

Необратимо денатурированный вирусный белок для иммунохимической диагностики вирусной инфекции

Научный руководитель – Бутенко Константин Олегович

Голдобина Екатерина Евгеньевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра вирусологии, Москва, Россия

E-mail: kegga@yandex.ru

Известно, что антитела, полученные на выделенные вирусные белки, плохо «узнают» вирус в инфицированных клетках. Это можно объяснить тем, что перенесение клонированного и выделенного белка в физиологический раствор приводит к разнообразию термодинамически выгодных промежуточных конформаций белковой молекулы от денатурированной до полностью нативной. Иммунный ответ на такой препарат белка часто приводит к образованию лишь незначительного числа антител, «узнающих» белок в составе природного вирусного капсида. Данное обстоятельство серьезно затрудняет получение высокоспецифичных антисывороток для иммунохимической диагностики вирусной инфекции.

С целью преодоления этой проблемы предлагается следующий подход. При получении препарата антигена необходимо перевести клонированный выделенный целевой белок в одну форму - необратимо денатурированную. В исследуемом препарате вируса или в заражённой клетке необратимо денатурировать целевой белок в полном соответствии с условиями денатурации исходного антигена. В этом случае антитела, полученные на исходный антиген - необратимо денатурированный клонированный белок, должны узнавать его в вирусах или клетках, денатурированных в тех же условиях.

Объект исследования - вирус желтухи свеклы, являющийся флэмно-ограниченным труднодоступным кластеровирусом. Рекомбинантный мажорный белок оболочки (БО) вируса желтухи свеклы р22 получали клонированием его гена в плазмиде рQE-9 в экспрессионном штамме *E. coli* M15. Белок выделяли колоночной хроматографией на сорбенте Ni-NTA-агароза в растворе мочевины. Методом кругового дихроизма установлено, что необратимая денатурация белка оболочки ВЖС достоверно приводит к потере третичной структуры его молекулы. Методом электрофореза по Лэммли установлено, что изменения по молекулярной массе белка оболочки (БО) и самого вируса при необратимой денатурации аналогичны. Для трехкратной иммунизации лабораторных мышей использовали два препарата БО ВЖС. Первый - рекомбинантный БО ВЖС, выделенный аффинной хроматографией на Ni-NTA сорбенте. Второй препарат был получен полной и необратимой денатурацией первого. С помощью сравнительного непрямого иммуноферментного анализа было установлено, что необратимо денатурированный БО ВЖС даёт наиболее сильный и устойчивый иммунный ответ. Специфические антисыворотки мышей на денатурированный антиген при разведении в 3000 раз обладают высокой чувствительностью (до 1 нг/мл) определения ВЖС, денатурированного по такому же протоколу в соке растения.

Значимость данной работы особенно важна для исследования трудно выделяемых и лабильных вирусов и клеточных комплексов, в состав которых входят белки-антигены.