

4. Immunodetection of a disease specific PrP fraction in scrapie-affected sheep and BSE-affected cattle. Mohri S., Farwuhar C. F., Somerville R. A. e. a. // Vet. Rec. – 1992. – Vol 131, № 23. – P. 537 – 539.

5. Immunodiagnosis of bovine spongiform encephalopathy. Pocchiarri M., Xi Y. G., Ingrosso L. e. a. // Livestock Prod. Sci. – 1994. – Vol. 38, №1. – P. 41 – 46.

6. Immunologic and molecular biologic studies of prion proteins in bovine spongiform encephalopathy. Prusiner S. B., Fuzi M., Scott M. e. a. // J. Infect. Dis. – 1993. – Vol. 167. – P. 602 – 613.

Резюме.

В статье описана разработанная нами методика диагностики ГЭ КРС методом иммуноблотинга с использованием пероксидазного конъюгата и диаминобензидина в качестве субстрата в сравнении с традиционным хемилюминесцентным вариантом.

УДК 619:578.894:636.22/8

П.А.Красочко, доктор ветеринарных наук, профессор,

С.В.Бойчук, младший научный сотрудник.

Н.Н.Полешук, доктор медицинских наук,

С.П.Капитулец, кандидат биологических наук,

Н.Н.Капитулец, кандидат биологических наук.

РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им.

С.Н. Вышелесского НАН Беларуси».

ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии МЗ Республики Беларусь»,

г.Минск, Беларусь

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ДИАГНОСТИКЕ ПРИОННЫХ ИНФЕКЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

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 [1, 2].

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

В настоящее время для лабораторной диагностики губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота применяется 4 основных метода исследований: гистологический, электронно-микроскопический, иммунологический и биологический.

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 [3, 4].

Для проведения иммунологической диагностики прионных инфекций используются различные иммунологические методы: иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунолюминисцентный тест (ИЛТ), иммуногистохимический метод [5]. 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

затруднён. 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 антигенов к антигенным детерминантам [6, 7].

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

Целью настоящих исследований явилось сравнительное изучение различных типов моноклональных и моноспецифических антител при постановке иммуноблотинга.

Материалы и методы. В работе по определению оптимальных для постановки иммуноблотинга антител нами были использованы коммерческие моноклональные антитела 6Н4, 3F4, SAF 70, а также полученные нами моноспецифические антитела к тканям головного мозга крупного рогатого скота. Положительным антигеном при постановке иммуноблотинга использован рекомбинантный прионный белок крупного рогатого скота и мозг хомяков, заражённых возбудителем скрепи (штамм 263К).

Постановку реакции иммуноблотинга проводили общепринятым методом в соответствии с требованиями AG Prionixs 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-луночном 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 раствор

ингибитора протеаз PMSF (производство 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 блотинга 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 A, но в связи с выделением значительного количества теплоты в процессе блотинга, 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 в 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 антимышинных антител со щелочной фосфатазой, мембрану помещали на 5 мин. в люминесцентный буфер. Растворяли 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 антимышиных антител спероксидазой 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 3F4 в разведении 1:5000 была получена чёткая положительная реакция при исследовании мозга хомяков, заражённых штаммом скрепи 263К. При исследовании рекомбинантного прионного белка крупного рогатого скота получена отрицательная реакция, моноклональные антитела 3F4 не реагируют с прионами крупного рогатого скота.

При использовании моноклональных антител SAF 70 в разведении 1:5000 была получена чёткая положительная реакция как при исследовании мозга хомяков, заражённых штаммом скрепи 263К, так и при исследовании рекомбинантного прионного белка крупного рогатого скота.

При использовании моноклональных антител 6Н4 в разведении 1:5000 была получена положительная реакция как при исследовании мозга хомяков, заражённых штаммом скрепи 263К, так и при исследовании рекомбинантного прионного белка крупного рогатого скота, однако выраженность реакции (отношение сигнал/фон) была несколько меньше, чем при использовании антител SAF 70.

Также нами была изучена возможность одновременного использования трёх изучаемых моноклональных антител. При этом изучаемые антитела использовали в разведении 1:15000. Установлено, что смесь трёх антител в разведении 1:15000 даёт более чёткий сигнал, чем каждое из антител в разведении 1:5000. Природа этого явления, по-видимому, состоит в усилении суммарного сигнала при более низкой концентрации отдельных антител обусловлено отсутствием конкуренции за

свободные эпитопы антигена между антителами различных клонов.

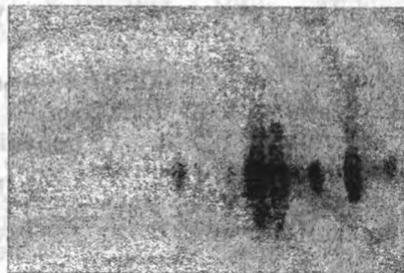


Рис.1 Иммуноблотинг с антителами 3F4.



Рис.2 Иммуноблотинг с антителами 6H4.

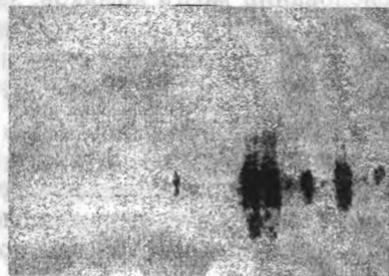


Рис.3 Иммуноблотинг с антителами SAF70.

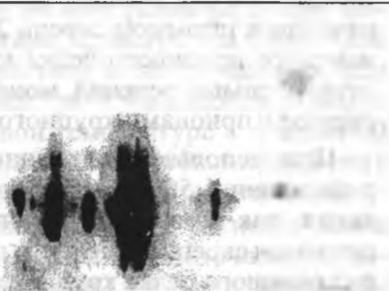


Рис.4 Иммуноблотинг со смесью антител.

При использовании моноспецифических мышиных антител против тканей мозга крупного рогатого скота в разведении 1:100 установлено, что они не реагируют с прионами крупного рогатого скота и с мозгом хомяков, заражённых штаммом скрепи 263К.

Таким образом, для диагностики прионных инфекций могут быть использованы моноклональные антитела 6H4, 3F4, SAF 70. Моноклональные антитела 3F4 позволяют выявлять прионы скрепи хомяков, но не реагируют с прионами крупного рогатого скота. Моноклональные антитела 6H4 и SAF 70 реагируют как с прионами скрепи хомяков, так и с прионами крупного рогатого скота, однако антитела SAF 70 дают несколько более выраженную реакцию. Для повышения чувствительности ди-

агностики прионных инфекций методом иммуноблотинга можно использовать смесь антител 6Н4, 3F4 и SAF 70.

Выводы.

Для детекции прионов крупного рогатого скота и скрепи можно использовать как моноклональные антител 6Н4 и SAF 70 в разведении 1:5000 или смесь антител 6Н4, 3F4 и SAF 70 в разведении 1:15000.

Литература.

1.Авилов А. М., Яроменко Н. А., Караваев Ю. Д. Подострые спонгиозные энцефалопатии животных. // Ветеринария. – 1997. – № 11. – С.

2.Е. В. Гусева, Т. А. Сатина, С. С. Рыбаков Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота. – Владимир: ОКНИИ-иМС, 1997. – 91 с

3.Immunohistochemistry for the prion protein: comparison of different monoclonal antibodies in human prion disease subtypes. G. Kovacs, M. W. Head, I. Hegyi e. a. // Brain Pathology. – 2002. – Vol. 12 – P. 1 – 11.

4.Harmeyer S., Pfaff E., Groschup M. H. Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. // Journal of General Virology. – 1998. – Vol. 79. – P. 937 – 945.

5.Preparation and characterization of antibodies against mouse prion protein (PrP) peptides. T. Yokoyama, K. Kimura, Y. Tagawa, N. Yuasa. // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 1995. – Vol. 2, № 2. – P. 172 – 176.

6.Farquahar C. F., Somerville R. A., Ritchie L. A. Postmortem immunodiagnosis bovine spongiform encephalopathy. // J. Virol. Methods. – 1989. – Vol. 24. – P. 215 – 222.

7.Immunodetection of a disease specific PrP fraction in scrapie-affected sheep and BSE-affected cattle. Mohri S., Farwuhar C. F., Somerville R. A. e. a. // Vet. Rec. – 1992. – Vol 131, № 23. – P. 537 – 539.

Резюме.

В статье приводятся результаты сравнения различных моноклональных антител (6Н4, 3F4 и SAF 70) при диагностике ГЭ КРС методом иммуноблотинга.