

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ р30 ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АЧС

Першин Андрей Сергеевич, аспирант

Казакова Анна Сергеевна, аспирант

Власова Наталья Никифоровна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией биохимии

Капустина Ольга Владимировна, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН,

601120, Владимирская область, г. Покров, тел. (49243) 6-21-25;

e-mail:pershinandre@mail.ru

Ключевые слова: африканская чума свиней, рекомбинантный белок, моноклональные антитела, ИФА, РНИФ, иммуноблоттинг.

В статье описываются возможные методы использования моноклональных антител к рекомбинантному белку р30 вируса африканской чумы свиней (АЧС) для диагностики болезни и перспективы их применения.

Африканская чума свиней (АЧС) – геморрагическая лихорадка свиней с уровнем смертности, приближающимся к 100%. Возбудителем АЧС является крупный ДНК-содержащий вирус, который реплицируется преимущественно в цитоплазме и отнесен к семейству Asfarviridae, род Asfivirus [1].

Сложность противоэпизоотических мероприятий заключается в отсутствии вакцин против АЧС, что ограничивает возможности борьбы с распространением болезни, поэтому ее ранняя диагностика и высокочувствительные диагностические препараты приобретают первостепенное значение.

Общеизвестно, что использование моноклональных антител (МкАт) повышает чувствительность и специфичность обнаружения вируса АЧС, они позволяют исследовать пробы плазмы и сывороток крови свиней с высокой эффективностью, позволяя выявлять специфические антигены при значительных разведениях исследуемых образцов.

Одним из диагностически значимых белков вируса АЧС является фосфопротеин р30 (30 кДа), который располагается в мембране инфицированных клеток, имеет высокую антигенную активность и синтезируется на ранних этапах инфекционного цикла, что

позволяет выявлять вирус на 4-5 сутки после заражения животного [2,3].

Целью настоящих исследований являлось определение возможности использования МкАт к рекомбинантному белку р30 вируса АЧС для выявления антигенных детерминант вирусиндуцированного белка при диагностике болезни.

Материалы и методы

В работе использовали:

Вирусный штамм: авирулентный штамм вируса АЧС 691/88 (6,5 lg ТЦД_{50/см³}), адаптированный к репродукции в перевиваемой культуре клеток CV-1, полученный из коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Бактериальные штаммы: штамм клеток *E.coli* BL21(DE3)pLysS, клон рТТ9/ASFVp30, содержащий рекомбинантную плазмиду со встройкой участка гена CP204L вируса африканской чумы свиней, кодирующего конформационный эпитоп белка р30 [4,5,6].

Клеточные культуры: перевиваемые культуры клеток почки свиньи PK-15 и почки африканской зеленой мартышки CV-1; миеломная линия клеток SP 2/0 Ag14.1.

Полевые образцы селезёнки свиней.

Постановка электрофореза и иммуноблоттинга

Электрофорез проводили по методу Laemmli U.K. [7]. После денатурации исследуемые образцы вносили в приготовленный по стандартной методике 10% ПААГ по 20 мкл в лунку и пропускали электрический ток постоянного напряжения.

Электроперенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили в полусухой буферной системе по методу Kyhse-Andersen J. [8].

Далее проводили процедуру иммуноблоттинга [9,10,11]. Детекцию белков, сорбированных на нитроцеллюлозной мембране, проводили с использованием антивидовых антимышиных иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена. В качестве проявляющего красителя применяли субстратный буферный раствор с 0,05% 3,3'-диаминбензидина (DAB) тетрагидрохлорида. Реакция с положительным образцом МкАт выявляется по окрашенной полосе, соответствующей целевому белку.

Постановка реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ)

Проводили согласно стандартной методике, рекомендованной Международным эпизоотическим бюро и методике, описанной Bool P.H. et al. (1970) и Sanchez-Botija C. et al. (1970) [2,7]. В качестве антивидового конъюгата использовали ФИТЦ-конъюгат IgG козы к IgG мыши в рабочем разведении.

Учет реакции проводили в отраженном синем свете на люминесцентном микроскопе при увеличении 1×90.

Постановка непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА)

Вертикальные ряды полистироловых планшетов сенсibilizировали при 4°C в течение ночи препаратами антигенов в разведении 1:100.

Планшеты трехкратно отмывали внесением по 0,3 см³/лунку раствора ФБР-Т с последующим удалением содержимого резким встряхиванием. Планшеты подсушивали постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

Не связанные адсорбционно активные центры на полистироле пластин блокировали 0,5% раствором казеина на 0,02М ФБР,

pH 7,4, с 0,05% твин-20 и инкубировали в течение 40 минут при 20-22°C.

В лунки горизонтальных рядов планшетов вносили по 100 мкл двукратных разведений на ФБР-Т культуральных жидкостей МкАт. В горизонтальный ряд Н специфическую свиную сыворотку в разведении 1:200.

В горизонтальные ряды А-Г вносили по 100 мкл рабочего разведения на ФБР-Т-БСА пероксидазного конъюгата IgG козы к IgG мыши. В горизонтальный ряд Н пероксидазный конъюгат протеина А.

Далее все этапы непрямого ТФ ИФА проводили согласно стандартной процедуре.

Учет реакции осуществляли фотометрически при длине волны 405 нм. Реакцию считали положительной, если значение оптической плотности субстрата (ОП₄₀₅) в лунках, в которых инкубировали специфический антиген, в 2,1 и более раза превышало значение ОП₄₀₅ субстрата в лунках, в которых инкубировали нормальный и гетерологичный антигены.

Результаты и обсуждение

Для получения МкАт использовали не полноразмерный аналог вирусного протеина, а сплит белок, содержащий последовательность целлюлозо-связывающего домена и консервативный центральный участок р30 молекулярной массой 14 кДа [12,4].

В результате проведенных исследований было получено более 1,5 тыс. гибридных клонов, 298 из которых продуцировали МкАт к белку р30 вируса АЧС. В результате проведения 3-кратного клонирования в полужидком агаре и методом предельных разведений были отобраны 10 клонов гибридом (1D2; 1C2; 5D11; 7F7; 6B10; 2B7; 4C12; 7D5; 2E4; 3F6;), синтезирующих МкАт к белку р30 вируса АЧС. Для дальнейшего изучения иммунохимических свойств полученных МкАт выбраны 3 линии гибридов (5D11; 7F7; 2B7), стабильно продуцирующие МкАт к белку р30 вируса АЧС, имеющие наивысший титр активности культуральной жидкости в непрямом ТФ ИФА и взаимодействующие как с рекомбинантным белком р30, так и с нативным культуральным антигеном вируса АЧС.

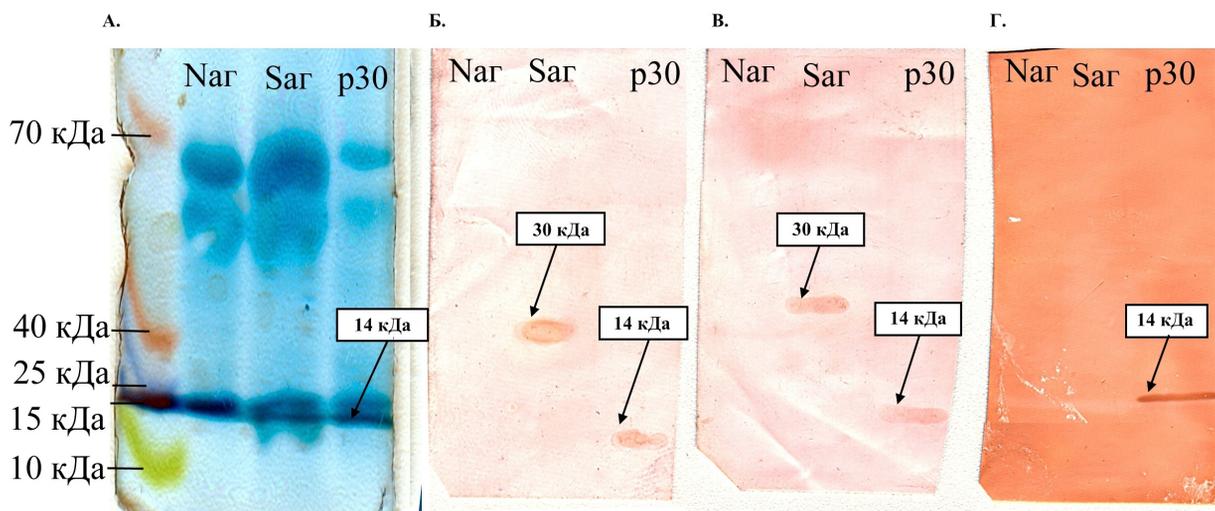


Рис.1 – Результаты определения полипептидной специфичности МкАт к белку р30 вируса АЧС методом иммуноблоттинга. А – белковый электрофорез в 10% ПААГ (в качестве источника рекомбинантного белка р30 использовали лизат клеток рекомбинантного клона *pTT9/ASFVp30*); Б – блоттограмма исследования культуральной жидкости клона 7F7; В – блоттограмма исследования клона 5D11; Г – блоттограмма исследования клона 2B7.

Изучение свойств моноклональных антител в серологических реакциях дает лишь косвенную информацию об их полипептидной специфичности. Для определения специфичности полученных МкАт применяли метод ДСН-ПААГ-электрофореза с последующим иммуноблоттингом (рисунок 1).

Результаты определения полипептидной специфичности МкАт, полученных на рекомбинантный белок р30 вируса АЧС, представленные на блоттограмме, показали, что моноклональные антитела клонов 5D11 и 7F7 взаимодействовали со специфическим культуральным антигеном вируса АЧС (окрашивание реплики на уровне 30 кДа) и с лизатом клеток клона *pTT9/ASFVp30*, продуцирующего рекомбинантный белок р30 (окрашивание реплики на уровне 14 кДа). Моноклональные антитела клона 2B7 взаимодействовали только с рекомбинантным белком и не взаимодействовали с культуральным антигеном, что, вероятно, обусловлено изменением конформации эпитопов, распознаваемых МкАт этого клона, при денатурации пробы во время электрофореза. МкАт указанных клонов не взаимодействовали с нормальным культуральным антигеном, полученным из лизата перевиваемой культуры клеток *CV-1*.

Изучение возможности использования

полученных моноклональных антител клона 7F7 для выявления антигена вируса АЧС на ранних стадиях инфицирования культуры клеток и чувствительных животных показало, что специфический антиген выявляется на 2-3 сутки после инфицирования культуры клеток с множественностью заражения 0,1-0,01 ТЦД_{50/см³}/клетку. На рисунке 2 показана специфическая гранулярная цитоплазматическая флуоресценция в инфицированных клетках. При инкубации тест препаратов с культуральными жидкостями не продуцирующего антитела клона флуоресценция отсутствует.

В результате проведенных исследований установили, что МкАт клона 7F7 к рекомбинантному р30 специфично взаимодействовали только с антигенами вируса АЧС инфицированных культуральных тест-препаратов и не взаимодействовали с антигенами тест-препаратов интактной культуры клеток *CV-1* и препаратами вируса болезни Тешена и болезни Ауески. Активность МкАт в РНИФ составляла 1:256 – 1:512.

Определение специфичности моноклональных антител полученных клонов 5D11; 7F7; 2B7 методом непрямого ТФ ИФА подтвердила, что МкАт специфически взаимодействовали с антигеном вируса АЧС и с рекомбинантным белком р30 и не

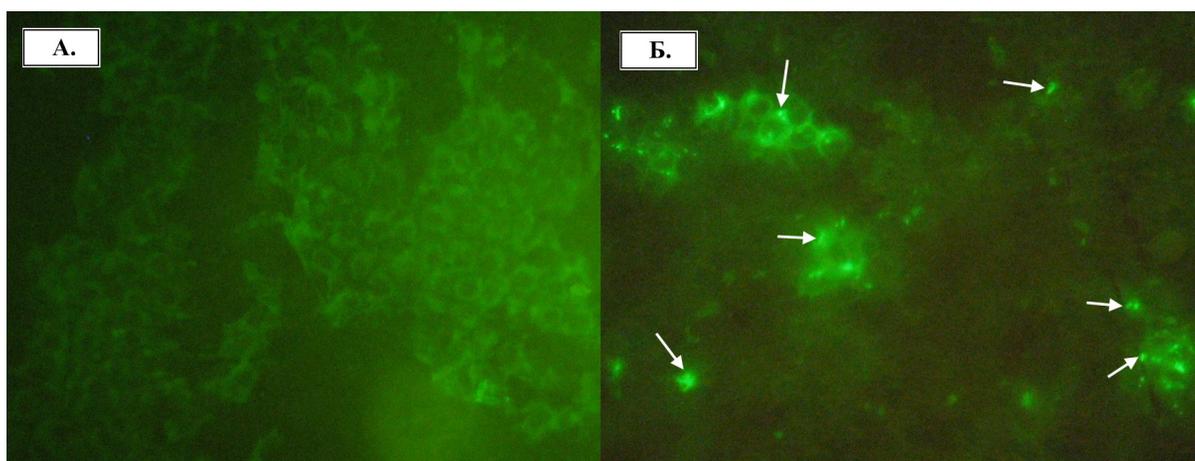


Рис. 2 – Выявление вируса АЧС в инфицированной культуре клеток в РНИФ. А – специфический культуральный тест-препарат, инфицированной авирулентным вирусом АЧС штамма 691/88 культуры клеток CV-1, фиксированной ацетоном, инкубированный с культуральной жидкостью не продуцирующего антитела клона гибридом; Б – специфический культуральный тест-препарат, инкубированный с культуральной жидкостью продуцирующего антитела клона 7F7.

взаимодействовали с отрицательными антигенами - с лизатом интактных культур клеток CV-1, РК-15, ПСГК и лизатом клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)pLysS.

Изучение возможности использования МкАт для выявления антигена вируса АЧС в пробах селезенки инфицированных животных методом непрямого ТФ ИФА показало, что активность МкАт в культуральной жидкости гибридом клонов 5D11; 7F7; 2B7 составляла 1:125 - 1:250, а с лизатом рекомбинантного р30 - 1:10000.

Активность МкАт клонов 5D11; 7F7; 2B7 к специфическому культуральному антигену вируса АЧС штамма 691/88 составляла 1:125-1:2000.

Следовательно, полученные моноклональные антитела активны и специфичны и пригодны для диагностических исследований при АЧС в реакциях непрямо́й иммунофлуоресценции, ТФ ИФА, иммуноцит- и иммуногистохимии.

Заключение. Полученные нами моноклональные антитела клонов 5D11; 7F7; 2B7 к рекомбинантному белку р30 при исследовании в непрямо́м ТФ ИФА не взаимодействуют с нормальными антигенами культуры клеток CV-1, антигенами *E.coli*, и гетерологичных вирусов, что свидетельствует об их специфичности. В РНИФ МкАт к рекомбинантному р30

специфично взаимодействовали только с антигенами вируса АЧС инфицированных культуральных тест-препаратов и не взаимодействовали с антигенами тест-препаратов интактной культуры клеток CV-1 и препаратами гетерологичных вирусов. Активность МкАт в РНИФ составила 1:256 – 1:512.

При определении полипептидной специфичности в иммуноблоттинге МкАт взаимодействовали с рекомбинантным белком р30 и культуральным антигеном вируса АЧС. На уровне молекулярной массы 14 и 30 кДа наблюдали соответствующее специфическое окрашивание.

Анализ определения антигена вируса АЧС на ранних стадиях инфицирования культуры клеток и чувствительных животных показал возможность его выявления на 2-3 сутки после инокуляции культуры клеток.

Работа содержит оригинальные и новые результаты в области вирусологии и диагностики, выполнена коллективом авторов в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии в 2012 г. по плановым тематикам НИР и при финансовой поддержке РФФИ в рамках гранта № 12-04-31378 «Рекомбинантные белки вируса АЧС для изучения основ его иммуногенности и патогенности» (Договор № 12-04-31378\12 от 22.10.2012).

Библиографический список

1. Family Asfarviridae / L.K. Dixon, J.V. Costa, J.M. Escribano [et al.] // Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. - San Diego: Summers Academic Press, 2000. - P. 159-165.
2. Andres, G. Characterization of two african swine fever virus 220-kDa proteins: a precursor of the major structural protein p150 and an oligomer of phosphoprotein p32 / G. Andres, C. Simon-Mateo, E. Vinuela // Virology. - 1993. - № 194. - P. 284-293.
3. Characterisation of p30 a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus / C.L. Afonso, C. Alcaraz, A. Brun [et al.] // Virology. - 1992. - № 189(1). - P. 368-373.
4. Пат. 2463343RU 2463343 C1. Штамм клеток *E.coli* BL21(DE3)pLysS, клон рТТ9/ASFVp30, содержащий рекомбинантную плазмиду со встройкой участка гена CP204L вируса африканской чумы свиней, кодирующего конформационный эпитоп белка р30, пригодный для изготовления диагностических препаратов/ В.О. Копытов, С.Ж. Цыбанов, А.С. Казакова, Т.Э. Южук, С.А. Белянин, А.Г. Гузалова, Н.Н. Власова, Д.В. Колбасов (RU). - № 2011141517/10; заявлено 13.10.2011; опублик. 10.10.2012, Бюл.№28. - 8 с.
5. Davanloo, P. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2035-9.
6. Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-30.
7. Laemmli, U.K Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. - 1970. - № 227. - P. 680-685.
8. Kyhse-Andersen, J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose/ J. Kyhse-Andersen // J. of Biochem. and Biophys. Methods. - 1984. - Vol.10. - №3/4. - P.203-209.
9. Методические положения по получению моноспецифической сыворотки к рекомбинантному белку р30 вируса африканской чумы свиней (АЧС) / Н.Н. Власова, А.С. Казакова, А.С. Першин, О.В. Капустина, Т.Э. Южук/ ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии - Покров, 2011. - изд.1. - С.1-14.
10. Казакова, А.С. Моноспецифическая сыворотка к рекомбинантному белку р30 для изучения африканской чумы свиней (АЧС) / А.С. Казакова, А.А. Варенцова, А.С. Першин, С.А. Белянин, Т.Э. Южук, В.М. Лыска, С.П. Живодеров, Н.Н. Власова// Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. - 2011. - №71(07). - С.1-15. - Шифр Информрегистра: 0421100012\0283. - Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2011/07/pdf/45.pdf>. - Загл. с экрана.
11. Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to an african swine fever virus / C.I. Alcaraz, M. De Diego, M.J. Pastor [et al.] / J. Vet. Diagn. Invest. - 1990. - № 2. - P. 191-196. Davanloo, P. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2035-9.
12. Копытов, В.О. Клонирование и экспрессия генов структурных белков р30 и р72 вируса африканской чумы свиней: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. - Покров, 2004.