

КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ ТА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

УДК: 616–003.811/577.217.5

МОДИФІКАЦІЯ МЕТОДУ PRIONICS-CHECK WESTERN ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРІОН-ПРОТЕЇНУ

П. І. Вербицький, І. М. Петрух, Д. Д. Остапів, В. В. Влізло

Інститут біології тварин УААН

Горизонтальний електрофорез проб довгастого мозку великої рогатої худоби на PVDF-мембрані (Immobilon-P, Millipore) та насичення мембрани специфічними моноклональними антитілами дає можливість виявити пріон-протеїн. Модифікація методу дозволила скоротити час та здешевити дослідження. Запропонований метод може бути використано як пріон-тест для діагностики ГЕ ВРХ та інших пріонних інфекцій.

Пріонні інфекції характеризуються руйнуванням клітин мозку та накопиченням агрегатів патологічного пріона (PrP^{Sc}) [1, 2]. У клітинах здорового організму є фізіологічний пріон (PrP^C), який за хімічним складом ідентичний з PrP^{Sc}, але вони відрізняються конформацією або третинною структурою. Тобто, шляхом модифікації своєї структури звичайний клітинний білок набуває властивості інфекційності [3].

Сьогодні існують тест-системи й арбітражні методи, які дають можливість діагностувати губчастоподібну енцефалопатію великої рогатої худоби та інші пріонні інфекції, шляхом визначення PrP^{Sc} [4]. Усі вони базуються на властивості протеїнази К перетравлювати фізіологічний пріон і не руйнувати патологічний, що є важливо при імунодетекції PrP^{Sc}. Метод Prionics-Check Western (вестерн-блот) ґрунтується на розділенні білків шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі та ідентифікації пріона за допомогою специфічних моноклональних антитіл.

Метою роботи було спростити та скоротити час виявлення пріон-протеїну у довгастому мозку великої рогатої худоби.

Матеріали і методи. Матеріалом для досліджень була велика рогата худоба чорно-рябої молочної породи, у якої для досліджень після забою відбирали довгастий мозок. Дослідження на виявлення пріона проводили методом Prionics-Check Western, у який внесли зміни. Так, за методом вестерн-блот, імунодетекція PrP^{Sc} здійснюється за допомогою моноклональних антитіл після електрофорезу в 12 % ДСН-ПААГ та перенесення білків з гелю на PVDF-мембрану (Immobilon-P, Millipore), яка насичується моноклональними антитілами 6H4 (Prionics, Swiss) та антимишиним імуноглобуліном (мишачий анти-PrP IG1). Детекція імуних комплексів здійснюється з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази — CDP-Star (Tropix, GB). Візуалізація на рентгенівській плівці ECL HyperFilm (Amersham, USA) проводиться за допомогою реактивів для проявлення плівок (Kodak). Тривалість досліджень — 6–8 год.

При модифікації методу вестерн-блот проби для досліджень готували так же, як у методі Prionics-Check Western до етапу проведення електрофорезу у 12 % ДСН-ПААГ. Далі, на відміну від згаданого методу, електрофоретичне розділення білків досліджуваних тканин проводили безпосередньо на PVDF-мембрані (Immobilon-P, Millipore), попередньо витриманій (15 хв) у метанолі. На мембрану наносили смужки фільтрувального паперу, на які додавали підготовані проби (5 мкл). Горизонтальний електрофорез проводили протягом 30 хв при напрузі 200 V. Після електрофорезу PVDF-мембрану блокували (30 хв) у буфері для

блокування неспецифічного зв'язування моноклональних антитіл з білками, інкубували (1 год) із специфічними моноклональними антитілами 6H4 (Prionics, Swiss) і промивали (3 рази по 5 хв) у TBST для видалення незв'язаних моноклональних антитіл. Для візуалізації сигналу використовували допоміжне антитіло (мишачий анти-PrP IG1), у якому інкубували промиту мембрану (30 хв). Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази (CDP-Star; Tropix, GB). За допомогою набору реактивів для проявлення плівок (Kodak) отриманий результат виявляли на рентгенівській плівці (ECL HyperFilm). Тривалість досліджень становила 4–5 год.

Результати та обговорення. У результаті проведених досліджень на рентгенівській плівці фіксувалася тільки проба досліджуваної тканини довгастого мозку корів, яка не піддавалася дії протеїнази К, та білок-маркер (рис 1).



Рис 1. Виявлення пріон-протеїну на PVDF-мембрані (Immobilon-P, Millipore)

Зразки, у які додавали протеїназу К (рис. 1, проби 2, 3), після електрофорезу та імунодетекції на рентгенівській плівці не виявлялися. Це свідчить про відсутність у мозку досліджуваних корів PrP^{cs} .

Такий метод виявлення пріон-протеїна є простим у виконанні. Його застосування виключає етап перенесення білків з гелю на мембрану, а отже, додаткового використання спеціального обладнання та реактивів. Час виконання, порівняно з методом Prionics-Check Western, скорочується на 2–3 години.

ВИСНОВКИ

Об'єднання двох етапів методу Prionics-Check Western (електрофорезу та вестерн-блоту), забезпечило здешевлення та скорочення часу проведення досліджень для виявлення пріон-протеїну.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на пошук високоінформативних, ранніх і прижиттєвих методів виявлення інфекційного пріона.

МОДИФИКАЦІЯ МЕТОДА PRIONICS-CHECK WESTERN ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИОН-ПРОТЕИНА

П. И. Вербицкий, И. М. Петрух, Д. Д. Остапив, В. В. Влизло

АННОТАЦИЯ

Горизонтальный электрофорез проб продолговатого мозга крупного рогатого скота на PVDF-мембране (Immobilon-P, Millipore) и насыщение мембраны специфическими

моноклональними антителами дає можливість виявити прион-протеїн. Модифікація методу дозволила скоротити час і удешевити дослідження. Предложеному методу можна використовувати як прион-тест для діагностики ГЭКРС і інших прионних інфекцій.

MODIFICATION OF PRIONICS CHECK THE WESTERN METHOD FOR PRIONS' DETERMINATION.

P. I. Verbitsky, I. M. Petruh, D. D. Ostapiv, V. V. Vlizlo

S U M M A R Y

Horizontal electrophoresis tests of cattle medulla oblongata on PVDF-membrane and specific monoclonal antibodies saturation of membrane enables to find out prion-protein. Modification of this method allowed shortening time and reducing the price of research. The offered method can be used as a prion-test for diagnostics of spongyform encephalopathy and other prion infections.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Gavier-Widen D.* Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases / D. Gavier-Widen, A.-G. Biacabe, J.-L. Laplanche. et al. // *EMBO J.* — 2004. — Vol. 5. — P. 110–115.
2. *Григорьев В. Б.* Прионные болезни человека и животных // *Вирусология.* — 2004. — Т. 49. — № 5. — С. 4–12.
3. *Prusiner S. B.* Molecular biology and pathogenesis of prion diseases // *TIBS.* 1996. — 21. — P. 482–487.
4. *Влізло В. В.* Ідентифікація патологічного приона при губчастоподібній енцефалопатії великої рогатої худоби / В. В. Влізло, В. В. Стадник, Х. Я. Майор та ін. // *Біотехнологія.* — 2008. — Т. 1. — № 2. — С. 75–80.

Рецензент: завідувач лабораторії обміну речовин, кандидат біологічних наук Ю. Т. Салига.