағаны және өзіндік зерттеулер мен қолданыстағы әдеби деректерін критерийлер бойынша бағалаған.

Диссертациялық жұмыс анық жазылған, оқуға жеңіл, оңай түсіндіріледі және тараулары дұрыс топтастырылған.

Диссертация нәтижелерінің жариялануы. Диссертациялық материалдар негізінде 8 ғылыми жұмыстар жарияланған, оның ішінде 3 мақала ҚР ҒЖБМ БҒБК ұсынған басылымдарда, 1 мақала Scopus компанияларының мәліметтер базасына кіретін «Advancements in Life Sciences» – International Quarterly Journal of Life Sciences. ISSN 2310-5380. Volume 11. Issue 2-May 2024-Pakistan журналында (процентілі 44), 3 халықаралық ғылыми – тәжірибелік конференциялар материалдарында жарияланған. 1-өнертабысқа патент алынған.

Қорытынды: докторант Тулепова Гульмира Кайырбековнаның «Ірі қара малы бруцеллезіне диагностикалық препарат үшін нано – платформа дайындау» тақырыбында жазылған докторлық диссертациялық жұмысын ветеринария саласындағы ғылыми жаңалығы мен ғылымға қосқан үлесінің маңызы бар және толық аяқталған ғылыми жұмыс ретінде барлық талаптарына сәйкес орындалған деп есептеймін. Диссертациялық жұмыстың авторы Тулепова Гульмира Кайырбековна 6D120100-«Ветеринариялық медицина» мамандығы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алуға лайық деп санаймын.

Шетелдік ғылыми кеңесші:

Ассоциацияланған зерттеулер жөніндегі
директоры,
«DIMTRA»

Грециялық
ауылшаруашылығы ұйымы,

Ветеринариялық ғылыми- зерттеу
институты в.ғ.д.

Греция, Салоника қаласы

Loukia Ekateriniadou

КЕЛЕСІ БЕТТІ ҚАРАҢЫЗ
СМОТРИТЕ НА ОБОРОТЕ