

КОНСТРУИРОВАНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА С *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В ИФА

А.П. Жеребцов, Н.Ф. Гаврилова, И.В. Яковлева, Н.А. Михайлова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Актуальность. Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – условно-патогенная грамотрицательная подвижная неспорообразующая бактерия, обладающая многочисленными факторами патогенности. *P. aeruginosa* устойчива к широкому спектру антибиотиков и входит в число наиболее часто встречающихся патогенов, вызывающих внутрибольничные инфекции. Важно отметить, что *P. Aeruginosa* включена ВОЗ в «критическую» группу. Данные обстоятельства обуславливают актуальность разработки препаратов для иммунопрофилактики и иммунотерапии заболеваний, вызываемых данным микроорганизмом.

Важным фактором патогенности *P. aeruginosa* является жгутик; помимо своей роли в передвижении бактерии он участвует в процессе биопленкообразования, что считается одним из основных показателей её устойчивости к антибиотикам и антисептикам. Главным структурным компонентом жгутика является белок флагеллин. Известно, что он обладает выраженными адьювантными свойствами, так как является лигандом TLR5 рецептора врожденной иммунной системы и через адаптерный белок MyD88 активирует клетки CD4+ и дальнейшую индукцию синтеза специфических иммуноглобулинов.

В ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова был получен рекомбинантный флагеллин С (FliC) *P. aeruginosa*, который формирует базальное тело жгутика бактерии, а также была доказана его иммуногенность и протективные свойства. Однако открытым остаётся вопрос разработки технологии выявления рекомбинантного белка FliC при его получении.

Цель работы. Получение конъюгатов моноклональных антител к рекомбинантному флагеллину С *Pseudomonas aeruginosa* с пероксидазой хрена и оценка возможности их использования для конструирования иммуноферментного теста для выявления рекомбинантного белка FliC.

Материалы и методы. На основании ранее полученных данных самые стабильные гибридомы-продуценты заданной специфичности (МКА-1 и МКА-2) использовали для наработки антител *in vivo* в мышах линии BALB/c. Поликлональные антитела (ПКА) получали из сыворотки мышей, иммунизированных рекомбинантным FliC *P. aeruginosa*. Выделение МКА из асцитных жидкостей мышей и ПКА из сыворотки проводили методом сульфатного осаждения. Конъюгирование МКА-1 и МКА-2 с пероксидазой хрена проводили периодатным методом [1].

Определение рабочего разведения конъюгатов проводили в ИФА. Стабилизацию полученных препаратов конъюгированных антител осуществляли путём добавления 5 % БСА и равного объёма 87 % глицерина.

Выявление рекомбинантного FliC *Pseudomonas aeruginosa* и определение его концентраций проводили в «сэндвич» – варианте ИФА.

Результаты. Концентрация выделенных из асцитной жидкости МКА-1 составила 16,7 мг/мл, МКА-2 (13,1 мг/мл), ПКА (13,6 мг/мл).

Полученные в результате конъюгирования препараты МКА-1-ПХ и МКА-2-ПХ показали разную активность в ИФА: рабочее разведение конъюгата МКА-2-ПХ составило (1:1000), а конъюгата МКА-1-ПХ (< 1:100), что не позволило использовать его в дальнейших исследованиях.

В связи с особенностью белка флагеллина, связанной с его гидрофобностью и способностью полимеризоваться в спиральные филаменты, которые в полимерной форме белка обращены внутрь цилиндрической полости, его идентификация в «сэндвич»-варианте

ИФА была невозможна. В связи с этим, было решено провести денатурацию рекомбинантного белка FliC двумя методами: 1) буферным раствором 8М мочевины, 2) нагревание до температуры 90 °С. Для постановки данного эксперимента планшет сенсibilизировали ПКА-1(FliC), МКА-1(FliC), МКА-2(FliC) в концентрациях 5,0 мкг/мл. Затем планшет инкубировали в течение ночи при температуре 4 °С. Далее вносили рекомбинантный FliC в исходной концентрации 10 мкг/мл с последующей раститровкой двукратным шагом в трех вариантах: (1) FliC, диализованный против 50 мМ Tris-HCl, pH 9,0; (2) FliC, растворенный в 8М буферном растворе мочевины; (3) FliC, денатурированный под воздействием температуры 90 °С.

После инкубации в течение часа при температуре 37 °С вносили конъюгат МКА-2-ПХ в рабочем разведении. Проявляли реакцию однокомпонентным раствором тетраметилбензидина. Отрицательным контролем служили лунки без добавления рекомбинантного FliC. Через 10 минут реакцию останавливали добавлением 0,5 М раствора серной кислоты. Оценивали реакцию по величине оптической плотности на спектрофотометре, определяемой при длине волны 450 нм.

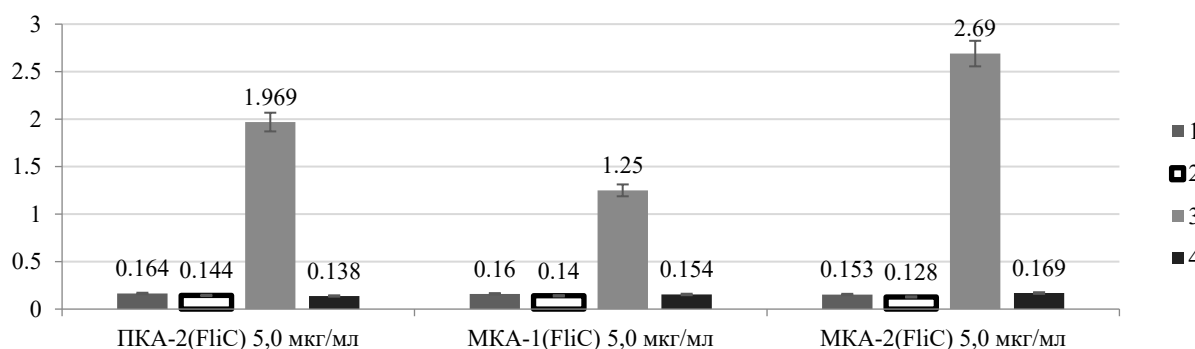


Рис. 1 «Сэндвич» – вариант ИФА для выявления рекомбинантного флагеллина С *P. Aeruginosa*: Дорожки: 1 – FliC, диализованный против 50 мМ Tris-HCl, pH 9,0; 2 – FliC, растворенный в 8М буферном растворе мочевины; 3 – FliC, денатурированный под воздействием температуры 90 °С; 4 – Отрицательный контроль.

Как видно из рис. 1, наибольшей чувствительностью отличался «сэндвич» – вариант ИФА с иммобилизованными и использованными в качестве детектирующих МКА-2(FliC).

Заключение. В итоге проведенной работы получены конъюгаты моноклональных антител к рекомбинантному флагеллину С *Pseudomonas aeruginosa* с пероксидазой хрена. Рекомбинантный FliC определяется в «сэндвич» – варианте ИФА только в денатурированном состоянии под воздействием температуры 90 °С (вариант № 3). Вызванные денатурацией белка конформационные изменения, возможно, приводят к более высокой доступности антигенных детерминант для связывания.

Наиболее высокие показатели оптической плотности получены при использовании в качестве как распознающих, так и детектирующих МКА-2(FliC), этот вариант модельной системы позволяет выявлять рекомбинантный FliC с чувствительностью 0,15–0,075 мкг/мл.

Литература

1. Nakane, Paul K. Peroxidase – labeled antibody a new method of conjugation / Paul K. Nakane and Akira Kawaoi // J. Histochem Cytochem, 1974, Vol. 22, No. 12, pp. 1081–1091