

УДК 619:578:658.512(616-07)

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО VP1 АНТИГЕНА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА

К.Н. Мукантаев, А.В. Шустов, Ы. Сыдыкнәби, Б. Инербай, А. Бегалиева, К.К. Муканов

Национальный центр биотехнологии, ул. Ш. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан

e-mail: lii@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Диагностические исследования играют важную роль в системе профилактических и карантинных мероприятий в борьбе против ящура. Поэтому разработка эффективных методов диагностики болезни до сих пор остается актуальной проблемой. Диагностические характеристики разрабатываемых тест-систем зависят от качества используемых антигенов и антител. Использование рекомбинантных антигенов привело к радикальному улучшению методов диагностики болезней. Целью настоящей работы является очистка и использование рекомбинантного VP1 антигена для диагностики ящура методом иммуноферментного анализа.

Для очистки рекомбинантных антигенов использовали металлоаффинную хроматографию на колонке HisTrap™ FF crude (GE Healthcare, Швеция). Определение диагностических свойств антигенов проводили методом иммуноферментного анализа с использованием 186 проб сывороток, взятых у вакцинированных и 64 проб от не вакцинированных животных.

Определены диагностические характеристики рекомбинантных VP1 O и VP1 Азия-1 антигенов в иммуноферментном анализе. Полученные данные показали высокую эффективность использованного метода очистки и пригодность полученных антигенов для серологической диагностики ящура в непрямом варианте иммуноферментного анализа.

Ключевые слова: вирусы, ящур, структурные антигены, рекомбинантный белок, иммуноферментный анализ.

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY BASED ON THE RECOMBINANT VP1 ANTIGEN FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF FMD

K.N. Mukantayev, A.B. Shustov, I. Sydyknabi, B. Inerbay, A. Bigalyeva, K.K. Mukanov

National Center for Biotechnology, Valikhanov str., 13/1, Astana, 010000, Kazakhstan

e-mail: lii@biocenter.kz

ABSTRACT

Diagnostic tests play an important role in prophylactic and quarantine events against FMD. Therefore, nowadays development of effective methods in diagnostics of diseases is considered as a main problem. Properties of the diagnostic test-systems depend on quality of the used antibodies and antigens. Use of recombinant antigens can improve the diagnostics methods of diseases. The purpose of this study is purification and use of recombinant VP1 antigen for diagnosis of FMD by Enzyme-linked immunosorbent assay.

For purification of recombinant antigens there was used metal-affinity chromatography with the column HisTrap™ FF crude (GE Healthcare, Sweden). For the definition of diagnostic properties of antigens by ELISA there were used 186 serum samples of vaccinated animals and 64 serum samples of unvaccinated animals.

There have been determined diagnostic properties of VP1 O and VP1 Asia-1 recombinant antigens by means of ELISA. The data obtained showed high effectiveness of the used purification method and suitability of the purified antigens for serological diagnosis of FMD by means of indirect ELISA.

Keywords: virus, food-and-mouth diseases, structural antigens, recombinant protein, enzyme-linked immunosorbent assay.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – высококонтагиозная вирусная болезнь сельскохозяйственных животных. Возбудителем ящура является РНК-содержащий вирус, относящийся к роду риновирусов семейства *Picornaviridae*. Возникновение и распространение болезни наносит огромный экономический ущерб. Примером экономического ущерба является эпизоотия, возникшая в 2001 г. в Великобритании, где было уничтожено 4 078 000 голов животных. Учитывая способность вируса ящура к широкому распространению, болезнь является важным ограничительным фактором при международной торговле животными и продуктами животного происхождения.

В связи с широким распространением инфекции принимаются различные мероприятия по минимизации риска возникновения и распространения болезни при международной торговле животноводческой продукцией. основополагающими методами контроля над возникновением болезни являются диагностика инфекции и профилактика в виде вакцинации животных. Вакцинация проводится после быстрой оценки иммунологического статуса животного, серотипа возбудителя и пригодности применяемых вакцин. Поэтому любая задержка в ходе лабораторных исследований может повлиять на эффективность профилактических мероприятий [1]. С целью сокращения сроков проведения серологических исследований разработаны быстрые и надежные методы скрининга сывороток от восприимчивых к ящуру животных. Наиболее широко распространенными лабораторными методами диагностики ящура являются реакция связывания комплемента (РСК), реакция торможения гемагглютинации РТГА, реакция вирус нейтрализации (РН), иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) [2, 3, 4].

РН и РСК являются общепринятыми реакциями для выявления антител против вируса ящура. Тем не менее, эти реакции меньше всего подходят для рутинной диагностики в связи с их трудоемкостью и нестабильностью результатов. Для дифференциальной диагностики были разработаны ИФА тест-системы, предназначенные для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура. Разработанные тест-системы, из-за особенностей неструктурных белков, не могли эффективно скринировать ранее инфицированных животных. Таким образом, разработка более эффективных методов диагностики до сих пор остается актуальной проблемой [4].

Для широкого внедрения иммуноферментных методов в диагностическую практику и продолжающегося роста интереса к ним существует ряд причин. Во-первых, простота,

дешевизна и более высокая чувствительность по сравнению с используемыми традиционными методами [5].

Специфичность и чувствительность диагностических тест-систем напрямую зависит от качества используемых основных компонентов, антитела и антигена. По мнению ряда исследователей, использование рекомбинантного VP1 белка в иммуноферментном анализе дает возможность дифференцировать вирусы ящура по наличию специфических антител. Данное мнение основывалась на применении рекомбинантных антигенов в иммуноферментном анализе при определении антител против вирусов классической чумы и респираторного синдрома свиней [6, 7]. При этом использовались рекомбинантные антигены экспрессированные как в *E. coli*, так и в системе бакуловируса.

Рекомбинантные технологии позволили значительно повысить эффективность получения диагностических антигенов. Рекомбинантные антигены широко используются как в создании профилактических препаратов, так и в создании диагностических тест-систем. Однако физико-химические свойства VP1 антигена в гетерогенных системах приводят к образованию нерастворимых агрегатов. Для решения данной проблемы были использованы специальные векторные системы, в состав которых включен ген тиоредоксина. Одно из важных свойств тиоредоксина – способность предотвращать образование нерастворимых белковых агрегатов при экспрессии гетерологичных генов в кишечной палочке.

По мнению ряда авторов, иммунохимические реакции на основе рекомбинантных антигенов могут демонстрировать ложноположительные реакции, из-за возможного присутствия в его составе тиоредоксина кишечной палочки [8]. Хотя представленные этими авторами данные не объясняют наличие неспецифической реакции именно присутствием тиоредоксина.

В данной работе рассматривается возможность использования рекомбинантного VP1 антигена вируса ящура серотипов О и Азия-1 в иммуноферментном анализе для обнаружения антител. Для этих целей использовался антиген в виде слитого белка тиоредоксин+VP1+гексагистиридиновая метка, экспрессированный в *E. coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались штаммы микроорганизмов *Escherichia coli* BL21/pET32/VP1Азия и BL21/pET32/VP1О, продуцирующие рекомбинантный VP1 антиген вируса ящура.

Очистка рекомбинантного VP1 антигена вируса ящура

Компетентные клетки *E. coli* культивировали в 1000 мл среды LB при 37°C, в течение 18-24 часов до OD₆₀₀=0,8. Затем для индуцирования экспрессии гена добавляли изопропил-β-D-тиогалактопиранозид в концентраций 200 мМ. После добавления индуктора клетки культивировали при комнатной температуре на качалке с амплитудой 120-150 об/мин, в течение 4 часов.

Клетки *E. coli*, содержащие наработанный химерный рекомбинантный белок, осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 минут, осадок промывали 1/3 объема физраствора, центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали в TNE буфере (20 мМ Трис; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; pH 7,5) из расчета 10 мл на 2 г осадка. Клетки разрушали ультразвуком (20 кГц, 15 пульсов по 1 минуте), для предотвращения нагрева пробы процедуру разрушения проводили на льду. Нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 минут при 4°C. Нерастворимую фракцию (осадок) ресуспендировали в 10 мл буфера для солюбилизации телец включений (100 мМ Трис; 10 мМ бета-меркаптоэтанол; 5М мочевины) и обрабатывали ультразвуком (20 кГц, 3 пульса по 1 минуте), обработку проводили на льду. Пробирку с полученным материалом инкубировали в течение 1 часа на льду при постоянном перемешивании.

После инкубирования обработанный ультразвуком материал центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 минут при 4°C. Для работы отбирали надосадочную жидкость. Для снижения значения pH надосадочную жидкость смешивали с буфером А для металл-аффинной хроматографии (50 мМ HEPES; 300 мМ NaCl; 5 мМ меркаптоэтанол; 20 мМ имидазол; 5М мочевины; pH 7,5). Полученный таким образом осветленный лизат фильтровали через нейлоновый фильтр (диаметр пор 0,22 мкм) и подвергали металл-аффинной хроматографии. Рекомбинантный белок очищали на колонке HisTrapTM FF crude (*GE Healthcare*, Швеция). Для этого колонку промывали 5 мл воды качества MQ и 3 мл буфера А. После промывки через колонку пропускали полученный после фильтрации материал объемом 5 мл. Для удаления белков, не связанных с никелем, колонку дважды промывали буфером А в объеме 3 мл. Элюцию проводили буфером В (50 мМ HEPES; 300 мМ NaCl; 5 мМ меркаптоэтанол; 500 мМ имидазол; 5М мочевины; pH 7,5). Очищенный белок анализировали денатурирующим электрофорезом в 15% ПААГ.

Электрофорез осуществляли по методу *Laemmli V.K.*, на аппарате для вертикального электрофореза (BioRad, США) с использованием трис-глицинового буфера [9]. Определение концентрации очищенного рекомбинантного антигена – по методу Брэдфорда [10].

Иммуноферментный анализ

Иммунологический планшет иммобилизовали разведением антигена в концентрации 10 мкг/мл. Антиген разводили в бикарбонатном буфере pH 9,5 и инкубировали при +4°C в течение 12 часов. После инкубирования планшет отмывали 4 раза раствором фосфатно-солевого буфера с твин-20, pH 7,2. Забивку свободной поверхности лунки планшета проводили 10% раствором обезжиренного молока в фосфатно-солевом буфере + твин-20, pH 7,2. Планшет с блокирующим раствором инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Повторяли процедуру отмывки.

Предварительно готовили разведения контрольных сывороток (K⁺, K⁻). Для этого в две чистые пробирки вносили по 1 мл фосфатно-солевого буфера pH-7,2, затем в первую пробирку вносили 0,05 мл контрольной (K⁺) сыворотки, во вторую пробирку вносили 0,05 мл контрольной (K⁻) сыворотки, при этом получали разведение 1:20. Аналогично готовили разведения испытуемых сывороток. Все разведения сывороток готовились в фосфатно-солевом буфере с твином-20, pH-7,2. Подготовленные разведения сывороток вносили в лунки иммунологического планшета в объеме 0,1 мл. Контрольные сыворотки вносили в следующие лунки: K⁺ в A12, B12 и C12, K⁻ в D12, E12 и F12. Лунки E12 и H12 оставили без сывороток, контроль конъюгата. Планшет инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°C и повторяли процедуру отмывки.

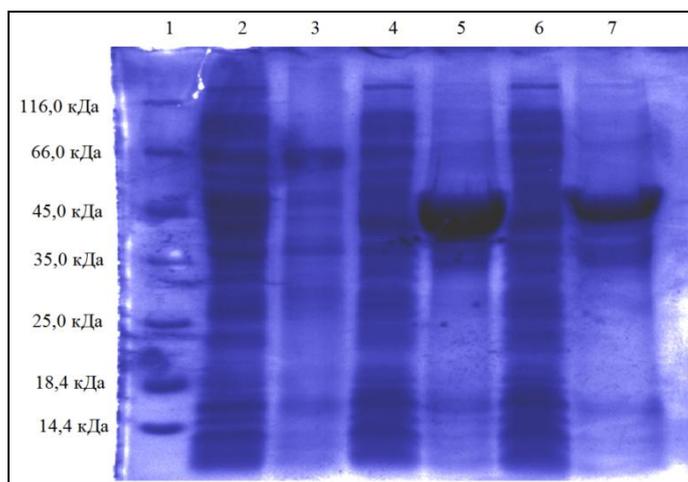
Во все лунки планшета, кроме лунки H12 (*blank*), вносили рабочее разведение антивидового конъюгата в объеме 0,1 мл и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Рабочее разведение конъюгата готовили добавлением к 10 мл раствора фосфатно-солевого буфера + твин-20, pH 7,2, 1 мкл конъюгата *Anti-Bovine IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in rabbit* (Sigma, США). Планшет отмывали 3 раза фосфатно-солевым буфером + твин-20, pH 7,2 и 3 раза дистиллированной водой. После отмывки во все лунки планшета вносили по 0,1 мл раствор тетраметилбензидина (ТМБ). Планшет инкубировали в темном месте при комнатной температуре (22±2°C) в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку планшета по 0,1 мл 2М серной кислоты и проводили учет результатов ИФА.

Результаты реакции учитывали на спектрофотометре при длине волны 492 нм. Учет реакции вели, если в лунках с положительным контролем наблюдалось интенсивное окрашивание темно-коричневого цвета в 2 и более раза превышающее оптическую плотность в лунках с отрицательным контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы являлось культивирование штаммов продуцентов и индукция синтеза рекомбинантных антигенов. В результате проведенных исследований получены препараты, содержащие рекомбинантные антигены VP1 вируса ящура типа О и VP1 вируса ящура типа Азия-1 (рисунок 1). Из рисунка 1 видно, что использованные параметры индукции, 200 мМ IPTG и культивирование при комнатной температуре в течение 4 часов, позволяет получить достаточно высокие концентрации рекомбинантных антигенов. Молекулярная масса индуцированных белков составила 45 кДа. Результаты по получению штаммов продуцентов BL21/pET32/VP1Азия-1 и BL21/pET32/VP1O, продуцирующие рекомбинантный VP1 антиген вируса ящура, опубликованы ранее.

Аналогичные результаты получил *Wenger M.* (2000), описавший экспрессионный вектор, предназначенный для прокариотических систем. Индуцируемый белок представлял собой слитый белок, состоящий из бактериального тиоредоксина, вирусного пептида VP1 и полигистидиновой метки. Анализ с помощью денатурирующего ПААГ электрофореза показал, что полученный белок всех серотипов имел молекулярную массу около 40 кДа [11].



1 – молекулярный маркер; 2 – 2С3АВ супернатант; 3 – 2С3АВ осадок; 4 – VPO супернатант; 5 – VPO осадок; 6 – VPAsia супернатант; 7 – VPAsia осадок

Рис. 1. Электрофорез рекомбинантных VP1 белков вируса ящура после индукции

1 – molecular marker; 2 – 2C3AB supernatant; 3 – 2C3AB pellet; 4 – VPO supernatant; 5 – VPO pellet; 6 – VPAsia supernatant; 7 – VPAsia pellet

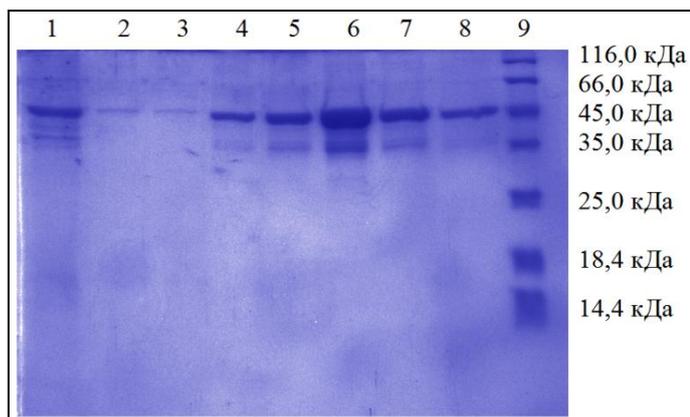
Fig. 1. Electrophoresis of recombinant VP1 proteins of FMDV after induction

Для очистки рекомбинантного VP1 антигена вируса ящура типа О и Азия-1 использовали металлохелатную хроматографию на колонке с Ni-сефарозой (рисунки 2 и 3). Принцип метода основан на образовании комплексов между сорбентом с ионом никеля и специфическим линкером, с остатками гистидина, сшитый с целевым белком. При

понижении рН комплекс разрушается, в результате чего рекомбинантный белок элюируется из колонки.

Наиболее важной областью применения метода является очистка рекомбинантных белков вследствие высокого сродства и специфичности никеля к эпитопу, содержащему шесть остатков гистидина. Даже один шаг очистки в большинстве случаев приводит к той степени чистоты препарата, которая достаточна для решения наиболее распространенных задач в биохимии. Положение, последовательность и длина гистидиновой метки может влиять на процесс производства белка на нескольких стадиях: скорость экспрессии, доступность для привязки к металл-аффинному сорбенту, образование трехмерной белковой структуры, формирование белковых кристаллов и в меньшей степени на растворимость и активность. Наиболее распространенная форма метки состоит из шести последовательных остатков гистидина (Н6), которые связываются с металлами достаточно прочно. Такой тип связи смещает равновесие ассоциации/диссоциации больше в сторону ассоциации, ведущей к стабильному связыванию в большинстве случаев [12]. Данная реакция может протекать в высоко молярных растворах мочевины и гуанидингидрохлорида, позволяющих очищать практически нерастворимые в воде белковые тельца включения [13].

Из рисунка 2 и 3 видно, что отработанные параметры очистки позволяют получать достаточно чистые препараты рекомбинантных антигенов. Для очистки рекомбинантного белка в колонку с никель-сефарозой объемом 1 мл вносили 5 мл осветленного лизата клеток, содержащие рекомбинантные антигены. Осветленный лизат после нанесения на колонку собирали для электрофоретического анализа (рисунки 2 и 3, дорожка 1). Разница концентрации белка между лизатом клеток и прошедшей через колонку жидкостью демонстрирует высокую эффективность связывания меченого белка с никель-сефарозой. Дорожки 2 и 3 демонстрирует степень удаления из колонки несвязанного рекомбинантного белка при обработке колонки буфером с содержанием 20 мМ имидазола. Дорожка 4 и 5 демонстрирует результат элюции белка буфером, содержащим 50 мМ имидазола. Дорожка 6, 7 и 8 – результат элюции белка буфером, содержащим 500 мМ имидазола. Для поддержания рекомбинантного антигена в растворимой форме все буферы содержали 8 М мочевины.

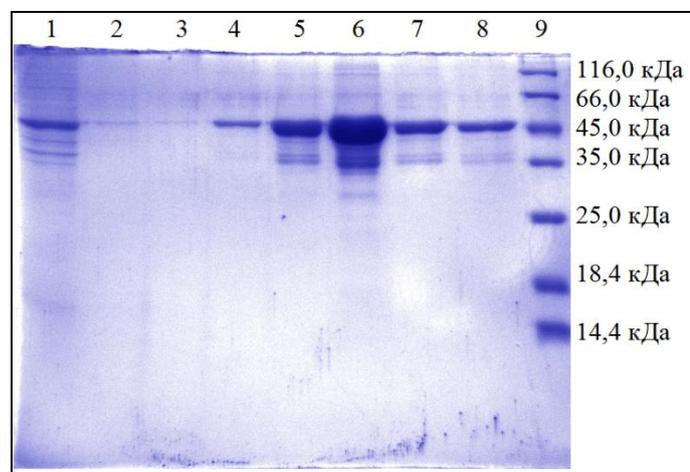


1 – материал, не связавшийся с колонкой; 2, 3 – промывка колонки; 4, 5 – буфер А с 50 мМ имидазолом; 6 – фракция 1; 7 – фракция 2; 8 – фракция 3; 9 – ММ.

Рис. 2. Электрофорез очистки рекомбинантного VP1 белка вируса ящура типа О

1 – flow throw; 2, 3 – wash; 4, 5 – buffer A with 50 mM imidazole; 6 – fraction 1; 7 – fraction 2; 8 – fraction 3; 9 – molecular marker.

Fig. 2. Electrophoresis of cleaning recombinant VP1 protein of FMDV type O



1 – материал, не связавшийся с колонкой; 2, 3 – промывка колонки; 4, 5 – буфер А с 50 мМ имидазолом;
6 – фракция 1; 7 – фракция 2; 8 – фракция 3; 9 – ММ.

Рис. 3. Электрофорез очистки рекомбинантного VP1 белка вируса ящура типа Азия-1

1 – flow throw; 2, 3 – wash; 4, 5 – buffer A with 50 mM imidazole; 6 – fraction 1; 7 – fraction 2; 8 – fraction 3; 9 – molecular marker.

Fig. 3. Electrophoresis of cleaning recombinant VP1 protein of FMDV type Asia-1

Анализ полученных результатов показал достаточно высокую эффективность подобранной стратегии очистки рекомбинантного антигена. Полученные результаты согласуются с литературными данными. *Chien-Der Lee* с соавторами (2009) с помощью Ni^{+2} – смолы проводили очистку смешанных белков *His6-Smt3-VP0*, *His6-Smt3-VP1* and *His6-Smt3-VP3* [14]. С помощью металлохелатной хроматографии очищались рекомбинантные белки других вирусов. *Иванов К.И.* с соавторами (1994), используя

никель-хелатную хроматографию, получили удовлетворительную чистоту препарата рекомбинантного транспортного белка вируса табачной мозаики. По данным авторов белки кишечной палочки вымывались из колонки при высоких значениях рН, а рекомбинантный белок элюировался в значительно более кислой среде [13].

Для очистки рекомбинантных белков также широко применяется система глутатион-S-трансфераза [4, 15]. *Houhui Song* с соавторами (2004) провели очистку рекомбинантного VP1 антигена вируса ящура сшитого с N-терминальной части глутатион-S-трансферазой. Для очистки рекомбинантного антигена авторы использовали хроматографию с глутатион-сефарозой 4В. Авторами получен очищенный препарат рекомбинантного VP1 антигена вируса ящура, пригодный для использования в иммуноферментном анализе [4]. Однако, сравнивая литературные данные и полученные результаты, можно сделать вывод о более высокой эффективности очистки рекомбинантных белков при использовании металлохелатной хроматографии.

С целью определения эффективности использования смешанных рекомбинантных антигенов тиоредоксин+VP1+гистидиновая метка в иммунохимических реакциях первоначально антигены апробировались в иммуноферментном анализе. Для этого 96 луночные иммунологические планшеты иммобилизовались исследуемыми рекомбинантными антигенами. Далее, на иммобилизованные антигены вносили сыворотки вакцинированных или не вакцинированных животных. При наличии в сыворотке антител, специфичных к рекомбинантным антигенам, образуется комплекс антиген-антитело, который выявляется антивидовым конъюгатом.

Чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа на основе полученных нами рекомбинантных VP1 антигенов определялась исследованием 186 проб сывороток от вакцинированных животных и 64 проб сывороток от не вакцинированных животных. Результаты исследования представлены в таблице 1. Полученные результаты демонстрируют высокую чувствительность иммуноферментного анализа в пределах 97% при использовании VP1 О антигена и 99% при использовании VP1 Азия-1 антигена. Специфичность реакции при использовании полученных рекомбинантных антигенов составила 90% для антигена VP1 О и 89% для антигена VP1 Азия.

Таблица 1. Чувствительность иммуноферментного анализа на основе рекомбинантного VP1 антигена вируса ящура серотипа О и Азия-1 при исследовании сыворотки от вакцинированных животных

Table 1. Sensitivity of ELISA on basic recombinant VP1 antigen of FMD virus serotype O and Asia at test of serum from vaccinated animals

Наименование проб	Количество исследованных проб	Положительный результат	Отрицательный результат	Процентное содержание
Сыворотка от вакцинированных животных (VP1 О)	186	181	5	Чувствительность 97%
Сыворотка от не вакцинированных животных (VP1 О)	64	6	58	Специфичность 90%
Сыворотка от вакцинированных животных (VP1 Азия-1)	186	185	1	Чувствительность 99%
Сыворотка от не вакцинированных животных (VP1 Азия-1)	64	7	57	Специфичность 89%

Для подтверждения гипотезы, что высокая чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа связана с использованием рекомбинантных антигенов, использовался один из способов статистического анализа – критерий Стьюдента. С этой целью определялись средние значения показателей оптической плотности, индексов оптических показателей относительно уровня среза иммуноферментного анализа и индексов оптических показателей относительно положительного контроля (таблица 2). Результаты статистической обработки доказывают достоверность полученных результатов с уровнем значимости 1-0,1% при исследовании сыворотки вакцинированных животных и уровнем значимости 5% при исследовании сыворотки от не вакцинированных животных (данные не приведены). Сравнительный анализ показателей оптической плотности двух групп (вакцинированные и не вакцинированные животные) выявил, что различие оптических показателей анализа между данными группами животных носит закономерный характер ($P > 0,001$).

Таблица 2. Статистический анализ оптических показателей иммуноферментного анализа с сыворотками от вакцинированных животных

Table 2. Statistical analysis of optical indicators ELISA with sera from vaccinated animals

n=3

Значение	Показатель оптической плотности, ОП		Индекс ОП относительно уровня среза (ОП/0,100)		Индекс ОП относительно показателей положительного контроля (ОП/ОП К+)	
	VP1 O	VP1 Азия-1	VP1 O	VP1 Азия-1	VP1 O	VP1 Азия-1
Среднее значение T1-T93	0,100±0,03 (P>0,01)	0,130±0,03 (P>0,001)	1,03±0,34 (P>0,01)	1,34±0,27 (P>0,001)	0,59±0,19 (P>0,01)	0,880±0,18 (P>0,001)
Среднее значение T94-T186	0,170±0,03 (P>0,001)	0,210±0,04 (P>0,001)	1,73±0,29 (P>0,001)	2,06±0,39 (P>0,001)	0,97±0,16 (P>0,001)	1,37±0,26 (P>0,001)

Wenger M. с соавторами (2000) в непрямом иммуноферментном анализе использовали *Ter-VP1O-His-tag* антиген. Анализ сывороток от экспериментально зараженных ящуром животных показал, что полученный антиген специфически реагирует только с сывороткой от животных, инфицированных вирусом серотипа O1. Перекрестных реакций с контрольным антигеном *Ter-V5-His-tag* не наблюдалось, демонстрируя, что полученные гибридные белки, в частности *Ter-VP1O-His-tag*, могут использоваться в качестве антигена для иммуноферментного анализа при серологической диагностике ящура [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определены диагностические характеристики рекомбинантных антигенов VP1 O и VP1 Азия-1, слитых с тиоредоксином и гексагептидиновой меткой в иммуноферментном анализе. В результате проведенных исследований установлена высокая эффективность использованного нами метода очистки рекомбинантных антигенов. Полученные рекомбинантные антигены пригодны для использования в непрямом варианте иммуноферментного анализа при серологической диагностике ящура.

Финансирование

Исследования проводились при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках подпрограммы 101 «Грантовое финансирование научных исследований». Приоритет «Науки о жизни».

ЛИТЕРАТУРА

1. Kitching R.P. *Foot-and-mouth disease: current world situation // Vaccine.* – 1999. – Vol.17. – P. 1772-1774.
2. Ferris N.P., Dawson M. *Routine application of enzymelinked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases // Veterinary Microbiology.* – 1988. – Vol. 16. – P. 201-209.
3. Reid S.M., Grierson S.S., Ferris N.P. *Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus // Journal of Virology Methods.* – 2003. – Vol. 107. – P. 129-139.
4. Houhui Song, Weihuan Fang, Zhiliang Wang, Dongxia Zheng, Jian Du, Hong Li, Yong Li, Bingsheng Qiu. *Detection of foot-and-mouth virus antibodies using a purified protein from the high-level expression of codon-optimized, foot-and-mouth disease virus complex epitopes in Escherichia coli // Biotechnology Letters.* – 2004. – Vol. 26. – P. 1277-1281.
5. Hamblin C., Barnett I.T.R., Hedger R.S. *A new enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus // Journal of Immunology Methods.* – 1986. – Vol. 93. – P. 115-121.
6. Denac H., Moser C., Tratschin J.-D., Hofmann M.A. *An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen // Journal of Virology Methods.* – 1997. – Vol. 65. – P. 169-181.
7. Moser C., Ruggli N., Tratschin J.D., Hofmann M.A. *Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2 // Veterinary Microbiology.* – 1996. – Vol. 51. – P. 41-53.
8. De Boer G.F., Boerrigter H.M., Groen J., Osterhaus A.D. *Identification of bovine leukemia virus (BLV) infected cattle by complex-trapping-blocking (CTB) ELISA employing monoclonal antibodies directed against BLV-p24 // Zenbl. Veterinary Medicine.* – 1987. – №34. – P. 717-728.
9. Laemmli U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
10. Bradford M.M. *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
11. Wenger M., Tratschin J.D., Hofmann M.A. *Indirect ELISA using recombinant VP1 capsid protein for the serodifferentiation of foot-and-mouth disease virus infected animals // In:*

Report; European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Research Group of the Standing Technical Committee, Borovets (Bulgaria), 5-8 Sep 2000 / FAO, Rome (Italy). Animal Production and Health Div. – 2000. – P. 222-223.

12. Кельдиева О.А., Гладилович В.Д., Подольская Е.П. Металл-аффинная хроматография. Основы и применение // *Научное приборостроение*. – 2013. – Т. 23. – С.74-85.

13. Иванов К.И., Иванов П.А., Тимофеева Е.К., Ефимов В.А., Дорохов Ю.Л. Клонирование генов транспортных белков двух штаммов вируса табачной мозаики и их экспрессия в клетках *Escherichia coli* // *Биоорганическая химия*. – 1994. – Т. 20. – С. 751-758.

14. Chien-Der Lee, Yao-Pei Yan, Shu-Mei Liang, Ting-Fang Wang. Production of FMDV virus-like particles by a SUMO fusion protein approach in *Escherichia coli* // *Journal of Biomedical Science*. – 2009. – Vol. 16. – P. 69-76.

15. Mercedes Gareia-Valcarcel, Timothy Doel, Trevor Collen, Martin Ryan, R. Michael E. Parkhouse. Recognition of foot-and-mouth disease virus and its capsid protein VP1 by bovine peripheral T lymphocytes // *Journal of General Virology*. – 1996. – Vol. 77. – P. 727-735.

REFERENCES

1. Kitching R.P. Foot-and-mouth disease: current world situation. *Vaccine*, 1999, vol. 17, pp. 1772-1774. doi: 10194838.

2. Ferris N.P., Dawson M. Routine application of enzymelinked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases. *Veterinary Microbiology*, 1988, vol. 16, pp. 201-209. doi: 3376418

3. Reid S. M., Grierson S. S., Ferris N. P. Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology Methods*, 2003, vol. 107, pp. 129-139. doi: 12505626.

4. Houhui Song, Weihuan Fang, Zhiliang Wang, Dongxia Zheng, Jian Du, Hong Li, Yong Li, Bingsheng Qiu. Detection of foot-and-mouth virus antibodies using a purified protein from the high-level expression of codon-optimized, foot-and-mouth disease virus complex epitopes in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 2004, vol. 26, pp. 1277-1281. doi: 15483387.

5. Hamblin C., Barnett I.T.R., Hedger R.S. A new enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. *Journal of Immunology Methods*, 1986, vol. 93, pp. 115-121. doi: 3021854.

6. Denac H., Moser C., Tratschin J.-D., Hofmann M.A. An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen. *Journal of Virology Methods*, 1997, vol. 65, pp. 169-181. doi: 9186940.

7. Moser C., Ruggli N., Tratschin J.D., Hofmann M.A. Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. *Veterinary Microbiology*, 1996, vol. 51, pp. 41-53. doi: 8828121.

8. De Boer G.F., Boerrigter H.M., Groen J., Osterhaus A.D. Identification of bovine leukemia virus (BLV) infected cattle by complex-trapping-blocking (CTB) ELISA employing monoclonal antibodies directed against BLV-p24. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1987, no. 34, pp. 717-728. doi: 2830742.

9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680-685. doi: 5432063.

10. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, pp. 248-254. doi: 942051.

11. Wenger M., Tratschin J.D., Hofmann M.A. Indirect ELISA using recombinant VP1 capsid protein for the serodifferentiation of foot-and-mouth disease virus infected animals. In: *Report; European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Research Group of the Standing Technical Committee, Borovets (Bulgaria), 5-8 Sep 2000. FAO, Rome (Italy). Animal Production and Health Div, 2000, pp. 222-223.*

12. Keltsieva O.A., Gladilovich V.D., Podolskya E.P. Metal-affine chromatography. *Basics and application. Scientific instrumentation*, 2013, vol. 23, pp. 74-85.

13. Ivanov K.I., Ivanov P.A., Timofeev E.K., Efimov V.A., Dorochov J.L. Cloning genes of transport proteins of two strains tobacco mosaic virus and their expression in *Escherichia coli* cells. *Bioorganic chemical*, 1994, vol. 20, pp. 751-758. doi: 7993379.

14. Chien-Der Lee, Yao-Pei Yan, Shu-Mei Liang, Ting-Fang Wang. Production of FMDV virus-like particles by a SUMO fusion protein approach in *Escherichia coli*. *Journal of Biomedical Science*, 2009, vol. 16, pp. 69-76. doi:10.1186/1423-0127-16-69.

15. Mercedes Gareia-Valcarcel, Timothy Doel, Trevor Collen, Martin Ryan, R. Michael E. Parkhouse. Recognition of foot-and-mouth disease virus and its capsid protein VP1 by bovine peripheral T lymphocytes. *Journal of General Virology*, 1996, vol. 77, pp. 727-735. doi: 8627261.

ТҮЙІН

Аусылға қарсы күресте профилактикалық және карантиндік іс-шаралар жүйесінде диагностикалық зерттеулер маңызды рөл атқарады. Сондықтан, ауруларды диагностикалауға арналған тиімді әдістерді әзірлеу бүгінге күнге дейін өзекті мәселе болып қалуда. Әзірленетін тест-жүйелердің диагностикалық сипаттамасы пайдаланылатын антиденелерің және антигендердің сапасына байланысты. Рекомбинантты антигендерді пайдалану ауруларды диагностикалау әдістерін түбегейлі жақсартуға әкелді. Бұл жұмыстың мақсаты иммуноферменттік анализ әдісімен аусылды диагностикалау үшін VP1 рекомбинантты антигенін тазарту және оны пайдалану болып табылады.

Рекомбинантты антигендерді тазарту үшін HisTrap™ FF crude (GE Healthcare, Швеция) колонкадағы металл аффинді хроматография қолданылды. 186 сынама егілген және 64 сынама егілмеген малдардан алынған сарысуларды пайдаланып иммуноферменттік анализ әдісімен антигендердің диагностикалық қасиеттерін анықтау жүргізілді.

Имуноферменттік анализде рекомбинантты VP1O және VP1 Азия-1 антигендерінің диагностикалық сипаттамалары анықталды. Алынған деректер қолданылған тазарту әдісінің жоғары тиімділігін және иммуноферменттік анализдің тікелей емес нұсқасында алынған антигендердің аусылды серологиялық диагностикалау үшін жарамды екендігін көрсетті.

Кілтті сөздер: вирустар, аусыл, құрылымдық антигендер, рекомбинантты ақуыз, иммуноферменттік анализ.