

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.6. - С.140-141

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ФЕРМЕНТОМ АНТИТЕЛ ПРОТИВ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА БРУЦЕЛЛ Omp25

Жумалин А.Х.

Бруцеллез – инфекционная болезнь, поражающая животных всех видов, а также человека и представляет собой серьезную проблему для здравоохранения и животноводства. Он наносит большой экономический ущерб животноводству, который складывается из ряда прямых факторов: аборт, рождение нежизнеспособного приплода, яловость, снижение молочной продуктивности. Значительный ущерб наносится из-за проведения мероприятий, связанных с ликвидацией бруцеллеза: карантин, ограничительные мероприятия, дезинфекция и обеззараживание зараженного материала, компенсации за уничтоженных животных. Роль данного заболевания для общественного здравоохранения объясняется прямой или косвенной передачей инфекции от зараженных животных к человеку, что приводит к тяжелому заболеванию людей, инвалидности и потери трудоспособности [1].

Эффективность борьбы с бруцеллезом напрямую зависит от эффективности диагностических мероприятий, которые в первую очередь должны быть направлены на раннее выявление инфекции. В Казахстане для массового исследования на бруцеллез применяются серологические методы, такие как реакция агглютинации (РА), реакция связывания комплемента (РСК), роз-бенгал проба (РБП) и непрямой вариант иммуноферментного анализа (ИФА).

В последнее время в диагностической практике находит свое применение тест-система, основанная на использовании конкурентного варианта ИФА (кИФА). Последний обладает высокой чувствительностью и специфичностью, за счет того что искомые антитела и меченный ферментом антитела конкурируют друг с другом за антиген, сорбированный на твердой фазе. Поэтому, главным компонентом кИФА, являются специфические антитела меченные ферментом [2].

Целью настоящей работы явилось получение меченных ферментом антител против рекомбинантного белка бруцелл Omp25.

Для иммунизации кроликов был использован рекомбинантный белок Omp25, который был получен сотрудниками ТОО «НИИ сельскохозяйственной биотехнологии» при выполнении проекта «ИФА-тест на основе рекомбинантного белка внешней мембраны возбудителя бруцеллеза», выполняемого в рамках Бюджетной Программы 217 Министерства образования и науки РК [3].

С целью получения антисыворотки против рекомбинантного белка Omp25 бруцелл, использовали следующую схему иммунизации. В первый день иммунизации кролику в 4-х местах подкожно вдоль хребта вводили 50,0 мкг Omp25 в 1 мл инъекционного материала (100 мкл белка+400 мкл забуференного физиологического раствора+500 мкл полного адьюванта Фрейнда). На 14 и 28 дни, используя тот же способ введения антигена, инъецировали такую же дозу Omp25,

но с неполным адьювантом Фрейнда. Через 7 дней инъекционный материал ввели без адьюванта и на 7 день после бустеризации осуществляли забор крови с последующим отделением антисыворотки. Использованная схема иммунизации оказалась весьма эффективной и позволила нам получить антисыворотку с титром 1:12800 в непрямом варианте ИФА.

Полученную антисыворотку подвергали последовательной очистке методами сульфат-аммонийного высаливания и аффинной хроматографии (MabTrapKit GE Healthcare, Sweden). Использованные методы позволили нам получить очищенную IgG-фракцию антител. Элюируемые иммуноглобулины выходили из колонки двумя фракциями. Определение чистоты выделенных IgG-антител проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) [4]. Установлено, что IgG-антитела в обеих фракциях разделились на две мажорные полосы с молекулярной массой 55 кДа и 25 кДа, соответствующие тяжелым и легким цепям иммуноглобулина данного класса. Для дальнейшей работы была взята IgG-антитела второй фракции, поскольку она была чище от примесей, чем первая фракция.

Для конъюгирования IgG-антител кролика, специфичных к Omp25 бруцелл пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, [Сент-Луис, США](#)) использовали общеизвестный перйодатный метод (Nakane P.K. and Kawaoi A., 1974)[5]. Рабочим титром конъюгата считали то разведение, которое выявляет не менее 15 нг/мл рекомбинантного белка бруцелл. Результаты проверки активности конъюгата против Omp25 бруцелл в непрямом ИФА показали, что он может быть использован для детекции указанной концентрации антигена в титре не более чем 1:1600.

Список литературы

1. Asaad A.M., Alqahtani J.M. Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia // *Journal of Infection and Public Health*. – 2012. – Vol. 5. – P. 189-194.
2. Қисықов Т. Сьер бруцеллезінің Қазақстандағы індеттік жағдайы // *Ветеринария (Қаз.)*. – 2009. – № 3 (7). – С. 44-46.
3. Турсунов К.А., Андыбаева С.Е. Получение рекомбинантных белков rOmp25 и rOmp31 и изучение их антигенности // *Ветеринария в XXI веке – проблемы, методы, решения: матер. Междун. науч.-практ. конф. посв. 100-летию со дня рожд. профессора Кадырова Нургали Тасиловича*. – Астана, 2016.
4. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Nat. Acad. Sci.* –1979. – Vol.76(9). – P.4350-4354.
5. Nakane P.K. and Kawaoi A. Peroxidase-labeled Antibody: A New Method of Conjugation // *J Histochem Cytochem*. – 1974. – Vol. 22. – P. 1084-1091.