

ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА В НЕПРЯМОМ ВАРИАНТЕ ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ

Введение

Чума мелких жвачных — острое контактно-зооантропофильное заболевание, поражающее особенно коз и, в редких случаях, диких животных. Заболевание характеризуется лихорадкой, поражением слизистых оболочек носа и глаз, стоматитами, диареей и пневмонией. Распространено в странах Африки, Среднего Востока и Юго-Западной Азии.

Разработка высокоспецифических, дешевых и технологичных методов серологической диагностики ЧМЖ является одной из актуальных задач в программе ликвидации данного заболевания [5, 6].

Традиционно для выявления антител к вирусу ЧМЖ в крови животных используется реакция нейтрализации вируса. Однако данный метод требует для постановки живой вирус, что делает его выполнимым только в условиях специализированных лабораторий с высоким классом биологической защиты.

В связи с этим для серомониторинга ЧМЖ используются различные варианты иммуноферментного анализа. ИФА высокопроизводительен, дешев и биологически безопасен. Первые иммуноферментные тест-системы для обнаружения антител к вирусу ЧМЖ были основаны на использовании в качестве антигена инактивированных и очищенных препаратов нативного вируса. В связи с тем, что вирус оболочечный, добиться высокой степени его очистки трудно, и примесные клеточные белки, сохраняющиеся в препаратах антигена, снижают специфичность реакции.

Альтернативой использованию ИФА нативного вируса является применение рекомбинантных вирусных антигенов.

Цель данной работы заключалась в получении рекомбинантного антигена вируса ЧМЖ и использовании его в непрямом варианте ИФА.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали вирус чумы мелких жвачных из коллекции вирусов ФГУ ВНИИЗЖ.

Выделение вирусной РНК из вирусосодержащей суспензии осуществляли с использованием 6М гуанидинизотиоционата

и стекловолокнистых фильтров GF/F [1].

Обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) проводили в одной пробирке. Реакционная смесь включала 5 мкл 10х буфера для Taq-полимеразы, 3 мМ Mg²⁺, 0,2 мМ dNTPs, по 2,0 ед. AMV-ревертазы и Taq-полимеразы, по 20 пмоль праймеров, 5 мкл раствора вирусной РНК и воду до конечного объема 50 мкл. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Minicycler PTC-100 (MJ Research, США). Программа включала: 15 мин при 42° С (обратная транскрипция), 2 мин при 94° С (денатурация комплекса РНК-ДНК) и 35 циклов собственно ПЦР при следующем температурном режиме: 30 сек денатурации при 94° С, 30 сек отжига праймеров при 55° С и 40 сек элонгации при 72° С. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 2,0%-агарозном геле, содержащем 0,001 бромистого этидия, при силе тока 50 мА.

Молекулярное клонирование продуктов ПЦР осуществляли по общепринятым методикам [2]. Для клонирования использовали экспрессирующую плазмиду pQE и штамм M15 *E.coli* (QIAGEN).

Экспрессия рекомбинантного белка. Культивирование *E.coli* проводили в орбитальном шейкере при 150 об/мин при 37° С. Индукцию осуществляли добавлением в дневные культуры бактериальных клеток IPTG (Promega, США). Уровень экспрессии и размер рекомбинантных белков определяли с помощью вертикального электрофореза в 12%-ном ПААГе.

Сыворотки крови мелкого рогатого скота (МРС). В качестве положительного контроля использовали сыворотку крови, взятую от барана, многократно вакцинированного против чумы мелких жвачных. Нормальная сыворотка крови была получена от здорового животного, не имеющего антител к вирусу чумы мелких жвачных.

Для определения специфичности ИФА использовали три группы сывороток. Первая включала 70 сывороток крови от клинически здоровых овец и коз, не вакцинированных против ЧМЖ, вторая группа — 10 сывороток овец и коз, имеющих антите-

ла к вирусу ящура и чумы крупного рогатого скота. Третья группа включала 4 сыворотки от животных, вакцинированных против чумы мелких жвачных.

Конъюгат антивидовой. Использовали коммерческий препарат моноклональных антител против IgG овец и коз, меченый пероксидазой (Sigma, США).

Непрямой вариант ИФА. Антиген получали экспрессией в *E.coli* и последующей очисткой методом металл-хелатной хроматографии [4]. Непрямой вариант ИФА проводили по стандартной схеме. Учет производили на спектрофотометре “Униплан” (г. Москва) при длине волны 405 нм.

Методом последовательных двукратных разведений в ИФА определяли титр антител в пробах сывороток, начиная с разведения 1:10. На каждый планшет с антигеном, одновременно с испытуемыми пробами, наносили отрицательную и положительную контрольные сыворотки. Титром исследуемой сыворотки считали ее последнее разведение, в котором значение оптической плотности вдвое превышало среднее значение оптической плотности отрицательного контроля.

Результаты и обсуждение

ДНК-копию N-гена вируса ЧМЖ получали методом ОТ-ПЦР. При амплификации использовали праймеры, в структуру которых были заложены сайты рестрикции *Bam*HI и *Hind*III. После обработки соответствующими рестриктазами ампликон был встроен в плазмидный вектор pQE и клонирован в *E. coli*. В результате скрининга были отобраны клоны *E. coli*, экспрессирующие рекомбинантный нуклеокапсидный белок вируса ЧМЖ, несущий на N-конце шесть остатков гистидина. Очистку рекомбинантного белка проводили методом металл-хелатной хроматографии [4]. Со 100 мл культуры *E. coli* было получено 2 мг рекомбинантного белка с концентрацией 1 мг/мл.

Для определения антигенной активнос-

ти белка использовали контрольные сыворотки МРС. В качестве положительно-го контроля использовали сыворотку крови барана, вакцинированного против чумы мелких жвачных животных, отрицательным контролем была сыворотка крови от животного, не имеющего антител к этому вирусу. Зависимость средней оптической плотности контрольных сывороток от концентрации рекомбинантного антигена представлена на рис. 1.

Концентрация белка 1,2 мкг/мл была принята в качестве рабочей для ИФА.

Рабочую концентрацию конъюгата определяли титрованием с использованием положительной и отрицательной контрольных сывороток. За рабочее разведение принимали концентрацию, при которой значения оптической плотности положительной сыворотки находились в пределах 1,0–1,5.

В результате оптимизации всех параметров была принята следующая схема непрямого варианта ИФА. Сенсибилизацию планшетов проводили путем внесения в каждую лунку по 50 мкл рекомбинантного белка, разведенного в сенсибилизирующем буфере (0,05М карбонатно-бикарбонатный буфер, рН 9,6). Инкубировали 16–18 часов при 4° С. Не отмывая, в лунки планшета вносили по 50 мкл блокирующего раствора (TBS, содержащий 10% лошадиную сыворотку) и инкубировали 1 ч при 37° С. Затем отмывали планшеты 3 раза промывочным раствором (TBS, содержащим 0,01% Твин-20). Сыворотки разводили в блокирующем буфере, вносили методом двукратных разведений, начиная с 1:10 и инкубировали в термостатируемом шейкере 1 ч при 37° С. Повторяли отмывку планшетов от несвязавшихся компонентов реакции, вносили универсальный конъюгат в рабочем разведении и инкубировали в тех же условиях. После отмывки, проводили индикацию реакции внесением субстрата АБТС (2,2’ — азино-ди-(3-этил-бензтиазолинсульфоная кислота). Через

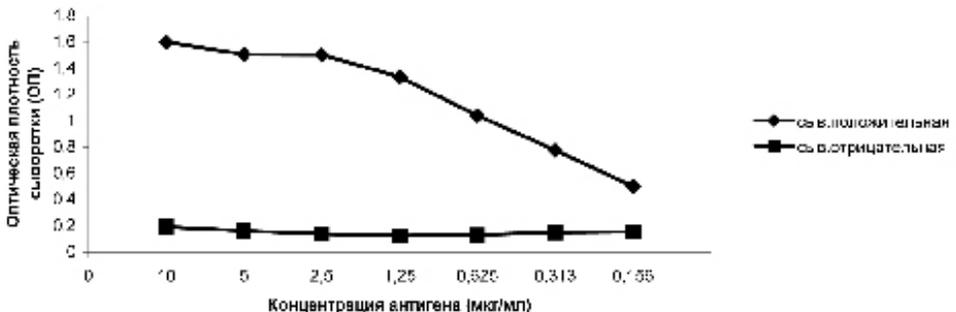


Рисунок 1. Антигенная активность рекомбинантного нуклеокапсидного белка вируса ЧМЖ в реакции с контрольными сыворотками

15 мин реакцию останавливали добавлением 1% додецилсульфата натрия. Учет производили на спектрофотометре "Униплан" (г. Москва) при длине волны 405 нм.

Позитивно-негативный порог определяли по результатам исследований 70 заведомо отрицательных сывороток крови МРС. В результате исследований было установлено, что титр антител в отрицательных сыворотках составлял <1:40.

Для определения специфичности рекомбинантного антигена тестировали гетерологичные сыворотки овец и коз с наличием антител к вирусу ящура и чумы крупного рогатого скота. Уровень антител не превышал фонового.

Для оценки воспроизводимости результатов реакции положительную контрольную сыворотку в разведении 1:20 вносили во все лунки планшета, и после проведения реакции сравнивали оптическую плотность (ОП) в лунках. Коэффициент вариации при постановке реакции на одном планшете составил 3,7%. Данные показатели указывают на хорошую воспроизводимость результатов [3].

РЕЗЮМЕ

Получен рекомбинантный нуклеокапсидный белок вируса чумы мелких жвачных (ЧМЖ). На основе рекомбинантного антигена разработан непрямой вариант ИФА для выявления антител к вирусу ЧМЖ. С использованием разработанного метода исследованы сыворотки крови мелкого рогатого скота из разных регионов России.

АБСТРАКТ

The recombinant nucleocapsid protein of the peste des petits ruminants virus was obtained. On the basis of the recombinant antigen the indirect ELISA was developed for the detection of the antibodies against the virus of peste des petits ruminants. Using the developed technique the blood sera collected from small ruminants in various regions of Russia were investigated.

Литература

1. О.Г. Грибанов, А.В. Шербаков, Н.А. Перевозчикова и др. Использование аэросила А-300 и фильтров GF/F (GF/C) для очистки фрагментов ДНК, ДНК-плазмид РНК // Биохимия. 1996. Т. 21, № 6. С. 1064–1070.
2. Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сембрук. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
3. И.О. Поляков. Практическое пособие по медицинской статистике. Л.: Медицина, 1975. 150 с.
4. А.С. Яковлева, А.В. Канышина, А.В. Шербаков. Экспрессия в E.coli рекомбинантных белков 3А, 3В и 3АВ вируса ящура // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. Владимир, 2005. Т. 3. С. 105–114.
5. OIE. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines – 5th ed. Paris, 2004. P. 153–162.
6. K.S. Choi, J.J. Nah, Y.J. Ko et al. Rapid competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to peste des petits ruminants virus // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2005. V. 12, N 4. P. 542–547.

УДК 619:578.821.21:636.32/.38:636.39:57.082.26

М.С. Кукушкина

ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСОВ ОСПЫ ОВЕЦ И КОЗ В ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Введение

При культивировании вирусов оспы овец (ВОО) и коз (ВОК) используют первичные культуры клеток из органов ягнят,

козлят, телят [5]. Немногочисленные литературные источники свидетельствуют о способности вирусов оспы овец и оспы коз репродуцироваться в перевиваемых куль-