

УДК 619:616 98:578 828 11:615.37

Полимеризованные антигены для получения моноспецифической сыворотки к ВЛКРС

В.М.Жавненко, И.Ю.Богатова, Витебская государственная академия ветеринарной медицины

Диагностические сыворотки к антигенам ВЛКРС получают на лабораторных животных, применяя ту или иную схему иммунизации. Получаемые при этом иммуноглобулины чрезвычайно гетерогенны и для некоторых исследований не пригодны, что побуждает изыскивать методы получения моноспецифических антител, содержащих, как правило, иммуноглобулины одной специфичности.

Один из таких методов - иммуносорбция, позволяющая выделять как антигены, так и антитела в чистом виде, без которых нельзя обойтись в современной экспериментальной и прикладной иммунологии. Наиболее эффективные, стабильные и специфичные иммуносорбенты можно получить с помощью глутарового альдегида. Как известно, глутаровый альдегид является дивальдегидом и связывается с ϵ -аминогруппами аминокислот, в частности лизина, и вызывает образование нерастворимых высокомолекулярных белковых полимеров. Наиболее успешно иммобилизация любого белка с сохранением иммунологических свойств происходит, если полимеры получают при pH-5,0. А чтобы все это произошло в раствор необходимо добавить вспомогательный белок - бычий сывороточный альбумин (БСА). Он обладает многочисленными остатками лизина, относительно дешев и доступен. Если в раствор, содержащий белок и БСА, добавить глутаровый альдегид, то между молекулами всех белков образуются перекрестные связи. При проведении реакции при pH-5,0 БСА переходит в нерастворимое состояние раньше других белков и служит для них нерастворимым носителем.

Мы изучили возможность получения моноспецифических антител к антигенам ВЛКРС, используя полимеризацию вирусных белков глутаровым альдегидом. В качестве вирусных белков использовали антигены ВЛКРС и анти-сыворотки к ним из "Набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота" производства Курской биофабрики.

Вначале готовили иммуносорбент. Для этого 100мг вирусного антигена и 400мг БСА растворяли в 10 мл 0,2 М ацетатного буфера с pH-5,0. Проверяют pH и, если необходимо, доводят pH до 5,0 с помощью 1N HCl. К этому раствору добавляли 2 мл 2,5% -ного водного раствора глутарового альдегида. Глутаровый альдегид добавляли по каплям при осторожном перемешивании

раствора белка. Смесь оставляли при комнатной температуре на ночь. За это время происходит гелеобразование. Нами установлено, что концентрация белка должна поддерживаться в пределах 40-50 мг и количество БСА должно в четыре раза превышать количество антигена. Если имеющегося антигена мало, то для увеличения объема полимера следует к одной части антигена прибавить девять частей БСА. Если антиген представляет сильно разведенный раствор, то БСА нужно растворять прямо в этом растворе до концентрации 50 мг/мл. Количество прибавляемого глутарового альдегида должно быть пропорционально (10%) количеству белка, при этом важно прибавлять разбавленный раствор глутарового альдегида (2,5%), чтобы гелеобразование проходило медленно, захватывая все белки. Образовавшийся гель тщательно промывают забуференным фосфатным буфером, а затем элюирующим раствором для удаления нековалентно связанных белков, тщательно гомогенизируют, пропуская с помощью шприца через иглу, и суспендируют в фосфатном буфере с pH-7,4. Центрифугируют, надсадочную жидкость сливают, повторно гомогенизируют и суспендируют в 0,2 М HCl-глициновом буфере с pH-2,8. Перемешивают 15 минут при комнатной температуре и центрифугируют. Гранулы геля нейтрализуют 1 М K_2HPO_4 . Промывают дистиллированной водой и переносят гель в раствор лизина, инкубируют ночь при температуре 4°C. После этого промывают фосфатным буфером и в нем оставляют, добавив азид натрия. Полученный иммуносорбент можно хранить при 4°C продолжительное время.

Нами установлено, что если гель гомогенизируют, продавливая через иглу, то во время выхода геля ее конец надо прижать к внутренней стенке пробирки. Инкубация иммуносорбента с лизином необходима для блокирования любых оставшихся активных альдегидных групп.

Выделение антител проводят следующим образом. Полученный иммуносорбент центрифугируют и сливают надсадочную жидкость, добавляют 20 мл гипериммунной сыворотки и перемешивают 1 час при комнатной температуре. Затем центрифугируют и сливают надсадочную жидкость. Иммуносорбент промывают холодным ЗФР путем центрифугирования до тех пор, пока $OP_{25\%}$ не станет меньше 0,05. Затем проводят элюцию 50 мл 0,2 М HCl-глицинового буфера pH- 2,8. Элюцию повторяют этим же буфером с pH-2,2. Элюаты объединяют и нейтрализуют 1 М раствором K_2HPO_4 . Затем проводят диализ против ЗФР на холоду. Полученные моноспецифические антитела консервируют азидом натрия и проверяют в РИД. Иммуносорбент можно использовать повторно.

Показано, что иммобилизованные глутаровым альдегидом антигены сохраняют до 25% исходной антителосвязывающей способности, имевшейся у растворимых антигенов. Полученная моноспецифическая сыворотка, по данным РИД, реагирует только со своим антигеном.