

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ПРИ ПОСТАНОВКЕ ИММУНОБЛОГИНГА, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Красочко П.А.¹, Бойчук С.В.,¹ Кабась С.С.,¹ Рыбаков С.С.², Егоров А.А., Рябоконт А.А.² РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им С.Н. Вышелесского НАН Беларуси»¹, ФГУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных»²

Прионные инфекции – группа заболеваний, вызываемых прионами, характеризующихся преимущественным поражением нервной системы, длительным инкубационным периодом и неизбежным летальным исходом. В последние годы признано, такие инфекционные заболевания, как скрепи овец (СО), губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота (ГЭ КРС), болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ) и др. вызываются прионами и при этом их возбудитель обладает свойством преодолевать видовой барьер.

Поскольку эффективного лечения прионных инфекций не существует, особое внимание должно уделяться их диагностике с целью не допущения попадания больных животных в пищевую цепь.

В диагностических лабораториях различных стран мира на первом этапе используются иммунологические методы диагностики ГЭ КРС.

Иммунологические методы основаны на выявлении PrP^{Sc} с помощью моноспецифических или моноклональных антител. Применение быстрых иммунологических методов является перспективным направлением, поскольку их применение позволяет поставить диагноз со 100%-ной достоверностью за 2-3 месяца до появления характерных гистологических изменений.

Для проведения иммунологической диагностики прионных инфекций используются различные иммунологические методы: иммуноблотинг, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунолюминисцентный тест (ИЛТ), иммуногистохимический метод. Использование иммунологических методов для диагностики ГЭ КРС имеет некоторые особенности. Так, большинство диагностических антител связываются как с PrP^{Sc} так и с PrP^C. Фактором, позволяющим их дифференцировать, является их устойчивость к протеиназе К, разрушающей PrP^C, но не разрушающей PrP^{Sc}. Поэтому большинство используемых иммунологических методов включают этап обработки пробы протеиназой К. Часто вводится дополнительный этап концентрирования пробы в связи с низким содержанием PrP^{Sc} в тканях. Концентрирование пробы производится путём ультрацентрифугирования. Поскольку в клетке PrP^{Sc} находится в виде скрепи-ассоциированных фибрилл, вторичная и третичная структуры отдельных молекул PrP^{Sc} таковы, что доступ антител к ним затруднен. В связи с этим при диагностике ГЭ КРС методами ИФА, ИЛТ и иммуноблотинга

подготовка пробы к исследованию включает в себя этап денатурации PrP^{Sc} с целью разрушения скрепи-ассоциированных фибрилл (САФ) и “развёртывания” отдельных молекул PrP^{Sc} для оптимизации доступа антител к антигенным детерминантам.

В большинстве стран мира для диагностики ГЭ КРС широкое распространение получил иммуноблоттинг. Одним из важных компонентов реакции при постановке иммуноблоттинга являются антитела, способные выявлять прион.

Целью настоящих исследований явилось сравнительное изучение специфичности различных моноклональных и моноспецифических антител при постановке иммуноблоттинга.

Материалы и методы. В работе по определению оптимальных для постановки иммуноблоттинга антител нами были использованы коммерческие моноклональные антитела 6Н4, а также моноспецифические антитела против синтетических пептидов, включающих антигенные детерминанты PrP. Положительным антигеном при постановке иммуноблоттинга использован рекомбинантный прионный белок крупного рогатого скота и мозг хомяков, заражённых возбудителем скрепи (штамм 263К).

Антисыворотки получали на иммуногенные препараты, приготовленные на основе синтетических пептидов, включающих антигенные детерминанты PrP (наиболее гидрофильные участки аминокислотной последовательности белка). Антисыворотки получали посредством иммунизации лабораторных животных (кроликов) водно-масляными эмульсиями, приготовленными на основе полного или неполного адьюванта Фрейнда и водных растворов свободных пептидов-фрагментов PrP или их конъюгатов с белками-носителями (овальбумином, бычьим сывороточным альбумином, гемоцианином *Фиссурелии*). Животных иммунизировали по схеме, обычно применяемой для получения гипериммунных сывороток.

Антипептидную активность полученных сывороток предварительно определяют методом ИФА, и, в дальнейшем, используют в иммуногистохимическом методе только те из них, которые имеют активность 10^4 и выше.

Постановку реакции иммуноблоттинга проводили общепринятым методом в соответствии с требованиями AG Prionix в следующей последовательности:

Гомогенизация, ферментное разрушение белков, денатурация прионов, электрофорез, блоттинг, обработка моноклональными или моноспецифическими антителами, обработка конъюгатом, обработка субстратной смесью, учет результатов.

Гомогенизацию участков продолговатого мозга больных или подозрительных на ГЭ КРС животных гомогенизировали в течение 1 мин при помощи гомогенизатора при 20000 об/мин в 10-кратном объёме буфера для гомогенизации (0,5% NP-40 и 0,5% натрия деоксихолата в фосфатном буфере pH 7,4).

Ферментное разрушение белков проводили в 96-луночной планшете с объёмом лунки 0,2 мл. Для ферментного разрушения вносили по 100 мкл гомогената мозга, добавляли 10 мкл протеиназы К (20Ед/мл) и хорошо перемешивали пипеттированием. Ферментное разрушение проводили при 48°C в течение 40 мин. И после инкубации добавляли 10 мкл 0,001М раствора ингибитора протеаз PMSF (про-

изводство Sigma) для остановки протеолитической реакции.

Денатурацию проб проводили путем инкубирования при 96 °С в течение 5 мин. разрушенных протеиназой К участков мозга.

Электрофорез проводили в готовых 17-луночных кассетах с 12%-ным полиакриламидным гелем и буфером NuPAGE MOPS/SDS при 200V в течение 40 мин.

Для блоттинга использовали PVDF мембрану с диаметром пор 0,45 мкм. Его проводили при постоянном напряжении 150 V в течение 60 минут и сила тока колебалась в пределах 1,0 – 1,3 А, но в связи с выделением значительного количества теплоты в процессе блоттинга, применяли принудительное охлаждение.

Обработку антителами нитроцеллюлозной мембраны проводили после блокирования не специфически связывающих ее участков путем инкубирования в 5%-ном растворе сухого молока на фосфатном буфере в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем добавляли раствор моноклональных или моноспецифических антител в TBST pH 7,4 в рабочем разведении и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 минут на качающейся платформе, а после инкубации мембрану промывали отмывающем буфере с твином 3 раза по 5 мин.

В качестве вторых антител использовали антитела козла против иммуноглобулинов мыши, меченные щелочной фосфатазой (производство Sigma) в разведении 1:5000 или пероксидазой хрена (производство НИИЭМ им. Гамалеи). В раствор конъюгата помещали мембрану и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут с постоянным помешиванием на качающейся платформе, после чего промывали буфером 5 раз по 5 мин.

Нанесение субстратной смеси. В зависимости от вида конъюгата использовали и различные субстратные растворы.

При использовании в качестве конъюгатов антимишанных антител со щелочной фосфатазой, мембрану помещали на 5 мин. в люминесцентный буфер. Растворили 100 мкл CDP-Star в 5 мл люминесцентного буфера. Мембрану помещали на стекло, на её поверхность наносили 5 мл раствора CDP-Star, распределяли его равномерно по всей поверхности мембраны и инкубировали 5 мин. при комнатной температуре. С поверхности мембраны удаляли субстрат при помощи мягкой ткани. На мембрану при красном свете накладывали рентгеновскую плёнку, помещали в светонепроницаемую кассету и выдерживают при комнатной температуре примерно 15-20 мин. Рентгеновскую плёнку проявляли и проводили интерпретацию полученных результатов.

При использовании в качестве конъюгатов антимишанных антител пероксидазы хрена мембрану помещали на 5 минут в раствор диаминобензидина в концентрации 0,5 мг/мл и перикиси водорода 0,5 мг/мл в фосфатном буферном растворе pH 7,4 до появления полос. Реакция останавливается промыванием мембраны водой. После высушивания мембраны на воздухе проводится учет результатов.

Результаты исследований. При использовании моноклональных антител 6H4 в разведении 1:5000 была получена положительная реакция как при исследовании мозга хомяков, заражённых штаммом скрепи 263K, так и при исследовании рекомбинантного прионного белка крупного рогатого скота (рис. 1)



Рисунок 1. Постановка иммуноблотинга с моноклональными антителами 6H4.

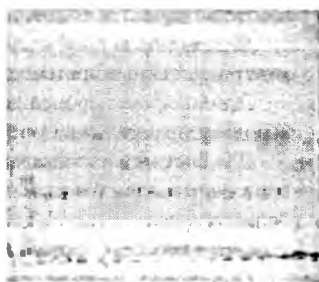


Рисунок 2. Постановка иммуноблотинга с моноспецифическими антисыворотками против синтетических пептидов, включающих антигенные детерминанты PrP

При использовании моноспецифических антисывороток, полученных на иммуногенные препараты, приготовленные на основе синтетических пептидов, включающих антигенные детерминанты PrP в разведении 1:1000 установлено, что они реагируют с прионами крупного рогатого скота и с мозгом хомяков, заражённых штаммом скрепи 263К (рис 2).

Таким образом, для диагностики прионных инфекций могут быть использованы как моноклональные антитела 6H4, так и антисыворотки, полученные на иммуногенные препараты, приготовленные на основе синтетических пептидов, включающих антигенные детерминанты PrP.

Выводы

Для детекции прионов крупного рогатого скота и скрепи можно использовать как моноклональные антитела 6H4, так и антисыворотки, полученные на иммуногенные препараты, приготовленные на основе синтетических пептидов, включающих антигенные детерминанты PrP.