

УДК 616.988.21:616-078

Н.А. Шарапова, М.Н. Киреев, Е.Г. Абрамова, С.В. Генералов, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов,
Н.Е. Терешкина, Е.А. Михеева, Л.В. Савицкая, А.В. Гаева, А.К. Никифоров

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОПРОТЕИДА ИЗ ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА «МОСКВА 3253» И КОНСТРУИРОВАНИЕ НА ЕГО ОСНОВЕ ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

Описаны результаты выделения гликопротеида из фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» с применением неионного детергента с последующей хроматографической очисткой. Показана возможность применения полученного антигена вируса бешенства в качестве иммунореактива при конструировании диагностикума путем конъюгации с наночастицами коллоидного золота для выявления специфических антител в иммунных сыворотках лошадей-продуцентов и в препарате антирабического иммуноглобулина в дот-иммуноанализе.

Ключевые слова: гликопротеид, фиксированный вирус бешенства, диагностикум

ISOLATION OF GLICOPROTEID FROM THE FIXED RABIES VIRUS, STRAIN «MOSCOW 3253», AND CONSTRUCTING OF DOT-IMMUNOASSAY DIAGNOSTICUM ON ITS BASIS

N.A. Sharapova, M.N. Kireyev, E.G. Abramova, S.V. Generalov, Zh.V. Matveyeva,
I.M. Zhulidov, N.E. Tereshkina, E.A. Mikheyeva, L.V. Savitskaya, A.V. Gayeva, A.K. Nikiforov

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

Described here are the results of glicoproteid isolation from the fixed rabies virus, strain «Moscow 3253», using non-ionic detergent with subsequent chromatographic purification. The obtained antigen was demonstrated to be applicable as immunoreagent for construction of diagnosticum, by means of conjugation with colloid gold nanoparticles. The diagnosticum is meant for detection of specific antibodies in immune sera of horses-producers, and in the preparation of anti-rabies immunoglobulin, in dot-immunoassay.

Key words: glicoproteid, fixed rabies virus, diagnosticum

ВВЕДЕНИЕ

Учитывая широкое распространение бешенства и возрастающий объем проводимых лечебно-профилактических мероприятий, конструирование и усовершенствование диагностикумов для выявления антирабических антител остаётся актуальной проблемой [1, 9–11].

Гликопротеид, входящий в состав наружного белкового слоя липопротеиновой оболочки рабдо-вирусов и образующий на поверхности вириона шипы длиной 5–10 нм, играет ведущую роль в прикреплении вирионов в клетке и определяет типовую специфичность рабдовирусов [1, 2, 6, 9, 12, 15]. Гликопротеид является наиболее мощным иммуногеном, индуцирующим образование вируснейтрализующих антител, что позволяет рассматривать его как эффективный иммунореактив для конструирования диагностикумов, достоинством которых является отсутствие балластных внутренних компонентов вируса, способствующих проявлению неспецифических реакций и исключение инфекционного материала при анализе [2, 9].

Технология получения очищенных гликопротеидов связана с решением двух основных проблем: дезинтеграцией вирусных частиц, очисткой гликопротеидов от субвирусных компонентов и солюбилизирующего агента. В основном для дезинтеграции вирусных частиц применяют детергенты [1, 2, 4, 8, 9]. В литературе описано большое

количество методов и различных детергентов, с помощью которых удается извлечь поверхностные гликопротеиды вирусов гриппа, парагриппа, везикулярного энцефаломиелита лошадей, клещевого энцефалита, герпеса и бешенства [1–4, 8, 9]. Наиболее мягкое и селективное действие на вирусную оболочку оказывают неионные детергенты. Из неионных детергентов для получения вирусных гликопротеидов чаще всего применяется тритон X-100 [ПЭГ-(9-10)-p-t-октилфенол]. Обработка вирусов данным детергентом не сопровождается солюбилизацией липидного компонента и выходом в раствор внутренних вирусных белков. Это позволяет получать препараты высокой степени чистоты. Для отделения солюбилизованных гликопротеидов от внутренних вирусных белков используют гель-фильтрационную хроматографию, центрифугирование и диализ. Диализом могут быть удалены низкомолекулярные и хорошо растворимые вещества. Следует подчеркнуть, что очистка от детергента является одним из основных этапов процесса получения очищенных, биологически активных гликопротеидов [2].

Целью настоящего исследования явилось выделение и очистка гликопротеида из фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», его характеристика и конструирование на основе выделенного антигена диагностикума для определения титра антирабических антител в дот-иммуноанализе (ДИА).

МЕТОДИКА

Фиксированный вирус бешенства (штамм «Москва 3253») выращивали в культуре перевиваемых клеток Vero. Вирус очищали гель-хроматографией и концентрировали тангенциальной ультрафильтрацией. Гликопротеид вируса бешенства выделяли из концентрированного тангенциальной ультрафильтрацией и очищенного гель-хроматографией фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» культурального происхождения. Работы по получению и инаktivации культурального вируса бешенства проводили в соответствии с МУ 3.3.1.1099-02 «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства».

Для выделения гликопротеида использовали известную методику [13]. Тритон X-100 добавляли к суспензии очищенного и концентрированного фиксированного вируса бешенства (концентрация 5,9 мг/мл) до конечной концентрации 2 %. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин и охлаждали на ледяной бане (5 мин). Затем смесь центрифугировали на Eppendorf 5415R при 13000 об/мин в течение 2,5–3 ч при температуре 4 °С. Супернатант, содержащий G-белок, диализировали против раствора бикарбоната аммония 0,01M NH₄HCO₃ pH 7,8 в течение 48 ч со сменой буфера через 8 ч и лиофилизировали на установке для лиофилизации «ALPHA I-5».

Лиофилизированный материал растворяли в 1 мл деионизованной воды и осаждали в 15 объемах охлажденного ацетона путем центрифугирования на Eppendorf 5415R при 5000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Далее преципитат отмывали однократно охлажденным до температуры минус 20 °С этанолом путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С, затем дважды отмывали горячим этанолом (56 °С) центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин при температуре 22 °С. Осадок растворяли в 1 мл раствора 0,01 M NH₄HCO₃ (pH 7,8) и лиофилизировали. Далее полученный препарат растворяли в 1 мл деионизованной воды и проводили гель-фильтрацию на хроматографической системе «ЛКВ». В качестве носителя использовали TSK-гель HW-65, упакованный в хроматографическую колонку размером 15 × 250 мм, уравновешенную 3 свободными объемами 0,01 M фосфатного буфера pH 7,3, содержащего 0,137 моль/л NaCl и 0,0027 моль/л KCl (буфер элюции). Подготовленную пробу наносили на колонку в объеме 0,5–1 мл. Выход белков контролировали на проточном спектрофотометре при длине волны 280 нм. Степень очистки оценивали с помощью электрофореза в 12 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН) и с набором белков стандартной молекулярной массы: бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овальбумин (45 кДа).

Содержание белка в полученном препарате определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Для характеристики антигенных свойств гликопротеида проводили иммунизацию мышей инбредной линии BALB/c массой 18–20 г (питомник РосНИПЧИ «Микроб»), прошедшим контроль генетической стандартности лабораторных животных инбредных линий. Манипуляции с животными проводили в соответствии с Приказом № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (2003) и «Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (2003). Животных иммунизировали следующими антигенами: изолированным гликопротеидом; цельным вирусом культурального происхождения; гликопротеидом с наночастицами коллоидного золота в качестве адьюванта и гликопротеидом с полным адьювантом. Антиген вводили в дозе 25 мкг/мышь при первой иммунизации и 50 мкг/мышь в последующие четыре иммунизации. Отрицательным контролем служили сыворотки мышей, которым вводили 0,9%-й раствор хлорида натрия. Антигены вводили внутрибрюшинно с двухнедельным интервалом. Первое введение антигена с полным адьювантом Фрейнда осуществляли подкожно. Кровь для исследования на наличие специфических антител брали из хвостовой вены после третьей и пятой иммунизаций на пятые сутки после инъекции. Уровень специфических антител в сыворотках определяли в ИФА с использованием антивидового пероксидазного конъюгата.

Охарактеризованные образцы очищенного гликопротеида объединяли, лиофилизировали и использовали в качестве иммунореакта для конструирования диагностикума для прямого ДИА [7] и для сенсibilизации твердой фазы при постановке непрямого ДИА. В качестве маркера при изготовлении диагностикума использованы наночастицы коллоидного золота со средним диаметром частиц 15–17 нм, которые получали по методу Г. Френса с использованием цитрата натрия в качестве восстановителя золотохлористоводородной кислоты при 100 °С [14]. В качестве подложки (твердой фазы) при постановке ДИА применяли расчерченную на квадраты НЦМ с размером пор 0,45 мкм («Millipore»).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате выделения и хроматографической очистки гликопротеида из вируса бешенства на хроматограмме регистрировали два пика, где первый пик предположительно соответствовал конгломератам недезинтегрированного вируса, а второй пик — гликопротеиду с молекулярной массой около 65 кДа, по данным электрофореза. На рисунке 1 «Электрофореграмма гликопротеида вируса бешенства на этапах очистки» представлены данные электрофореза выделенного гликопротеида в сравнении с овальбумином и БСА. Полученные данные подтверждают литературные данные, согласно которым молекулярный вес гликопротеида вируса бешенства составляет 65–90 кДа, в зависимости от способа получения и исходного материала [1, 5, 6, 10].

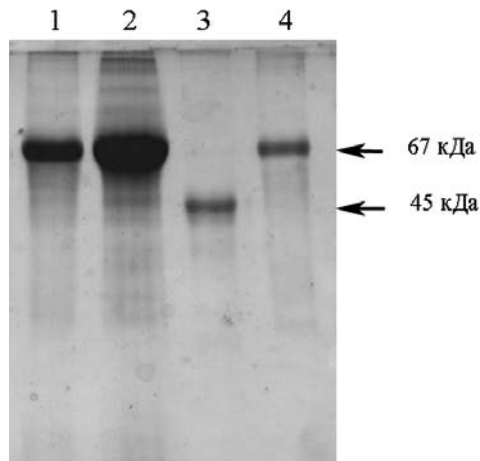


Рис. 1. Электрофореграмма гликопротеида вируса бешенства на этапах очистки. **1** – очищенный гликопротеид фиксированного вируса бешенства; **2** – препарат после осаждения ацетоном и этанолом; **3** – овальбумин (45 кДа); **4** – БСА (67 кДа).

При определении содержания белка в изолятах зафиксированы следующие данные: во фракции, соответствующей 1 пику, уровень содержания белка составил 0,28 мг/мл; во фракции, соответствующей 2 пику – 0,65 мг/мл.

Сыворотки, полученные в результате иммунизации мышей, характеризовались следующими титрами специфических антител: 1/80 – при введении цельного вируса бешенства; 1/160 – 1/320 – при использовании гликопротеида без адьюванта; 1/640 – при иммунизации гликопротеидом с коллоидным золотом и 1/640 – 1/1280 – при инъекциях гликопротеида с полным адьювантом Фрейнда. По результатам наших исследований, иммуногенность очищенного гликопротеида была выше иммуногенности цельного вируса бешенства, причем наибольшей способностью к индукции вируснейтрализующих антител обладал гликопротеид, введенный совместно с полным адьювантом Фрейнда.

На рисунке 2 «Результаты прямого дот-иммуноанализа с использованием конъюгата с наночастицами золота» представлены результаты определения уровня специфических антител в иммунных сыворотках лошадей-производителей и препарате антирабического иммуноглобулина в прямом варианте ДИА, где гликопротеид вируса бешенства использовали как иммунорегент при конструировании диагностикума на основе гликопротеида и наночастиц коллоидного золота. Используемые в качестве маркера при изготовлении диагностикума наночастицы коллоидного золота со средним диаметром частиц 15–17 нм обеспечивают интенсивное розовое или красно-коричневое окрашивание пятен, соответствующих положительной реакции последовательных разведений исследуемых образцов с конъюгатом. Главное преимущество диагностикумов с использованием очищенного гликопротеида заключается в специфичности, поскольку в этом случае анализ настроен на выявление вируснейтрализующих антител. За

титр сыворотки или иммуноглобулина принимали наибольшее разведение, при котором визуально регистрировали четко различимое пятно. При исследовании гипериммунных сывороток лошадей-производителей в прямом ДИА с применением конъюгата, выявили титры специфических антител на уровне 1:320 – 1:640 при отрицательном результате с нормальной лошадиной сывороткой. Такие же титры были получены при исследовании данных сывороток в непрямом ДИА, при постановке которого в качестве сорбируемого на твердой фазе антигена использовали выделенный гликопротеид. Специфическая активность коммерческого препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, выявленная аналогичными методами, составила 1:5000 – 1:10000.

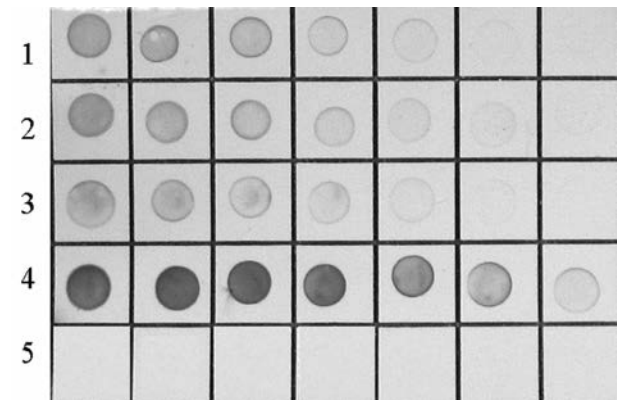


Рис. 2. Результаты прямого дот-иммуноанализа с использованием конъюгата с наночастицами золота. По оси абсцисс: двукратные разведения антирабических сывороток с 1 : 40 и антирабического иммуноглобулина с 1 : 160; по оси ординат: **1–3** ряды – гипериммунные лошадиные сыворотки; **4** ряд – гетерологичный антирабический иммуноглобулин; **5** ряд – нормальная лошадиная сыворотка (отрицательный контроль).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выделенный из фиксированного вируса бешенства штамма Москва «3253» с помощью неионного детергента гликопротеид с последующей хроматографической очисткой на TSK-геле HW-65 охарактеризован по молекулярной массе и антигенным свойствам. Впервые на основе гликопротеида и наночастиц коллоидного золота сконструирован диагностикум для определения уровня специфических антител в иммунных антирабических сыворотках лошадей-производителей и препарате антирабического иммуноглобулина при производстве данного лечебно-профилактического средства.

ЛИТЕРАТУРА

- Акиншина Т.В. Разработка набора реагентов для оценки эффективности поствакцинального иммунитета к вирусу бешенства в серологических реакциях : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Щёлково, 2005. – 28 с.
- Березин В.Э., Зайдес В.М., Жданов В.М. Гликопротеиды оболочечных вирусов, получение

очищенных препаратов и оценка иммуногенных свойств // Вопросы вирусологии. — М.: Медицина, 1986. — № 3. — Т. 31. — С. 262—274.

3. Выделение гликопротеидов вируса вене-суэльского энцефаломиелита лошадей и оценка их иммуногенной активности / В.Э. Березин [и др.] // Вопросы вирусологии. — М.: Медицина. — 1985. — № 5. — Т. 30. — С. 568—572.

4. Карпова Е.Ф., Цилинский Я.Я. Гликопротеиды вируса вене-суэльского энцефаломиелита лошадей. Получение и антигенные свойства // Методы исследования в молекулярной, общей и медицинской вирусологии. — М., 1987. — С. 49—51.

5. Кротова Л.И. Изучение структурных белков вируса бешенства : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — М., 1985. — 25 с.

6. Медицинская вирусология: Руководство / под ред. Д.К. Львов. — М.: ООО Медицинское информационное агентство, 2008. — 656 с.

7. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в до-иммуноанализе / Н.А. Шарапова [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — 2009. — Вып. 1 (103). — С. 63—66.

8. Подавление инфекционности оболочечных вирусов с сохранением специфической биологической активности вирусных белков / В.Э. Березин

[и др.] // Вопросы вирусологии. — М.: Медицина, 1986. — № 4. — Т. 31. — С. 475—479.

9. Рахманин П.В. Иммуноферментная тест-система определения уровня антирабических антител в сыворотках крови привитых против бешенства кошек и собак : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — Щелково, 2008. — 29 с.

10. Тимиргалеев Р.В. Усовершенствование методов идентификации вируса бешенства и выявления антирабических антител : автореф. дисс. ... канд. ветер. наук. — Казань, 2006. — 24 с.

11. Эпизоотическая ситуация при бешенстве в Саратовской области / В.И. Еремин [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. Инфекционные болезни. — 2011. — № 4, Т. 7. — С. 860—862.

12. Cox J.H., Dietzschold B., Schneider L.G. Rabies virus glycoprotein. Biological and serological characterization // Infection and immunity. — 1977. — Vol. 16, N 3. — P. 754—759.

13. Dietzschold B. Oligosaccharides of the glycoprotein of rabies virus // Journal of virology. — 1977. — Vol. 23, N 2. — P. 286—293.

14. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in minodisperse gold suspension // Nat. Phys. Sci. — 1973. — Vol. 241, N 105. — P. 20—21.

15. Mcallister P.E. and Wagner R. R. Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses // Journal of virology. — 1975. — Vol. 15, N 4. — P. 733—738.

Сведения об авторах

Шарапова Наталия Анатольевна — м.н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (г. Саратов, 410012, ул. Рахова, д. 137, кв. 84; e-mail: podbor_nat@mail.ru)

Киреев Михаил Николаевич — зав. лабораторией биохимии и протеомики, к. мед. н., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Абрамова Елена Геннадьевна — к.б.н., зав. лабораторией профилактических иммуноглобулинов, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Генералов Сергей Вячеславович — к.б.н., н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Матвеева Жанна Владимировна — н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Жулидов Иван Михайлович — биолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Терешкина Наталья Евгеньевна — к.м.н., с.н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Михеева Елена Александровна — м.н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Савицкая Лидия Владимировна — врач-бактериолог Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Гаева Анна Вячеславовна — м.н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Никифоров Алексей Константинович — к.м.н., доцент, зам. директора по экспериментальной и производственной работе, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»