



УДК 578.823.1

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ VP7 ВИРУСА БЛЮТАНГА

© 2019 г. Н. В. Руденко*, **, #, А. П. Каратовская*, А. О. Шепеляковская*, А. В. Замятина*, **, Ф. А. Бровко*, **, А. Ю. Кольцов***, И. Р. Иматдинов***, А. Р. Иматдинов***, О. М. Стрижакова***, К. А. Мима***, В. М. Лыска***, Д. В. Колбасов***

*Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 142290, Пушкино, проспект Науки, 6,

**Пушинский государственный естественно-научный институт, Россия, 142290, г. Пушкино, проспект Науки, 3

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии”, Россия, 601125, Владимирская обл., пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1

Поступила в редакцию 11.04.2019 г.

После доработки 11.06.2019 г.

Принята к публикации 11.07.2019 г.

Блютанг, или катаральная лихорадка овец, – вирусная трансмиссивная инфекция жвачных, которая является одной из экономически значимых арбовирусных инфекций животных и передается кровососущими насекомыми рода *Culicoides*. Вирусный белок VP7 является группоспецифическим коровым белком вируса, консервативным для всех его известных серотипов, поэтому представляет собой наиболее подходящую мишень для создания диагностических тестов. Для разработки иммунохимического метода обнаружения вирусной инфекции получена панель моноклональных высокоаффинных антител к VP7. В качестве иммуногенов использовали экспрессированный в *E. coli* N-концевой фрагмент VP7 и инактивированные вирусные частицы. Полученные моноклональные антитела применимы для выявления вируса в зараженных клетках. В качестве видоспецифического антигена создан рекомбинантный белок TxA-VP7_{1a}, который содержит пространственные эпитопы, подобные таковым в составе нативного вирусного антигена. С его помощью отобраны перспективные антитела для проведения диагностики заболевания конкурентным иммуноферментным анализом, позволяющим выявлять специфические антитела к вирусу блютанга в сыворотках инфицированных животных. Методом конкурентного твердофазного ИФА показано, что наиболее эффективно взаимодействующие с белком TxA-VP7_{1a} антитела (Vt14, Vt18, Vt26, Vt33, Vt34 и Vt35) узнают близкие или перекрывающиеся эпитопы VP7. Взаимодействие с антигеном практически всех полученных антител ингибировалось референтными специфическими сыворотками против вируса блютанга 24-х серотипов. Моноклональное антитело Vt14 демонстрировало максимальную способность блокировать взаимодействие VP7 со специфическими сыворотками против 24-х серотипов вируса блютанга. Таким образом, полученная панель моноклональных антител к VP7 вируса блютанга может быть использована для обнаружения вирусной инфекции, а также в качестве компонента наборов для серологической диагностики болезни.

Ключевые слова: вирус блютанга (BTV), вирусный белок 7 (VP7), моноклональные антитела, эпитопы

DOI: 10.1134/S013234231906037X

ВВЕДЕНИЕ

Блютанг (катаральная лихорадка овец) – вирусная трансмиссивная инфекция домашних и диких жвачных животных. Ее распространение приводит к большим экономическим потерям. Блютанг включен Всемирной организацией по охране здоровья животных (до 2003 г. МЭБ – Международное эпизоотическое бюро) в пере-

чень болезней, подлежащих регистрации. Возбудитель блютанга – РНК-содержащий вирус BTV, который относится к роду *Orbivirus* семейства *Reoviridae*. Геном вируса представлен двухцепочечной РНК длиной 19×10^3 п.о., состоящей из 10 сегментов. Он кодирует семь структурных белков (VP1–VP7) и четыре неструктурных белка (NS1, NS2, NS3 и NS4) [1–6].

¹ Сокращения: мкАТ – моноклональные антитела; мкАТ-HRP – мкАТ, конъюгированные с пероксидазой; НГХ-ИФА – не-прямой гистохимический иммуноферментный анализ; тИФА – твердофазный иммуноферментный анализ; ТЦД – тканевые цитопатогенные дозы; ПС – культура клеток почек сайги; BTV – вирус блютанга; CV-1 – культура клеток почки африканской зеленой мартышки; FCS – эмбриональная телячья сыворотка; N – взаимодействие мкАТ-HRP с иммобилизованным TxA-VP7_{1a} в отсутствие конкурирующих антител; PBS – фосфатно-солевой буфер; PBST – PBS, содержащий 0.1% Tween 20; S – взаимодействие MA-HRP с иммобилизованным TxA-VP7_{1a} в присутствии конкурирующих антител; VERO – культура клеток почки африканской зеленой мартышки.

Автор для связи: (тел.: +7 (926) 592-11-89; эл. почта: nrudkova@mail.ru).

Важной эпизоотологической особенностью блютанга, значительно усложняющей борьбу с болезнью, является способность вируса формировать природные очаги даже при однократном его заносе на определенную территорию. Это обусловлено вовлеченностью в инфекционный процесс насекомых и большого числа восприимчивых животных, в том числе и диких [7, 8].

Актуальность изучения блютанга для Российской Федерации значительно возросла с 2006 г. – начала импорта племенного крупного рогатого скота из стран Европейского Союза, в том числе из неблагоприятных по блютангу государств – Германии, Голландии и др. [2, 9, 10]. В 2018 г. в 9 европейских странах (Германия, Испания, Греция, Италия, Швейцария, Албания, Франция, Португалия, Кипр) были отмечены вспышки болезни, вызванные семью различными серотипами вируса. Кроме того, в последние десятилетия наблюдается тенденция к расширению ареалов трансмиссивных инфекций, в том числе и блютанга, что делает актуальными вопрос изучения возбудителей данных болезней, а также разработку и совершенствование методов их диагностики.

В настоящее время для обнаружения ВТV у животных используются молекулярно-биологические и иммунохимические методы. Молекулярно-биологические методы выявляют присутствие соответствующей вирусной нуклеиновой кислоты и самого вируса. Иммунохимические методы позволяют обнаружить не только вирус, но и специфические антитела к вирусным белкам в крови, как больного, так и переболевшего животного. Белок VP7 является наиболее часто используемой мишенью для серологических тестов, используемых для диагностики блютанга. VP7 является группоспецифическим антигеном, т.е. проявляет высокую степень перекрестных реакций в серологических исследованиях между различными штаммами ВТV (независимо от серотипа или топотипа). В тоже время, в серологических реакциях с другими видами рода *Orbivirus* ВТV не имеет перекрестных взаимодействий [11, 12]. Антитела против ВТV могут быть обнаружены с помощью конкурентного ИФА с антителами к VP7. Этот быстрый метод позволяет выявлять антитела к вирусу в сыворотке или плазме крови уже на шестой день после инфицирования [13, 14].

Для изучения свойств возбудителей различных заболеваний и разработки методов их количественной детекции иммунохимическими методами широко применяются моноклональные антитела (мкАТ), как высокоспецифичные, направленные к одной антигенной детерминанте, биологически гомогенные, стабильные по специфичности и авидности [15]. Бессимптомное течение блютанга у крупного рогатого скота требует улучшения способов диагностики заболевания. Конкурентный ИФА на основе мкАТ является эффективным инструментом для крупномасштабного скрининга поголовья скота. Целью данной работы явилось получение и характеристика мкАТ к VP7 ВТV, изучение

их способности выявлять вирусные антигены в инфицированных клетках, а также специфические антитела в крови животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение мкАТ и их иммунохимическая характеристика. Поверхностный слой кора вирусной частицы ВТV состоит из 780 копий белка VP7 (260 тримеров VP7), прикрепленного к наружной поверхности субкоревой оболочки и кодируемого 7-ым сегментом. 7-ой сегмент – третий наиболее вариабельный сегмент генома ВТV после 2-го и 6-го [16]. Для получения мкАТ к VP7 ВТV была разработана схема иммунизации, предполагающая развитие иммунного ответа, максимально направленного на поверхностные эпитопы VP7 в составе вириона. На поверхности интактных вирионов и коровых частиц вируса экспонированы эпитопы, расположенные вблизи N-конца белка VP7 [17]. Животных иммунизировали последовательно рекомбинантным белком VP7_a и инактивированным ВТV первого серотипа, экстрагированным фреоном [18]. Белок VP7_a соответствует участку 114–257 а.о. белка VP7 и не содержит в своем составе дополнительных фрагментов, на которые теоретически могут быть получены мкАТ. Препарат вируса, экстрагированный фреоном, представляет собой цельные вирусные частицы, лишённые инфекционности и сохраняющие иммунохимические свойства поверхностных белков. Использование этих антигенов позволило предположить, что основная масса полученных мкАТ будет направлена против поверхностных антигенных детерминант ВТV.

Относительное содержание антител в сыворотке крови иммунизированных животных (титр) составило 1/512000. Титр определяли по взаимодействию сывороточных антител с инактивированным ВТV, иммобилизованным на планшеты для ИФА. Титр сыворотки при взаимодействии с лизатом клеток почек сайги (ПС), которые использовали для культивирования вируса, составлял 1/16000. Поэтому в ходе дальнейшего отбора гибридных клонов, клонирований и культивирования гибридом, секретирующих мкАТ, проводили параллельный скрининг надклеточных супернатантов на предмет неспецифического взаимодействия с лизатом клеток ПС. В дальнейшей работе использовали только клоны, надклеточные супернатанты которых не взаимодействовали с лизатом клеток ПС.

Гибридные клетки получали путем слияния спленоцитов мыши и клеток миеломы с помощью раствора полиэтиленгликоля по методу Köhler и Milstein [19]. В результате получено 27 гибридных клеточных линий, секретирующих мкАТ к VP7. Проведена иммунохимическая характеристика полученных антител. Типы легких и тяжелых цепей, составляющие антитела, и константы аффинности мкАТ, характеризующие эффективность их взаимодействия с инактивирован-

Таблица 1. Иммунохимическая характеристика моноклональных антител (мкАТ) против VP7

№	мкАТ	Тип тяжелой (легкой) цепи	$K_{\text{афф}}, \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	№	мкАТ	Тип тяжелой (легкой) цепи	$K_{\text{афф}}, \times 10^9 \text{ M}^{-1}$
1	Bt3	IgG2a(κ)	1.85	15	Bt22	IgG2a(κ)	4.8
2	Bt4	IgG1(κ)	1.32	16	Bt23	IgG2a(κ)	3.8
3	Bt5	IgG1(κ)	0.7	17	Bt24	IgG2b(κ)	3.4
4	Bt8	IgG2a(κ)	1.1	18	Bt25	IgG1(κ)	6.3
5	Bt9	IgG2a(κ)	5.7	19	Bt26	IgG1(κ)	1.1
6	Bt10	IgG2b(κ)	3.1	20	Bt27	IgG2a(κ)	1.4
7	Bt11	IgG2a(κ)	2.7	21	Bt28	IgG2a(κ)	1.6
8	Bt13	IgG2a(κ)	2.8	22	Bt30	IgG2a(κ)	2.0
9	Bt14	IgG1(κ)	1.1	23	Bt31	IgG1(κ)	3.5
10	Bt15	IgG1(κ)	0.37	24	Bt32	IgG2a(κ)	2.9
11	Bt16	IgG2a(κ)	1.9	25	Bt33	IgG1(κ)	6.3
12	Bt17	IgG2a(κ)	2.1	26	Bt34	IgG2b(κ)	1.75
13	Bt18	IgG2b(κ)	5.3	27	Bt35	IgG2b(κ)	3.7
14	Bt19	IgG1(κ)	1.8				

ным BTV (экстракция фреоном), представлены в табл. 1. Все полученные антитела принадлежат к классу G, имеют в своем составе легкую цепь κ. Значения констант аффинности лежат в диапазоне от 0.7×10^9 до $6.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, что свидетельствует о высоком родстве полученных мкАТ по отношению к поверхностным антигенам цельного BTV.

Взаимодействие мкАТ с антигеном TxA-VP7_a. Для обнаружения антител к BTV в сыворотках инфицированных животных необходимы как высоко специфические антитела, так и антиген с максимально приближенной к нативной конформацией антигенных детерминант. В качестве такого антигена в данной работе был использован рекомбинантный белок TxA-VP7_a, который содержит в своем составе фрагменты тиоредоксина и VP7 (114–257 а.о.). Использование лидерной последовательности тиоредоксина в генетической конструкции, кодирующей антиген TxA-VP7_a, обеспечило высокий уровень экспрессии, хорошую растворимость и способность к формированию максимально приближенной к нативной пространственной структуры фрагмента VP7 [20, 21].

Все полученные мкАТ взаимодействовали с TxA-VP7_a, однако, мкАТ Bt14, Bt15, Bt18, Bt26, Bt33, Bt35 демонстрировали более эффективное связывание с иммобилизованным антигеном TxA-VP7_a в сравнении с другими. Поэтому, эти антитела являются перспективными для применения в конкурентном твердофазном ИФА (тИФА) для выявления антител к BTV в образцах сыворотки крови животных.

Определение вируса блютанга в зараженных клетках с помощью мкАТ. Была изучена способность мкАТ выявлять BTV в инфицированных клеточных линиях. Все полученные мкАТ эффективно окрашивали клетки, зараженные вирусом. В качестве примера на рис. 1 представлены результаты иммуногистохимического окрашивания зараженных BTV клеток VERO антителами Bt33, Bt3 и Bt10, демонстрирующие эффективное выявление вирусных частиц, в сравнении с интактными клетками. Таким образом, практически все

полученные антитела применимы для скрининга зараженных клеток, а в случае анализа животных пригодны для гистохимических исследований опытных образцов.

Характеристика мкАТ иммуноблотингом, полипептидная специфичность. При анализе полученных мкАТ иммуноблотингом наряду с рекомбинантным антигеном TxA-VP7_a использовали универсальный инактивированный антиген BTV [22], так как в этом препарате упаковка вирусных белков не идеальна, белки не строго собраны в вирион, что позволяло получать лучшую картину электрофоретического разделения. На рис. 2 показана картина окрашивания полученными мкАТ препаратов рекомбинантного антигена TxA-VP7_a (рис. 2а) и универсального инактивированного антигена BTV (рис. 2б) после электрофоретического разделения. Результаты иммуноблотинга для большинства антител совпадают при анализе взаимодействия антител с рекомбинантным полипептидом и препаратом вируса. Так, мкАТ Bt11, Bt14, Bt15, Bt18, Bt19, Bt24, Bt25, Bt27, Bt32, Bt33, Bt34, Bt35 окрашивают белковые полосы, соответствующие как рекомбинантному антигену TxA-VP7_a (расчетная молекулярная масса 35 кДа) (рис. 2а, дорожки 11, 14, 15, 18, 19, 24, 25, 27, 32–35), так и VP7 (39 кДа) в составе вирусного антигена (рис. 2б, дорожки 11, 14, 15, 18, 19, 24, 25, 27, 32–35). По-видимому, эти антитела направлены против линейных антигенных детерминант в TxA-VP7_a и вирусе блютанга. При этом мкАТ Bt14, Bt15, Bt18, Bt33, Bt34, Bt35 эффективно взаимодействуют с TxA-VP7_a в тИФА, в котором препараты не подвергаются денатурации. В отличие от вышеперечисленных антител мкАТ Bt5, Bt9, Bt10, Bt16, Bt22, Bt23, Bt26, Bt28, Bt30, Bt31 не окрашивают TxA-VP7_a (рис. 2а), но окрашивают VP7 в препарате вируса (рис. 2б, дорожки 5, 9, 10, 16, 22, 23, 26, 28, 30 и 31). В этом числе находится и мкАТ Bt26, — одно из наиболее эффективно взаимодействующих с TxA-VP7_a в тИФА. По-видимому, при денатурации в одинаковых условиях экспонирование эпитопов в составе

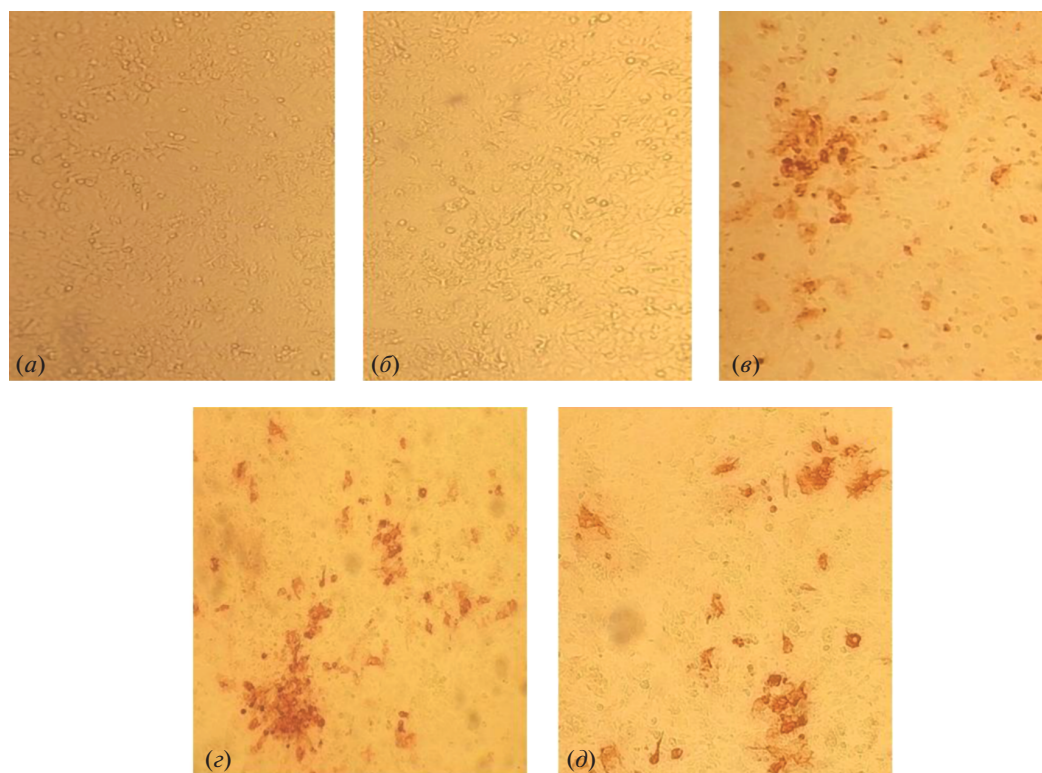


Рис. 1. Результаты иммуногистохимического окрашивания методом НГХ-ИФА культуры неинфицированных клеток VERO (а) и культуры клеток VERO, зараженной ВТV 1-го серотипа и обработанной AlpA-2 [28] (б); мкАТ Vt33 (в); мкАТ Vt3 (г); мкАТ Vt10 (д). Доза заражения 0.001 ТЦД₅₀/кл, время культивирования после заражения – 96 ч.

инактивированного препарата ВТV происходит гораздо более эффективно, чем в рекомбинантном антигене ТгхА-VP7_а. Также нельзя исключить возможность снижения доступности линейных эпитопов VP7 для взаимодействия с антителами вследствие ренатурации белков в процессе обработок на нитроцеллюлозной мембране.

Исследование полученных мкАТ в конкурентном тИФА. Для того чтобы выяснить, к одному или к разным эпитопам белка VP7 направлены полученные мкАТ, наиболее эффективно взаимодействующие с антигеном ТгхА-VP7_а мкАТ Vt14, Vt15, Vt18, Vt26, Vt33, Vt34 и Vt35 были проверены на способность конкурировать друг с другом в тИФА. Данные реципрокного конкурентного анализа представлены в табл. 2. Vt14 в гораздо большей степени, чем остальные антитела, ингибирует взаимодействие с ТгхА-VP7_а мкАТ Vt15, Vt18, Vt26, Vt33, Vt34 и Vt35, конъюгированных с пероксидазой (мкАТ-НRP). Все эти антитела ингибируют взаимодействие Vt14-НRP с ТгхА-VP7_а. По-видимому, это свидетельствует о максимальном перекрытии эпитопа VP7, узнаваемого этим антителом, с эпитопами, узнаваемыми другими антителами.

Показано, что мкАТ Vt15 не конкурируют за связывание с эпитопами рекомбинантного антигена ТгхА-VP7_а с мечеными мкАТ Vt18-НRP и Vt34-НRP. О несимметричном блокировании связывания антител с ТгхА-VP7_а друг другом свидетельствуют значения от 10 до 57% отношения, харак-

теризующего взаимодействие иммобилизованного антигена с мкАТ-НRP в присутствии и в отсутствие конкурирующих немеченых антител. Способность одних немеченых мкАТ конкурировать с другими мкАТ-НRP свидетельствует о перекрытии антигенных детерминант, к которым они направлены.

Специфичность мкАТ по отношению к серотипам ВТV. Способность полученных мкАТ выявлять специфические антитела к вирусным частицам в сыворотках животных была показана конкурентным тИФА. Была изучена способность мкАТ-НRP конкурировать за взаимодействие с иммобилизованным антигеном ТгхА-VP7_а с поликлональными сыворотками животных, зараженных различными серотипами ВТV. Результаты опытов показали, что все мкАТ были способны конкурировать с поликлональными антителами за связывание с VP7, но степень ингибирования различается (табл. 3). Сыворотки всех серотипов не полностью блокируют взаимодействие мкАТ-НRP Vt15; Vt18; Vt26; Vt33; Vt34; Vt35 с ТгхА-VP7_а. Референтные сыворотки 2-го и 22-го серотипов в меньшей степени влияют на степень связывания с антигеном. Например, сыворотка 2-го серотипа уменьшает связывание Vt18 только до 63%. Взаимодействие Vt14-НRP с антигеном наиболее эффективно блокируется всеми референтными сыворотками. Сыворотки животных, не содержащие антител к ВТV, не конкурируют с мкАТ за связывание с VP7.

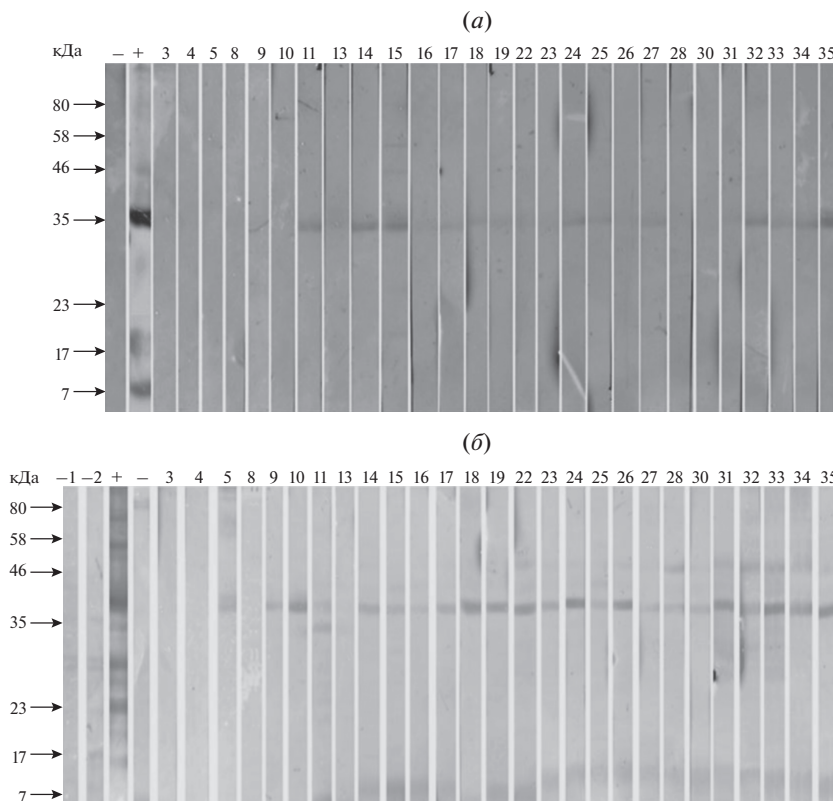


Рис. 2. Результаты иммуноблотинга рекомбинантного антигена TrxA-VP7_a (а) и универсального инактивированного антигена BTV (б) с мкАТ Vt3–Vt35, специфичными к VP7 (дорожки 3–35 соответственно). Для анализа использованы концентрации рекомбинантного антигена TrxA-VP7_a 8 мкг на дорожку, универсального инактивированного антигена BTV 38 мкг на дорожку. “К–” отрицательный контроль, нормальная сыворотка мыши; “К+” – положительный контроль, сыворотка мыши против BTV; “К1” – отрицательный контроль, лизат не зараженной культуры клеток (30.5 мкг на дорожку), взаимодействие с сывороткой мыши против BTV; “К2” – отрицательный контроль, лизат не зараженной культуры клеток, взаимодействие с нормальной сывороткой мыши.

Таким образом, при использовании в качестве иммуногенов рекомбинантного белка VP7_a, содержащего в своем составе иммуногенный фрагмент VP7 (114–257 а.о.), и инактивированного BTV, преимущественно состоящего из цельных вирусных частиц, получена представительная панель из 27 высоко аффинных мкАТ к VP7 BTV. Рекомбинантный антиген TrxA-VP7_a, содержащий лидерную последовательность тиоредоксина и фрагмент VP7, использовали для анализа гибридных клонов. Определено, что мкАТ Vt14, Vt15, Vt18, Vt26, Vt33, Vt34 и Vt35 могут быть использованы в конкурентном тИФА для выявления антител к BTV в сыворотке крови инфицированных животных. Показано, что эти мкАТ направлены против близких или перекрывающихся эпитопов антигена, антитела Vt14, Vt15, Vt18, Vt33, Vt34, Vt35 узнают линейные антигенные детерминанты. Показано, что максимальную способность блокировать взаимодействие специфических сывороток против 24-х серотипов BTV с VP7 демонстрирует мкАТ Vt14. Практически все мкАТ из полученной панели способны эффективно выявлять вирус в зараженных клетках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток: перевиваемые линии клеток CV-1, VERO и ПС. Культуры клеток получены из музея клеточных штаммов Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии.

Вирусы и сыворотки: вирус блютанга 1 серотипа (BTV-1) (Spanish pool 1,2 ovine blood, 3 пассажа в культуре клеток CV-1 и 2 пассажа в культуре клеток VERO, титр вируса 6.5 lg ТЦД₅₀/см³) получен из Государственной коллекции микроорганизмов Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии. Инактивированные препараты BTV: 1) инактивированный BTV получен экстракцией фреоном по методике, описанной в работе [18]; 2) универсальный инактивированный антиген BTV получен по методике согласно патенту [22].

Получение рекомбинантных белков, содержащих фрагмент VP7. Последовательность, кодирующую фрагмент гена *vp7* первого серотипа (342–770 п.о.), клонировали в *E. coli* штамм Rosetta по сайтам узнавания рестриктаз NcoI–NotI, с использованием плазмиды pET28b. Индукцию экспрессии соответствующего рекомбинантного белка VP7_a

Таблица 2. Результаты исследования моноклональных антител (мкАТ) в конкурентном тИФА

Нечеленные мкАТ	мкАТ-HRP						
	Bt14	Bt15	Bt18	Bt26	Bt33	Bt34	Bt35
Bt14	5.7	4.6	12.0	5.0	6.0	10.0	10.0
Bt15	27.0	17.0	100.0	15.0	42.0	100.0	51.0
Bt18	8.2	6.0	20.0	7.0	8.5	19.0	15.0
Bt26	15.0	6.0	15.7	5.3	7.9	15.0	11.0
Bt33	17.0	12.0	57.0	13.0	17.7	56.0	29.0
Bt34	8.0	7.0	27.0	6.7	7.5	27.0	14.0
Bt35	6.0	6.5	28.0	6.5	6.8	23.0	13.0

В пересекающихся ячейках указано процентное отношение оптических сигналов, полученных при взаимодействии мкАТ, меченных пероксидазой (мкАТ-HRP), с иммобилизованным рекомбинантным антигеном TgxA-VP7_a в присутствии (S) и в отсутствие (N) конкурирующих исследуемых нечеленных антител, найденное по формуле $\frac{S}{N} \times 100\%$. Чем больше полученное отношение, тем меньше конкуренция; при отношении, равном 100 конкуренция отсутствует.

Таблица 3. Анализ моноклональных антител в конкурентном тИФА с серогруппоспецифическими сыворотками

Референтные специфические сыворотки против BTV 1–24 серотипов	мкАТ-HRP						
	Bt14	Bt15	Bt18	Bt26	Bt33	Bt34	Bt35
ssBt1	8.4	9.6	51.0	9.8	8.0	19.2	16.3
ssBt2	26.7	27.8	63.0	44.3	31.0	48.2	49.1
ssBt3	5.4	8.0	10.0	5.1	3.9	6.9	6.9
ssBt4	7.5	13.2	7.70	3.7	9.6	6.6	10.3
ssBt5	8.7	18.1	13.0	6.2	9.8	10.9	14.2
ssBt6	14.7	16.7	20.0	10.8	13.7	17.1	22.9
ssBt7	27.5	39.3	47.0	23.5	24.5	19.0	41.9
ssBt8	6.7	6.9	5.6	3.5	3.4	4.3	4.1
ssBt9	9.6	9.0	33.0	9.6	8.8	22.8	18.3
ssBt10	6.4	7.7	17.0	7.4	5.3	10.9	10.1
ssBt11	17.3	16.5	11.0	5.8	8.0	6.7	15.2
ssBt12	5.0	6.7	6.0	5.5	3.6	8.2	8.2
ssBt13	7.4	9.6	10.0	6.2	7.9	8.0	11.0
ssBt14	13.5	15.6	28.0	16.2	33.0	25.7	24.0
ssBt15	5.4	7.4	3.0	5.2	7.5	3.3	4.2
ssBt16	10.5	11.1	31.0	14.0	9.5	24.1	24.2
ssBt17	5.4	7.5	3.0	4.5	3.1	3.7	3.8
ssBt18	9.5	18.4	7.0	3.9	7.3	6.1	9.6
ssBt19	5.1	6.5	3.0	4.4	3.7	3.7	3.6
ssBt20	15.5	23.1	17.0	9.2	14.0	12.9	19.0
ssBt21	5.1	18.9	5.0	4.7	3.4	4.8	4.4
ssBt22	22.9	15.2	42.0	39.2	27.1	38.0	38.6
ssBt23	5.3	6.5	5.0	5.5	3.0	3.7	4.6
ssBt24	8.5	8.8	9.0	4.7	8.7	6.7	14.5

В пересекающихся ячейках указано процентное отношение оптических сигналов, полученных при взаимодействии мкАТ, меченных пероксидазой (мкАТ-HRP) с иммобилизованным рекомбинантным антигеном TgxA-VP7_a в присутствии (S) и в отсутствие (N) референтных специфических сывороток против BTV 1–24 серотипов, найденное по формуле $\frac{S}{N} \times 100\%$.

(фрагмент 114–256 а.о. белка VP7) проводили добавлением IPTG до концентрации 1 мМ при $A_{600} = 0.5–0.6$, с последующей инкубацией при 37°C с аэрацией в течение 3 ч. Биомассу клеток отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 3000 g и 4°C в течение 20 мин, бактериальные клетки суспендировали в буфере следующего состава 50 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, pH 8.0 и разруша-

ли с помощью ультразвукового дезинтегратора (Cole Parmer Ultrasonic processor, США) в течение 3 мин в импульсном режиме по 5 с с такими же интервалами при температуре 4°C. Бактериальный лизат осветляли центрифугированием при 12000 g, 4°C в течение 20 мин и наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой; колонку промывали аналогичным буфером, содержащим 20 мМ имидазол; рекомбинантный белок элюировали буфером, содержащим 250 мМ имидазол.

Рекомбинантный химерный белок TrxA-VP7_a в дополнение к фрагменту VP7_a содержит в N-концевой области последовательность тиреодоксина А. Размер гена, кодирующего trxA-vp7_a, — 936 п.о., молекулярная масса соответствующего белка ~35 кДа. Экспрессию химерного белка проводили в клетках *E. coli* штамма KRX (Promega, США) под контролем промотора фага T7 в составе вектора pET32a (Invitrogen, США). Индукцию экспрессии и очистку белка TrxA-VP7_a проводили аналогично выделению белка VP7_a.

Непрямой твердофазный ИФА (тИФА) Антигены (экстрагированный фреонот инактивированный ВТВ и лизат клеток ПС) сорбировали в лунках планшетов для ИФА в объеме 100 мкл 0.05 М карбонатного буфера (рН 9.6) из раствора с концентрацией белка 1 мкг/мл. Сорбцию проводили в течение ночи при 4°C. Свободные центры связывания иммунопланшета блокировали 1% (w/v) раствором желатина в PBS (3 мМ KCl, 1 мМ KH₂PO₄, 140 мМ NaCl, 9 мМ Na₂HPO₄) в течение 30 мин. Затем в лунки планшета вносили исследуемые образцы, содержащие антигены: надклеточные супернатанты, иммунные сыворотки, асцитные жидкости, очищенные мкАТ. Образцы предварительно разводили PBST (PBS, содержащий 0.1% Tween 20). Гипериммунная к ВТВ мышьяная сыворотка и сыворотка не иммунной мыши служили, соответственно, положительным и отрицательным контролями. Инкубацию с антигеном проводили в течение 1 ч при 37°C.

Далее планшеты отмывали PBST, добавляли конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена в рабочем разведении в PBST, инкубировали 40 мин. Для детекции использовали 4 мМ раствор орто-фенилендиамина в цитрат-фосфатном буфере (26 мМ лимонная кислота, 50 мМ Na₂HPO₄, рН 5.0), содержащем 0.003% (v/v) H₂O₂. После развития окраски реакцию останавливали добавлением равного объема 10% (v/v) серной кислоты и определяли оптическое поглощение при 490 нм (A₄₉₀) с помощью мультипланшетного ридера Anthos 2020.

Получение моноклональных антител. Мышей линии BALB/c (возраст 8–12 недель) иммунизировали подкожно и внутрибрюшинно. Инъекции проводили с интервалом в 2 недели. Первые три иммунизации проводили рекомбинантным белком VP7_a в количестве 10 мкг на одно животное. Первую иммунизацию проводили в полном адьюванте Фрейнда, две последующие — в неполном. Перед инъекцией раствор антигена в PBS эмульгировали с равным объемом адьюванта. Далее животных иммунизировали три раза препаратом инактивированного ВТВ первого серотипа, экстрагированного фреонот [18] (100 мкг на мышшь) в PBS. Относительное содержание антител в сыворотке крови иммунных животных (титр) определяли по взаимодействию сывороточных антител с иммобилизованными на планшеты для ИФА инактивированным ВТВ, экстрагированным фреонот. Через 3 дня после последней (бустерной)

инъекции у мыши стерильно извлекали селезенку, гомогенизировали и смешивали спленоциты с клетками мышьяной миеломной линии SP2/0, которые предварительно культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 5% (v/v) эмбриональной телячьей сыворотки (FCS). Гибридные клетки получали путем слияния спленоцитов мыши и клеток миеломы с помощью раствора полиэтиленгликоля (50%, w/v) по методу Köhler и Milstein [19], после чего клетки в среде DMEM, содержащей 20% (v/v) FCS, HAT (0.1 мМ гипоксантин, 0.4 мМ аминоптерин, 16 мМ тимидин), переносили в 96-луночные культуральные планшеты. В планшеты за сутки до слияния клеток помещали макрофаги из перитонеальной полости мышей для создания фидерного слоя. Гибридные клоны выращивали во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Рост клонов контролировали визуально под микроскопом. Из лунок с выросшими клонами на 7–9-й день отбирали культуральную жидкость и проверяли наличие в ней специфических антител, взаимодействующих с вирусными частицами, методом непрямого тИФА. При положительном ответе клетки отбирали, наращивали и дважды клонировали методом лимитирующих разведений в среде DMEM, содержащей 20% FCS.

Наработка и выделение моноклональных антител. мкАТ выделяли аффинной хроматографией на белок А-сефарозе [23] из культуральных жидкостей гибридом, секретирующих мкАТ. Антиген-связывающую активность полученных препаратов мкАТ оценивали непрямым тИФА по взаимодействию с иммобилизованным на пластик инактивированным ВТВ, экстрагированным фреонот.

Определение концентрации белков. Концентрации белков в препаратах ВТВ и лизатах клеток интактной культуры измеряли по методу Бредфорд [24], концентрацию иммуноглобулинов — по поглощению при 280 нм [25].

Определение констант аффинности моноклональных антител. Константы аффинности вычисляли по методу Битти [26], используя неконкурентный тИФА. Используя серийные разведения как антигена (инактивированного ВТВ, экстрагированного фреонот), иммобилизованного на иммунопланшете, так и вносимых мкАТ, проводили инкубацию с конъюгатом кроличьих антимышьяных антител и пероксидазы хрена, фотометрически измеряли концентрацию продукта ферментативного окисления субстрата (OPD) и строили графики зависимости A₄₉₀ от концентрации мкАТ в логарифмических координатах. Сигмоидный характер кривой позволял определить A₄₉₀ при насыщающей концентрации антител и A₄₉₀ — в “точке перегиба” кривой. По полученным графикам определяли концентрации мкАТ [мкАТ'] и [мкАТ] в точке перегиба, которые соответствовали концентрациям антигена [Ag'] и [Ag], сорбированного на иммунопланшет. При условии, что [Ag'] = [Ag]/2, $K_{\text{афф}} = 1/2(2[\text{мкАТ}'] - [\text{мкАТ}])$.

Конкурентный тИФА. Предварительно готовили конъюгированные с пероксидазой мкАТ (мкАТ-НRP), используя метод окисления периодатом натрия, как описано Wilson and Nakane [27]. В лунки ИФА-планшетов, предварительно сенсибилизированных антигеном T_gA-VP7_a (8 мкг/мл), вносили очищенные мкАТ в концентрациях, уменьшающихся от 100 до 0.7 мкг/мл, и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем вносили мкАТ-НRP в разведениях, подобранных в ходе предварительных экспериментов, которые позволяли при взаимодействии с T_gA-VP7_a в отсутствие конкурирующих мкАТ, получать оптическое поглощение (A_{490}) в диапазоне от 1 до 1.5. Визуализацию сигналов проводили так же, как и в непрямом тИФА. Для каждой экспериментальной точки рассчитывали степень взаимодействия мкАТ-НRP с иммобилизованным T_gA-VP7_a в присутствии конкурирующих антител как процентное отношение S от N ($S - A_{490}$ в лунке, куда были добавлены конкурирующие антитела, N – A_{490} в лунке без добавления конкурирующих антител).

Аналогичную методику использовали для выяснения способности мкАТ-НRP конкурировать с антителами из сывороток инфицированных животных за связывание с VP7. Для этого использовали специфические сыворотки крови против 24-х серотипов BTV в разведении 1 : 2. Оценку результатов также проводили, вычисляя процентное отношение S от N, где S – A_{490} в лунке, куда были добавлены сероспецифические сыворотки, N – A_{490} в лунке без их добавления.

Непрямой гистохимический иммуноферментный анализ (НГХ-ИФА). Тест-планшеты для определения активности мкАТ методом НГХ-ИФА готовили следующим образом: заражали BTV культуру клеток VERO, выращенную в лунках 96-и луночных планшетов в течение 1–2-х суток в ростовой среде Игла, содержащей 10% FCS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2.5 ед./мл амфотерицина В. Вирус вносили в лунки планшетов в дозе заражения 0.001 ТЦД₅₀/кл в 100 мкл среды Игла с указанными антибиотиками. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 95% влажности и 5% CO₂ в течение 96 ч. Среду культивирования из лунок удаляли, клеточный монослой двукратно промывали PBS, фиксировали 80% (v/v) ацетоном, охлажденным до –20°C. Далее в лунки планшетов вносили последовательные двукратные разведения исследуемых мкАТ и сывороток (нормальной и специфической) в PBS, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После трехкратной промывки PBST 20 в лунки добавляли антитела козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой в разведении, согласно рекомендации производителя, и инкубировали 1 ч при 37°C. После 3-х кратной отмывки, в лунки планшетов вносили раствор хромогенного субстрата 3,3'-диаминобензидина с 3-амино-9-этилкарбозолом. Реакцию развивали при комнат-

ной температуре в течение 10–15 мин. Учет реакции проводили под световым микроскопом – в цитоплазме клеток в местах локализации иммунных комплексов наблюдали коричневое окрашивание.

Иммуноблоттинг. К растворам, содержащим антигены, добавляли равные объемы буфера для нанесения образцов, после чего образцы прогревали при 96°C в течение 5 мин. Электрофоретическое разделение антигенов проводили в 10% полиакриламидном геле с 0.1% SDS. Электроперенос фракционированных полипептидов на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли полусухим методом TransBlot Turbo system (BioRad) согласно инструкции. Далее проводили блокирование мембраны 1% раствором желатина в PBST в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере, вносили мкАТ и контрольные сыворотки, разведенные в PBST, инкубировали в течение ночи при 4–8°C. Рабочие концентрации мкАТ и контрольных сывороток были подобраны согласно данным НГХ-ИФА по их взаимодействию с фиксированными клетками VERO, зараженными BTV. Большинство антител использовали в концентрации 1 мкг/мл, кроме: Vt3, Vt9, Vt3, Vt10, Vt13, Vt22, Vt23, которые вносили в концентрации 0.3 мкг/мл; Vt5, Vt14, Vt15, Vt25 и Vt28 – 5 мкг/мл. После инкубации с антителами мембраны в течение 1 ч обрабатывали конъюгатом пероксидазы хрена с кроличьими антителами к иммуноглобулинам мыши в рабочем разведении. На каждой стадии нитроцеллюлозные мембраны тщательно не менее трех раз отмывали PBST. Мембрану помещали в субстратную смесь – PBST, 0.001 М 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорид и 0.5% (v/v) перекись водорода. Выдерживали в данном растворе до появления окрашенных полос. Молекулярные массы полипептидов рассчитывали с помощью маркеров молекулярного веса “Prism Ultra Protein Ladder” (Abcam, США).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках ГК № 0101-2019-0038 по теме “Новые биоматериалы и бионанотехнологии для диагностики и терапии” и ГК № 0615-2019-0003 по направлению 159 ПФНИ ГАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении настоящей работы были соблюдены все этические стандарты.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mertens P.P., Diprose J., Maan S., Singh K.P., Attoui H., Samuel A.R. // *Vet. Ital.* 2004. V. 40. P. 426–437.
2. Макаров В.В., Шоопала Д., Джупина С.И., Сухарев О.И. // *Ветеринария сегодня.* 2013. Т. 1. С. 8–10. [Makarov V.V., Shoopala J., Dzupina S.I., Sukharev O.I. // *Veterinary Today.* 2013. V. 1. P. 8–10.]

3. Mellor P.S., Baylis M., Peter P.C., Mertens P.P. *Bluetongue in the Indian subcontinent* // London: Academic Press. 2009. P. 167–196.
4. Ratnieri M., Caporale M., Golder M., Franzoni G., Allan K., Nunes S.F., Armezani A., Bayoumy A., Rixon F., Shaw A., Palmarini M. // *PLoS Pathog.* 2011. V. 7. P. 1002477.
5. Mertens P.P., Brown F., Sangar D.V. // *Virology.* 1984. V. 135. P. 207–217.
6. Van Dijk A.A., Huismans H. // *J. Gen. Virol.* 1988. V. 69 (Pt 3). P. 573–581.
7. Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro A., de Santis P., Meiswinkel R., Caporale V. // *Vet. Ital.* 2004. V. 40. P. 286–291.
8. Meiswinkel R., Baldet T., De Deken R., Takken W., Delécolle J.C., Mellor P.S. // *Prev. Vet. Med.* 2008. V. 87. P. 55–63.
9. Захаров В.М. // *Ветеринария.* 2009. № 5. С. 3–5. [Zakharov V.M. // *Veterinariya.* 2009. № 5. P. 3–5.]
10. Макаров В.В., Сухарев О.И., Василевич Ф.И. // *Ветеринария.* 2014. № 6. С. 18–23.
11. Hewat E.A., Booth T.F., Wade R.H., Roy P. // *J. Struct. Biol.* 1992. V. 108. P. 35–48.
12. Afshar A. // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1994. V. 17(3–4). P. 221–242.
13. Koumbati M., Mangana O., Nomikou K., Mellor P.S., Papadopoulos O. // *Veterinary Microbiology.* 1999. V. 64. P. 277–285.
14. Mars M.H., van Maanen C., Vellema P., Kramps J.A., van Rijn P.A. // *Veterinary Microbiology.* 2010. V. 146. P. 209–214.
15. Wu X., Liu Q., He J., Zang M., Wang H., Li Y., Tang L. // *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 2015. V. 34. P. 116–121.
16. Wilson W.C., Ma H.C., Venter E.H., van Dijk A.A., Seal B.S. // *Virus Res.* 2000. V. 67. P. 141–151.
17. Wang L.F., Hyatt A.D., Whiteley P.L., Andrew M., Li J.K., Eaton B.T. // *Arch. Virol.* 1996. V. 141. P. 111–123.
18. Verwoerd D.W., Els H.J., De Villiers E.M., Huismans H. // *Journal of Virology.* 1972. V. 10. P. 783–794.
19. Köhler G., Milstein C. // *Nature.* 1975. V. 256. P. 495–497.
20. La Vallie E.R., Di Blasio E.A., Kovacic S., Grant K.L., Schendel P.F., McCoy J.M. // *Biotechnology (N.Y.)* 1993. V. 2. P. 187–193.
21. Stevens R.C. // *Structure.* 2000. V. 8. P. 177–185.
22. Пат. 2352357 РФ, МПК⁷. А61К 39/12, G01N 33/569. Способ получения универсального инактивированного антигена вируса блютанга для серодиагностики / Балышева В.И., Новикова М.Б. (РФ). № 2007132285/13. Заявлено 28.08.07; Опубл. 20.04.09. Бюл. № 11. 5 с.
23. Baumgarten H., Franze R. // *Monoclonal Antibodies / Eds. Peters J.H., Baumgarten H. Springer-Verlag,* 1992. P. 223–233, 264–271.
24. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
25. Hay F.C., Westwood O.M.R. // *Practical Immunology (4th ed.). London; Wolverhampton; Blackwell Science,* 2002. P. 1–39.
26. Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G. // *Journal of Immunology Methods.* 1987. V. 100. P. 173–179.
27. Wilson M.B., Nakane P.K. // *Immunofluorescence and Related Staining Techniques / Eds. Knapp W., Wick G., Holubar K. Amsterdam: Elsevier-Academic Press,* 1978. P. 215–224.
28. Karatovskaya A., Rudenko N., Tsfasman I., Guseva K., Laman A., Boziev K., Brovko F., Vasilyeva N. // *Process Biochemistry.* 2016. V. 51. P. 1521–1526.

Monoclonal Antibodies to Recombinant Protein VP7 of Bluetongue Virus

N. V. Rudenko^{*, **, #}, A. P. Karatovskaya^{*}, A. O. Shepelyakovskaya^{*}, A. V. Zamyatina^{*, **, #}, F. A. Brovko^{*, **, #}, A. Y. Koltsov^{***}, I. R. Imatdinov^{***}, A. R. Imatdinov^{***}, O. M. Strijakova^{***}, K. A. Mima^{***}, V. M. Lyska^{***}, and D. V. Kolbasov^{***}

[#]Phone: +7 (926) 592-11-89; e-mail: nrudkova@mail.ru

^{*}Pushchino Branch, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

^{**}Pushchino State Institute of Natural Sciences, pr. Nauki 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

^{***}Federal Research Centre for Veterinary Virology and Microbiology, Building 1, Academician Bakoulov Street, Volginsky, Vladimir region, 601125 Russia

Blutang or catarrhal fever of sheep is a viral transmissible infection of ruminants, which is one of the economically significant arbovirus infections of animals. Viral VP7 is a group-specific core protein of the virus, conservative for all its known serotypes, and therefore represents the most suitable target for the development of diagnostic tests. For the development of an immunochemical method for detecting viral infection, a panel of monoclonal high-affinity antibodies to VP7 was obtained. As immunogens, the N-terminal VP7 fragment expressed in *E. coli* and inactivated virus particles were used. The obtained monoclonal antibodies are applicable to detect the virus in infected cells. As a species-specific antigen, a recombinant protein TrxA–VP7_a was created, which contained spatial epitopes similar to those in the native viral antigen. Using it, promising antibodies were selected for the diagnostics of BTV by competitive enzyme immunoassay (EIA) that enabled identification of specific antibodies in sera of infected animals. By competitive solid-phase EIA it was shown that antibodies interacting with TrxA–VP7_a the most efficiently (Bt14, Bt15, Bt18, Bt26, Bt33, Bt34 and Bt35) had close or overlapping epitopes. Interaction of virtually all produced antibodies with the antigen was inhibited by specific reference sera against 24 serotypes of BTV. Bt14 monoclonal antibody exhibited the maximum ability to block VP7 interaction with specific sera against 24 bluetongue serotypes. Thus, the obtained panel of monoclonal antibodies to VP7 of bluetongue virus can be used to detect viral infection, as well as as a component of sets for serological diagnosis of the disease.

Keywords: bluetongue virus (BTV), viral protein 7 (VP7), monoclonal antibodies, epitopes