

И.И.Корсакова<sup>1,2</sup>, Н.П.Храпова<sup>1,2</sup>, Т.В.Замарина<sup>1</sup>, Е.В.Пименова<sup>1</sup>, Н.С.Макаров<sup>2</sup>, Ю.А.Голосеев<sup>1</sup>

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОБЛОТТИНГА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭПИТОПНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНУ 200 КДА ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

<sup>1</sup>ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация; <sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Волгоград, Российская Федерация

Целью работы являлось изучение с помощью иммуноблоттинга эпитопной направленности моноклональных антител к антигену 200 kDa *Burkholderia pseudomallei*, синтезируемых гибридомами-продуцентами из двух коллекций, полученных в лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт».

В работе использовали 8 типичных штаммов возбудителя мелиоидоза с полноценной антигенной структурой. Антигенные препараты разделяли вертикальным электрофорезом в денатурирующих условиях в 12 % полиакриламидном геле с 0,1 % додецилсульфата натрия. При тиражировании клеток 12 гибридом-продуцентов получали препаративные количества моноклональных антител к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei*, на основе которых приготовили иммунопероксидазные конъюгаты. Эпитопную направленность моноклональных антител изучали методом иммуноблоттинга.

В составе антигенных комплексов водно-солевых и формамидных экстрактов *B. pseudomallei* методом вертикального электрофореза установлено наличие нескольких обязательных мажорных компонентов. С помощью дифференциального окрашивания доказана гликопротеиновая природа отдельных компонентов исследованных антигенов. В иммуноблоттинге с применением названных антигенных препаратов определена эпитопная направленность ряда моноклональных антител к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза, показаны отличия в картине их специфического взаимодействия с биополимерами, входящими в антигенный спектр, характерные как для гибридом-продуцентов, принадлежащих к разным коллекциям, так и для отдельных штаммов *B. pseudomallei*.

**Ключевые слова:** мелиоидоз, *Burkholderia pseudomallei*, антигены, моноклональные антитела, эпитопная направленность, иммуноблоттинг.

I.I.Korsakova<sup>1,2</sup>, N.P.Khrapova<sup>1,2</sup>, T.V.Zamarina<sup>1</sup>, E.V.Pimenova<sup>1</sup>, N.S.Makarov<sup>2</sup>, Yu.A.Goloseev<sup>1</sup>

## Utilization of Immunoblotting in Studies of Epitope Targeting in Monoclonal Antibodies to Melioidosis Agent Antigen 200 KDA

<sup>1</sup>Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation; <sup>2</sup>Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Objective of the research was to use immunoblotting for studies of epitope targeting in monoclonal antibodies to 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* antigen, which are synthesized by hybridomas-producers from the two collections in the laboratory of immunodiagnosics and biotechnology at the premises of Volgograd Research Anti-Plague Institute. Employed were 8 typical strains of melioidosis agent with the complete antigenic structure. Antigen preparations were separated by means of denaturing vertical electrophoresis in 12 % polyacrylamide gel with 0.1 % sodium dodecylsulfate. During the process of cell-replication, 12 hybridomas-producers were given preparative amounts of monoclonal antibodies to 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* glycoprotein. Following that, immunoperoxidase conjugates were manufactured. Epitope targeting of monoclonal antibodies was evaluated using immunoblotting. With the help of vertical electrophoresis identified was the presence of several mandatory major components contained in the antigen complexes of the salt-water and formamid *B. pseudomallei* extracts. Differential staining substantiated glycoprotein origin of certain antigen components. Immunoblotting with the stated above antigen preparations revealed epitope targeting of a number of monoclonal antibodies to 200 kDa antigen of melioidosis agent; demonstrated were the differences in their specific interaction with biopolymers which form part of the antigen specter. Those differences were characteristic of hybridomas-producers belonging to different collections, as well as of particular strains of *B. pseudomallei*.

**Key words:** melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, antigens, monoclonal antibodies, epitope targeting, immunoblotting.

Эпитоп является очень небольшим участком на поверхности антигенного комплекса, вступающим во взаимодействие с комплементарным ему активным центром моноклональных антител (МКА) и встречающимся в составе антигена с различной частотой [5, 6]. После электрофореза в денатурирующих условиях эти участки можно выявить в составе отдельных антигенных фракций методом иммуноблоттинга.

МКА нашли широкое применение для дифференциации и идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза, изучения свойств и локализации антиге-

нов, входящих в состав микробных клеток, установления внутривидовых различий между отдельными штаммами [1, 4, 7]. Чтобы определить целевое назначение каждого типа МКА, необходимо подробно охарактеризовать их свойства, в том числе эпитопную направленность, отражающую индивидуальные свойства каждого моноклонального иммуноглобулина. Ее изучение важно для последующего создания диагностических тестов на основе МКА, а также для выбора методов очистки антигенов.

Целью работы являлось изучение с помощью

иммуноблоттинга эпитопной направленности МКА к антигену 200 kDa *Burkholderia pseudomallei*, синтезируемых гибридами-продуцентами из двух полученных в лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» коллекций.

### Материалы и методы

В работе использовали 8 типичных штаммов возбудителя мелиоидоза с полноценной антигенной структурой из коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт».

Методики культивирования микроорганизмов, накопления и обеззараживания микробных взвесей, получения водно-солевых (ВСЭ) и формамидных (ФЭ) экстрактов описаны ранее [3]. Клетки 12 гибридом-продуцентов МКА к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei* 100 тиражировали для получения препаративных количеств МКА. Из мышинной асцитической жидкости выделяли моноклональные иммуноглобулины, на их основе готовили иммунопероксидазные конъюгаты (ИПК) по методу [2].

Антигенные препараты разделяли вертикальным электрофорезом в денатурирующих условиях в 12 % полиакриламидном геле с 0,1 % додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) на приборе «Mini-PROTEAN 3» («Bio-Rad Laboratories, inc.», США) [8]. В качестве стандартов молекулярных масс (м.м.) использовали набор маркерных белков 14,4–97 kDa (ООО «Хеликон», Москва). Последующий перенос исследуемых образцов на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм проводили в ячейке прибора «Mini-Trans-Blot» («Bio-Rad Laboratories, inc.», США) в жидкой среде в течение ночи при 4 °С, 90 мА и 30 В [8] в модификации, которая заключалась в использовании в качестве блокирующего реагента 0,03 % раствора твин-20. Детекцию антигенных препаратов проводили с использованием полученных моноклональных ИПК после проверки их на специфичность. Рабочее разведение ИПК составило 1:20. Обработку мембраны иммуноферментным конъюгатом и последующую визуализацию антигенных фракций осуществляли по общепринятой методике с использованием хромогена диаминобензидина (ДАВ), активированного 0,1 мл 3,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [8]. Электрофореграммы и блоттограммы сканировали на приборе «Epson expression™ 10000 XL» («Epson», Япония). Полученные изображения анализировали с помощью компьютерной программы «TotalLab TL120»® («TotalLab Ltd.») с установлением м.м. биополимерных фракций и их математическим выравниванием.

### Результаты и обсуждение

При комбинированной окраске электрофореграмм кумасси синим R-250 и нитратом серебра в диапазоне м.м. 203–17,7 kDa в составе ВСЭ *B. pseudomallei* было выявлено от 16 до 35 антиген-

ных фракций, а в ФЭ – 4–13 компонентов. Следует отметить наличие в составе ВСЭ всех исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза мажорных антигенов с м.м. около 203, 177, 70, 34, 30, 26 и 17,7 kDa. Для ФЭ характерными оказались фракции с м.м. 203, 68, 65 и 58 kDa. В результате использования специфического окрашивания полиакриламидного геля на гликопротеиды и полисахариды алциановым синим и реактивом Шиффа с йодной кислотой показано, что значительная часть изучаемых антигенов является гликопротеинами.

Имуноблоттинг с ВСЭ штаммов *B. pseudomallei* и различными сериями ФЭ *B. pseudomallei* 100 позволил установить подробную картину специфического взаимодействия биополимеров различных м.м., входящих в их антигенные спектры, с экспериментальными ИПК, а также получить представление об эпитопной плотности и направленности использованных в работе МКА (таблица).

Следует отметить, что эпитопная направленность МКА, принадлежащих к двум полученным в разное время коллекциям, существенно отличается. Так, ИПК 2H<sub>7</sub> и 2A<sub>6</sub> II из первой коллекции способны связываться с антигеном 203 kDa, входящим в состав как ВСЭ, так и ФЭ. Кроме того, эти МКА взаимодействуют с отдельными антигенными компонентами, имеющими м.м. от 44 до 40 kDa. ИПК 2H<sub>7</sub> в силу своей специфичности обнаруживал две фракции, характерные по результатам электрофореза для всех исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза – 203 и 17,7 kDa.

Остальные МКА относятся ко второй коллекции и имеют во многом сходную, но не идентичную эпитопную направленность. Наибольшее количество эпитопов в составе всех использованных в иммуноблоттинге образцов ВСЭ и серий ФЭ выявлено с помощью ИПК 5C<sub>2</sub>, который суммарно связался с 14 биополимерами с м.м. в диапазоне от 37 до 18,4 kDa. Эпитопный профиль МКА 6B<sub>7</sub>, 6A<sub>11</sub> и 3C<sub>6</sub> практически одинаков: он представлен шестью антигенными фракциями в составе всех исследованных ВСЭ и

Сводные данные по эпитопной направленности МКА к антигенам исследованных ВСЭ и ФЭ штаммов *B. pseudomallei*

Наименование МКА	Выявленные эпитопы на биополимерах с м.м. (kDa) в составе:	
	ВСЭ	ФЭ
5C <sub>2</sub>	37, 36, 35, 34, 30, 26, 24, 21, 18,4	37, 33, 22, 18,6
4A <sub>10</sub>	37, 35, 34, 18,4	33, 22, 18,6
6F <sub>9</sub>	37, 36, 35, 34, 26, 18,4	33, 22, 18,6
6A <sub>11</sub>	37, 36, 35, 34, 26, 21	33, 22, 18,6
6B <sub>7</sub>	37, 36, 35, 34, 26, 21	37, 33, 22, 18,6
6B <sub>7</sub> I	52, 35, 34, 30	-
6B <sub>7</sub> II	52, 35, 34, 30	-
6E <sub>7</sub>	37, 36, 35, 34, 26	33, 22, 18,6
7A <sub>8</sub>	37, 35, 34, 18,4	33, 22, 18,6
2H <sub>7</sub>	203, 44, 41, 40, 34, 17,7	203, 17,7
2A <sub>6</sub> II	203, 40	203

тремя – у ФЭ, за исключением входящего в состав 22 серии ФЭ *B. pseudomallei* 100 дополнительного компонента с м.м. 37 kDa для МКА 6В<sub>7</sub> и антигена 18,4 kDa, обнаруженного в ВСЭ штамма *B. pseudomallei* 100 с помощью МКА 3С<sub>6</sub> (рисунок).

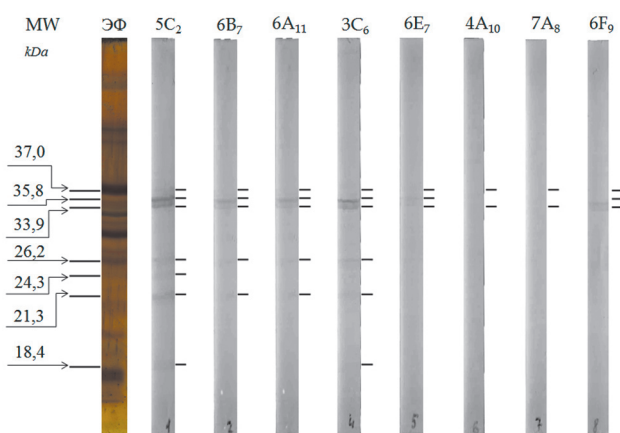
Исследованный ИПК 6Е<sub>7</sub> не взаимодействовал с низкомолекулярными антигенами ВСЭ *B. pseudomallei* 100, которые располагаются в области м.м. 21–18,4 kDa. В остальном этот образец МКА повторяет картину эпитопного взаимодействия ИПК 6В<sub>7</sub>, 6А<sub>11</sub> и 3С<sub>6</sub> с биополимерами изученных образцов ВСЭ и ФЭ.

ИПК 4А<sub>10</sub> и 7А<sub>8</sub> связывались лишь с 4 антигенами в составе ВСЭ штаммов *B. pseudomallei*, а результаты их реакции с эпитопами ФЭ аналогичны большинству МКА из второй коллекции. Специфичность ИПК 6F<sub>9</sub> оказалась такой же, как и у 3С<sub>6</sub>, только он не реагировал с антигеном 21 kDa в составе ВСЭ.

Ни одно из изученных МКА не вступило в связь с антигенами 5-й серии ФЭ *B. pseudomallei* 100, что связано, по всей видимости, с ранее выявленным низким содержанием гликопротеинов в его составе.

В целом, картина эпитопного профиля для каждого из исследованных ИПК варьировала в зависимости от штамма *B. pseudomallei*, из которого получали антигенные препараты. Однако у большинства штаммов были обнаружены компоненты с м.м. 35, 34 и 17–18 kDa.

Таким образом, в составе антигенных комплексов ВСЭ и ФЭ *B. pseudomallei* методом вертикального электрофореза в ПААГ-ДСН установлено наличие нескольких обязательных мажорных компонентов. С помощью дифференциального окрашивания доказана гликопротеиновая природа отдельных компонентов исследованных антигенов. Определение эпитопной направленности ряда МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза позволило осуществлять отбор МКА к пространственно разобобщенным детерминантам, не конкурирующих за центры связывания на молекуле антигена, с целью дальнейшего использования их комбинаций для создания иммунодиагностических препаратов.



Блоттограммы взаимодействия антигенов ВСЭ *B. pseudomallei* 100 с панелью исследованных ИПК:

а – м.м. биополимеров на блоттограмме (kDa); б – суммарный антигенный профиль ВСЭ *B. pseudomallei* 100; 1–8 – блоттограммы соответствующих ИПК

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.А., Илюхин В.И., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Викторов Д.В., Сенина Т.В., Будченко А.А., Ткаченко Г.А., Алексева В.В., Захарова И.Б., Савченко С.С., Зинченко О.В., Сорокина Ю.И., Алексеев В.В. Современные подходы к диагностике сапа и мелиоидоза. Идентификация и типирование *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 112:46–50.
2. Булатова Т.В., Храпова Н.П., Барышева А.Ю. Разработка экспериментальной тест-системы иммуноферментной моноклональной для обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза. *Медицинский академический журн.* 2012; Приложение: 307–9.
3. Корсакова И.И., Храпова Н.П., Напалкова Г.М., Ломова Л.В., Дрефс Н.М., Голосеев Ю.А., Булатова Т.В. Сравнительный анализ иммунохимических методов исследования антигенов патогенных буркхольдери. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 113:82–5.
4. Храпова Н.П., Алексеев В.В., Корсакова И.И., Дрефс Н.М., Ломова Л.В., Булатова Т.В., Напалкова Г.М. Применение сапных и мелиоидозных моноклональных антител различной эпитопной направленности для обнаружения и идентификации патогенных буркхольдери. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 107:66–9.
5. Gaseitsiwe S., Valentini D., Mahdaviifar S., Reilly M., Ehrnst A., Maeurer M. Peptide microarray-based identification of *Mycobacterium tuberculosis* epitope binding to HLA-DRB1\*0101, DRB1\*1501 and DRB1\*0401. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(1):168–75.
6. Linnebacher M., Lorenz P., Koy C., Jahnke A., Born N., Steinbeck F., Wollbold J., Latzkow T., Thiesen H.-J., Glocker M. Clonality characterization of natural epitope-specific antibodies against the tumor-related antigen topoisomerase IIa by peptide chip and proteome analysis: a pilot study with colorectal carcinoma patient samples. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 2012; 403(1):227–38.
7. Ma G.Q., Shao F., Xie X.M., Cui H.F., Wan H.J. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for reliable detection *Burkholderia pseudomallei* in soil samples. *African J. Microbiol. Res.* 2014; 8(5):452–7.
8. Westermeier R. *Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations.* 4th ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag; 2005. 406 p.

References

1. Antonov V.A., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P., Prokhvatilova E.V., Viktorov D.V., Senina T.V., Budchenko A.A., Tkachenko G.A., Alekseeva V.V., Zakharova I.B., Savchenko S.S., Zinchenko O.V., Sorokina Yu.I., Alekseev V.V. [Modern approaches for detection of glanders and melioidosis. Identification and typing of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 112:46–50.
2. Bulatova T.V., Khrapova N.P., Barysheva A.Yu. [Development of experimental immuno-enzyme monoclonal test-system for 200 kDa antigen detection]. *Meditsinskii Akadem. Zh.* 2012; Appendix: 307–9.
3. Korsakova I.I., Khrapova N.P., Napalkova G.M., Lomova L.V., Drefs N.M., Goloseev Yu.A., Bulatova T.V. [Comparative analysis of immunochimical methods applied for studies of pathogenic *Burkholderia* antigens]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 113:82–5.
4. Khrapova N.P., Alekseev V.V., Korsakova I.I., Drefs N.M., Lomova L.V., Bulatova T.V., Napalkova G.M. [Application of glanders and melioidosis monoclonal antibodies of different epitope specificity for pathogenic *Burkholderia* detection and identification]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 107:66–9.
5. Gaseitsiwe S., Valentini D., Mahdaviifar S., Reilly M., Ehrnst A., Maeurer M. Peptide microarray-based identification of *Mycobacterium tuberculosis* epitope binding to HLA-DRB1\*0101, DRB1\*1501 and DRB1\*0401. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(1):168–75.
6. Linnebacher M., Lorenz P., Koy C., Jahnke A., Born N., Steinbeck F., Wollbold J., Latzkow T., Thiesen H.-J., Glocker M. Clonality characterization of natural epitope-specific antibodies against the tumor-related antigen topoisomerase IIa by peptide chip and proteome analysis: a pilot study with colorectal carcinoma patient samples. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 2012; 403(1):227–38.
7. Ma G.Q., Shao F., Xie X.M., Cui H.F., Wan H.J. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for reliable detection *Burkholderia pseudomallei* in soil samples. *African J. Microbiol. Res.* 2014; 8(5):452–7.
8. Westermeier R. *Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations.* 4th ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag; 2005. 406 p.

Authors:

Korsakova I.I., Khrapova N.P., Zamarina T.V., Pimenova E.V., Goloseev Yu.A. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru  
Korsakova I.I., Khrapova N.P., Makarov N.S. Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation.

Об авторах:

Корсакова И.И., Храпова Н.П., Замарина Т.В., Пименова Е.В., Голосеев Ю.А. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru  
Корсакова И.И., Храпова Н.П., Макаров Н.С. Волгоградский государственный медицинский университет. Волгоград, Российская Федерация.

Поступила 15.04.14.