

Изучение антигенных свойств рекомбинантного аналога белка NEF вируса иммунодефицита человека

Г.И. Алаторцева¹ (alatortseva@gmail.com), М.Н. Носик¹ (mnossik@yandex.ru),
Л.Н. Нестеренко¹ (Innesterenko@pochta.ru), И.И. Амиантова¹ (amianti@yandex.ru),
В.В. Доценко¹ (VerraMal@gmail.com), Л.Н. Лухверчик¹ (lexx294@yandex.by),
М.В. Жукина¹ (alatortseva@gmail.com), В.Ю. Кабаргина (v.cabargina@yandex.ru),
Е.Н. Кудрявцева² (kudravtseva@mail.ru), В.В. Зверев¹ (vitalyzverev@outlook.com)

¹ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва

²ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва

Резюме

Белок p27/p25 – продукт гена *nef* вируса иммунодефицита человека – multifunctional фактор патогенности ВИЧ. Антигенные свойства рекомбинантного полипептида NEF, содержащего слитный с β-галактозидазой *E. coli* N-концевой фрагмент белка p27 ВИЧ-1, исследованы с применением серологических и вирусологических методов. Методами ИФА, Вестерн-блоттинга и линейного иммуноанализа показано взаимодействие рекомбинантного антигена NEF и сывороток крови ВИЧ-инфицированных пациентов и отсутствие положительных реакций с сыворотками крови здоровых людей. Антигенная специфичность рекомбинантного антигена подтверждена в реакциях с коммерческим аналогом белка p27/p25 ВИЧ-1 и с поликлональными антителами к синтетическим пептидам, соответствующим N- и C-концевым участкам белка p27/p25 ВИЧ-1. Показано взаимодействие IgG кроликов, иммунизированных рекомбинантным антигеном NEF, с вирусными антигенами в реакциях непрямой иммунофлуоресценции и нейтрализации. Таким образом, экспериментально обоснована возможность применения рекомбинантного белка NEF в качестве антигена в диагностических и исследовательских целях.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, ВИЧ-1, ген *nef*, рекомбинантный антиген NEF, иммуноферментный анализ, Вестерн-блоттинг, линейный иммуноанализ, метод непрямой иммунофлуоресценции, реакция нейтрализации

Study of Antigenic Properties of Human Immunodeficiency Virus NEF Protein Recombinant Analog

G.I. Alatorseva¹ (alatortseva@gmail.com), M.N. Nosik¹ (mnossik@yandex.ru), L.N. Nesterenko¹ (Innesterenko@pochta.ru),
I.I. Amiantova¹ (amianti@yandex.ru), V.V. Dotsenko¹ (VerraMal@gmail.com), L.N. Luhverchik¹ (lexx294@yandex.by),
M.V. Zhuckina¹ (alatortseva@gmail.com), V.U. Kabargina¹ (v.cabargina@yandex.ru), E.N. Kudryavtseva² (kudravtseva@mail.ru),
V.V. Zverev¹ (vitalyzverev@outlook.com)

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow

²State Budgetary Institution of Public Health of Moscow Region «M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute», Moscow

Abstract

Protein p27/p25 is a product of HIV *nef* gene and is a multifunctional factor of HIV pathogenicity. Antigenic properties of recombinant NEF polypeptide which includes N-terminal fragment of HIV-1 p27 protein fused to *E. coli* β-galactosidase were studied by serological and virological methods. The interaction was shown between recombinant NEF antigen and sera of HIV-positive individuals by ELISA, Western blot and line immunoassay. There was no interaction with sera of healthy individuals. The antigen specificity of recombinant antigen was shown in the reactions with commercial HIV-1 p27/p25 protein analog and with polyclonal antibodies to synthetic peptides corresponding to N-, C-terminal regions of HIV-1 p27/p25 protein. The interaction between IgG of rabbits immunized with recombinant NEF antigen and viral antigens was shown by indirect immunofluorescence and neutralizing assays. Thus it was proven the possibility of using recombinant NEF protein as an antigen for diagnostic and experimental purposes.

Key words: Human Immunodeficiency Virus; HIV-1, *nef* gene; glycoprotein G; recombinant NEF antigen; enzyme immunoassay; Western blot; line immunoassay; indirect immunofluorescence; neutralizing assay

Введение

Основным лабораторным диагностическим показателем ВИЧ-инфекции является выявление специфических антител методом ИФА и иммуноблоттинга. В известных к настоящему времени диагностических тест-системах в качестве анти-

генной основы присутствуют вирусный лизат, рекомбинантные белки или синтетические пептиды. Одним из преимуществ применения рекомбинантных антигенов является возможность использования минорных вирусных белков в количествах, которые не могут быть представлены в препаратах

вирусного лизата. При наличии положительной реакции только с одним из белков оболочки вируса (gp160, gp120 или gp41) даже в сочетании с реакцией с другими белками, результат исследования считается сомнительным [1]. В этой ситуации введение в реакцию дополнительных антигенов может сделать интерпретацию результатов более определенной. В качестве таких антигенов можно рассматривать рекомбинантные белки, содержащие антигенные детерминанты регуляторных белков ВИЧ, в частности, белок p27/p25 – продукт гена *nef*, который по современным представлениям относится к многофункциональным факторам патогенности ВИЧ, обеспечивающим снижение экспрессии CD4 на клеточной поверхности, нарушение активации Т-лимфоцитов и стимуляцию инфекционности ВИЧ. Являясь продуктом раннего гена, белок NEF первым после инфицирования ВИЧ накапливается в клетках в детектируемых количествах [2]. Тем не менее, его содержание в вирусных лизатах является недостаточным для выявления специфических антител тест-системами в форматах ИФА и Вестерн-блоттинга. Возможно, это является следствием расщепления белка вирусной протеазой после его упаковки в вирусные частицы на стадии созревания вириона [3]. Диагностическая значимость этого полипептида, как и других регуляторных белков ВИЧ, изучена недостаточно, однако есть данные о том, что антитела к белку NEF могут обнаруживаться в латентный период развития ВИЧ-инфекции в отсутствие антител к структурным белкам вируса [4, 5].

Изучение антигенных свойств рекомбинантных или синтетических аналогов природных антигенов является основополагающим этапом создания на их основе диагностических тест-систем.

Ранее нами был получен рекомбинантный белок NEF, содержащий слитный с β -галактозидазой *E. coli* фрагмент ($K_4 - P_{122}$) белка p27/p25 ($M_1 - D_{123}$) ВИЧ-1 [7]. Поскольку в области $W_{13} - Y_{114}$ в структуре вирусного белка NEF предположительно присутствует не менее 27 антигенных детерминант [http://www.bioafrica.net/teomics/NEFprot.html, 6], мы полагаем, что полученный нами рекомбинантный белок может сохранять специфическую антигенную активность.

Цель настоящей работы – исследование антигенной специфичности рекомбинантного полипептида NEF с применением серологических, вирусологических и серологических методов.

Материалы и методы

Бактериальные и вирусные штаммы, культуры клеток. Рекомбинантный штамм *E. coli* – продуцент полипептида NEF [7], созданный на основе штамма *E. coli* PLT90 (F, $\text{lon}::\text{Tn10}(\text{Tet}^r)$, endA1 , $\text{malP}_{\text{a}}::[\text{P}_R, \text{C1857}](\text{Mal}^-, \lambda_{\text{imm}})$ *thi*, *hsdR17*) [8]. Штамм ВИЧ-1 и перевиваемая лимфобластная клеточная линия MT-4 из коллекции вирусов ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». Клетки *E. coli*

штамма PLT90, трансформированные векторной плазмидой pEL5a [9].

Иммунореагенты. Поликлональные антитела производства компании Santa Cruz Biotechnology Inc., Канада: IgG коз vC-19 (Кат. № sc-17438), иммунизированных синтетическим пептидом vC-19-P, соответствующим С-концевому участку белка NEF ВИЧ-1; IgG коз vA-19 (Кат. № sc-17437), иммунизированных синтетическим пептидом vA-19-P, соответствующим N-концевому участку белка NEF ВИЧ-1. Слитный с β -галактозидазой *E. coli* рекомбинантный антиген HIV-1 NEF производства компании Prospec-Tany TechnoGene Ltd Inc., Израиль (Кат. № 108HIVNEF01). Рекомбинантные антигены gp41, gp 120, p24, Pol ВИЧ-1, env ВИЧ-1 группы O, gp38 ВИЧ-2 из коллекции рекомбинантных антигенов ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова».

Серологический материал. Образцы сывороток крови ВИЧ-инфицированных лиц и сывороток крови здоровых доноров из ГБУЗ МО «Московского областного НИКИ им. М.Ф. Владимирского». Образцы сывороток пациентов с кишечными патологиями из ФГУ «ГНЦ колопроктологии». Стандартная панель образцов сывороток крови, не содержащих антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигена p24 ВИЧ-1 (ОСО 42028-214-02П).

Выделение и очистка рекомбинантных полипептидов. Ночные культуры клеток *E. coli*, содержащие векторную или рекомбинантную плазмиду, разводили в 100 раз средой LB с 100 мкг/мл ампициллина и выращивали при постоянной аэрации при температуре +30 °С. После достижения культурой оптической плотности 0,5 о.е./мл при $\lambda = 550$ нм экспрессию гибридных генов индуцировали повышением температуры культивирования до +39 °С в течение 2 часов. Клетки разрушали добавлением хлороформа, фракцию телец-включений собирали центрифугированием и обрабатывали ультразвуком в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl pH 8,0 и 10 мМ Na-ЭДТА. Дальнейшую процедуру выделения и очистки проводили по ранее описанному методу [10, 11].

Иммунизация лабораторных животных. Кроликам-самцам породы «Шиншилла» массой 2,5 – 3,0 кг в подколенные лимфатические узлы задних конечностей и подкожно в подушечки стоп задних конечностей вводили по 0,3 мл эмульсии, содержащей 10 мкг/мл рекомбинантного антигена или β -галактозидазы *E. coli* в смеси с полным адьювантом Фрейнда. Через 8 недель проводили повторную иммунизацию путем подкожного введения в каждую конечность по 5 мкг антигена в неполном адьюванте Фрейнда. Подкожные инъекции антигена в физиологическом растворе повторяли с недельным интервалом, контролируя нарастание титра антител методом ИФА. Забор крови производили через 1 неделю после последней иммунизации.

Выделение и очистка фракции IgG из сывороток крови иммунизированных животных. Гамма-глобулиновую фракцию сывороток крови кроликов, им-

мунизированных рекомбинантным полипептидом NEF или β -галактозидазой *E. coli*, и сывороток крови неиммунизированных кроликов осаждали сульфатом аммония. Затем фракцию IgG подвергали дополнительной очистке методами ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе и аффинной хроматографии на сефарозе «Cibacron Blue» [12, 13].

Электрофорез белков в полиакриламидном геле проводили по методу Лэммли [14].

Твердофазный непрямой иммуноферментный метод. Рекомбинантные полипептиды или β -галактозидазу *E. coli* в концентрации 4 мкг/мл в 10 мМ карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,6 сорбировали в лунки 96-луночных полистироловых планшетов (Биомедикал, Россия) в течение 16 часов при температуре +4 °С. Сыворотки разводили в 100 раз в растворе 0,1 М фосфатно-солевого буфера pH 7,5, содержащем 0,1% Твин 20 и лизат культуры *E. coli*, и вносили в лунки планшетов с иммуносорбентом. Связывание антител с рекомбинантным белком выявляли с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена моноклональных антител к IgG человека (Сорбент-Сервис, Россия, Кат. № CH1), антител козы к IgG кролика (Sigma Aldrich, Кат. № 6154) или антител кролика к IgG козы (Calbiochem, Германия, Кат. № 401504) в зависимости от видовой принадлежности исследуемого образца сыворотки или антител. В качестве хромогена использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Конкурентный твердофазный непрямой метод иммуноферментного анализа. Перед внесением в лунки планшета с иммобилизованным рекомбинантным белком NEF- ProSpec-Tany (Prospec-Tany TechnoGene Ltd Inc) или β -галактозидазой *E. coli*, антитела иммунизированных синтетическими пептидами коз разводили в 100 раз в растворе, содержащем рекомбинантный полипептид NEF в разведениях от $1:10^{-1}$ до $1:10^{-5}$, затем по 100 мкл полученных разведений сывороток вносили в лунки планшета с иммуносорбентом и инкубировали при +37 °С в течение 1 часа. Все остальные манипуляции осуществлялись по схеме твердофазного непрямого иммуноферментного анализа.

Вестерн-блоттинг. Иммобилизацию белков на нитроцеллюлозной мембране проводили по ранее описанному методу [15] на оборудовании и по рекомендации компании Bio-Rad, США. Нитроцеллюлозную мембрану с иммобилизованными белками инкубировали в течение 1 часа в блокирующем растворе, содержащем 5% сухого обезжиренного молока в Трис-солевом буфере (20 мМ TrisHCl pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин 80), затем мембрану выдерживали с сывороткой крови человека или с содержащей антитела к рекомбинантному антигену кроличьей сывороткой в 100-кратном разведении в Трис-солевом буфере с добавлением лизата *E. coli* в течение 1 часа при температуре +37 °С. Связывание антител с иммобилизованными белками выявляли с помощью конъюгирован-

ных с пероксидазой хрена моноклональных антител к IgG человека (фирма Сорбент-Сервис, Россия, Кат. № CH1) или антител козы к IgG кролика (Sigma Aldrich, Кат. № 6154) соответственно. В качестве хромогена использовали 3,3'-диаминобензидин или 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Результат учитывали визуально.

Линейный иммуноанализ. На поверхности иммуносорбента – полосок нитроцеллюлозных мембран в виде поперечных линий сорбировали очищенные рекомбинантные полипептиды – аналоги антигенов gp41, gp120, p24, Pol, NEF ВИЧ-1, gp41 ВИЧ-1(0), gp38 ВИЧ-2. В качестве контрольного антигена специфичности реакции использовали β -галактозидазу *E. coli*, в качестве контрольного антигена правильности проведения реакции – IgG козы против IgG человека, в качестве положительного контрольного образца – сыворотку крови человека, содержащую антитела к ВИЧ-1, в качестве отрицательного контрольного образца – сыворотку крови человека, не содержащую антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигена p24 ВИЧ. Анализируемые образцы сывороток крови человека в разведении 1:50 в Трис-солевом буфере с добавлением лизата бактерий *E. coli* инкубировали с иммуносорбентом в течение 2 часов при комнатной температуре. Связывание антител с рекомбинантными белками выявляли с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена моноклональных антител к IgG человека (фирма Сорбент-Сервис, Россия, Кат. № CH1). Все остальные манипуляции проводили по схеме Вестерн-блоттинга.

Вирусы. Клетки линии MT-4 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров и 100 мкг/мл гентамицина. Жизнеспособность клеток определяли подсчетом количества живых и погибших клеток после их окрашивания 0,1% раствором трипанового синего. Доза заражения вирусом составила 0,001 ТЦИД₅₀/кл. Применялось 2 схемы инфицирования клеток в присутствии препаратов антител: препарат + вирус, контакт 30 мин + клетки (схема № 1) и препарат + клетки, контакт 30 мин + вирус (схема № 2).

Реакция непрямой иммунофлуоресценции. Реакцию непрямой иммунофлуоресценции для определения клеток, экспрессирующих антигены ВИЧ-1, проводили по стандартной методике [16], с использованием набора моноклональных антител к антигенам ВИЧ-1 (ГУ НИИ иммунологии МЗ РФ), которые в комплексе с фрагментами овечьих антител к Ig мыши, конъюгированными с ФИТЦ, давали специфическое свечение.

Реакция нейтрализации. Реакцию проводили по стандартной методике, утвержденной ВОЗ [17]. Результаты опыта оценивали на 5 – 6-е сутки после инфицирования клеток вирусом. Нейтрализующую активность антител оценивали по степени защиты клеток от цитодеструктивного действия вируса и по процентному содержанию клеток, экспрессирующих антигены ВИЧ. Степень защиты клеток от ци-

тодеструктивного действия вируса определяли по формуле:

$$\% \text{ защиты} = \frac{A - B}{K - B} \times 100, \text{ где}$$

A – число жизнеспособных клеток в опыте;

B – то же в инфицированной культуре (контроль вируса);

K – то же в неинфицированной культуре (контроль клеток).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ «OriginPro 8», «Excel».

Результаты и обсуждение

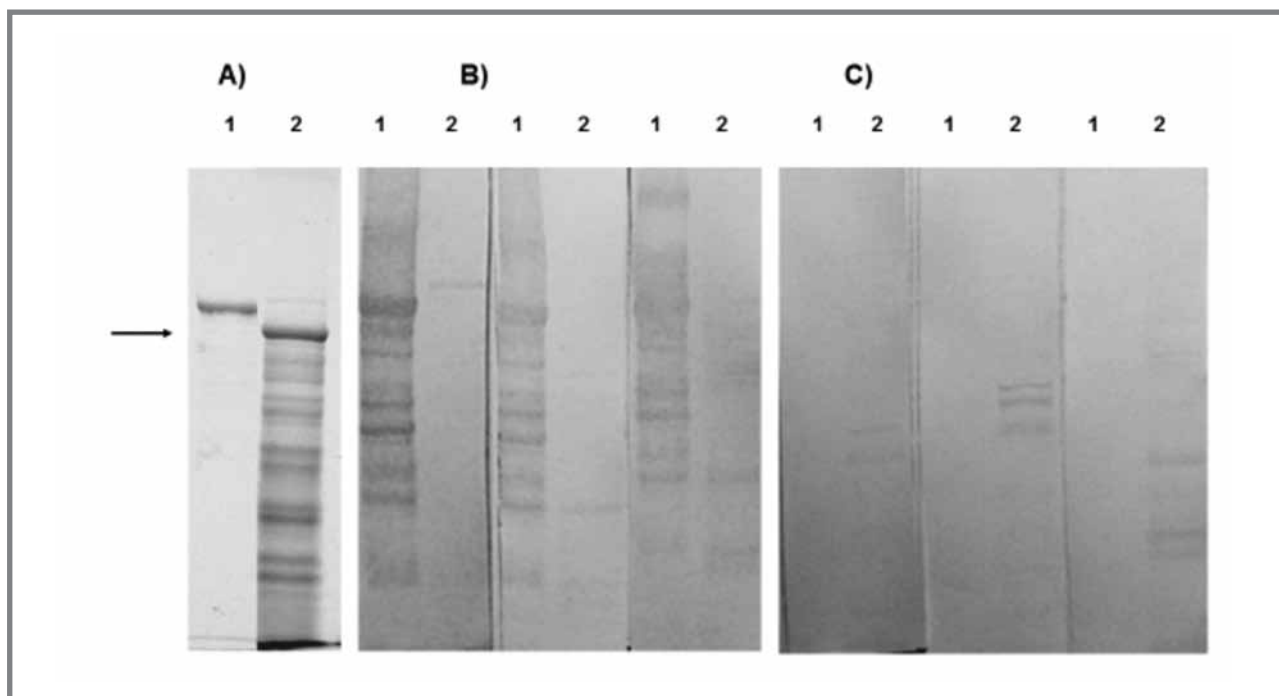
Анализ антигенной специфичности рекомбинантного белка NEF методами ИФА и Вестерн-блоттинга. Первичный анализ антигенной активности рекомбинантного полипептида NEF, содержащего слитный с β-галактозидазой *E. coli* фрагмент ($K_4 - P_{122}$) белка p27/p25 ($M_1 - D_{123}$) ВИЧ-1 [5], проводили с использованием аттестованных в подтверждающих тестах образцов сывороток крови ВИЧ-инфицированных людей. Отобрано 3 образца, взаимодействующих с рекомбинантным полипептидом NEF в иммуноферментном анализе. Методом иммуноблоттинга показано взаимодействие рекомбинантного антигена с этими образцами на нитроцеллюлозной мембране с иммобилизованными белками лизата телец включений

из биомассы штамма-продуцента рекомбинантного белка NEF. Окрашивание происходило в зоне соответствующей молекулярной массы и отсутствовало в лизате клеток *E. coli*, трансформированных векторной плазмидой без вставки вирусоспецифической последовательности ДНК; окрашивание в области, соответствующей рекомбинантному белку, в реакциях с сыворотками здоровых людей отсутствовало (рис. 1).

Антигенную специфичность рекомбинантного полипептида NEF исследовали методом ИФА в сравнении с его коммерческим аналогом – рекомбинантным полипептидом NEF-Prospec-Tany. Рекомбинантный полипептид сравнения взаимодействовал с IgG коз к пептидам, соответствующим N-концевому (vA-19) и C-концевому (vC-19) участкам вирусного белка p27/p25. β-галактозидаза *E. coli* и рекомбинантный белок gp41 ВИЧ-1 не реагировали с антителами к vA-19 и vC-19. В конкурентном ИФА рекомбинантный полипептид NEF полностью подавлял взаимодействие антител к vA-19 и vC-19 с рекомбинантным полипептидом HIV-1 NEF-Prospec-Tany (рис. 2). Таким образом, в реакциях с коммерческим аналогом показана высокая специфичность взаимодействия рекомбинантного полипептида NEF с антителами к синтетическим пептидам, соответствующим N- и C-концевым фрагментам вирусного антигена.

Исследование вирусологическими методами. Для последующего изучения иммунореактив-

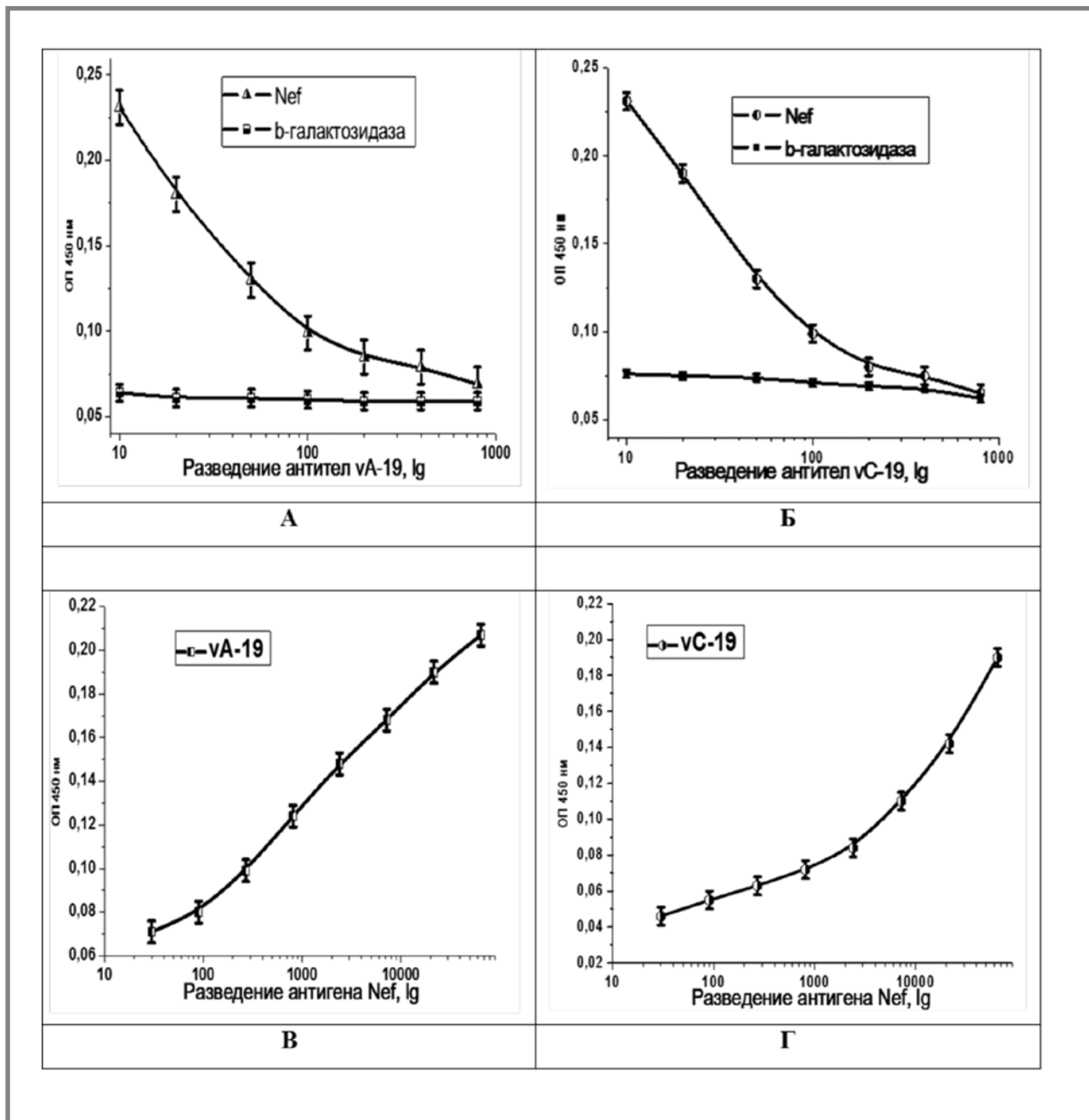
Рисунок 1.
Электрофорез в 10% SDS-полиакриламидном геле (A) и Вестерн-блоттинг с положительными (B) и отрицательными (C) сыворотками



Примечание: 1. лизат телец включений, содержащих рекомбинантный белок NEF,
2. лизат клеток *E. coli* PLT90, трансформированных векторной плазмидой pEL5a.
Стрелкой отмечено положение β-галактозидазы *E. coli*

Рисунок 2.

Иммуноферментный анализ с рекомбинантными антигенами: взаимодействие антител vA-19 (А) и vC-19 (Б) с рекомбинантным полипептидом NEF-ProSpec-Tapu и β -галактозидазой *E. coli*; подавление рекомбинантным полипептидом NEF взаимодействия рекомбинантного полипептида NEF-ProSpec-Tapu с антителами vA-19 в разведении 1:20 (В) и антителами vC-19 в разведении 1:10 (Г)



ности белка NEF в зараженной ВИЧ-1 культуре клеток получены гипериммунные сыворотки крови кроликов к рекомбинантному белку NEF и β -галактозидазе *E. coli*. Подобраны разведения лизата *E. coli*, при которых кроличья сыворотка к β -галактозидазе *E. coli* не взаимодействует с рекомбинантным антигеном NEF, а кроличья сыворотка к белку NEF не дает положительной реакции с β -галактозидазой в ИФА и Вестерн-блоттинге. Титры иммунных сывороток, определенные методом ИФА в реакциях с гомологичными антигенами, составили $1:10^5$. Не выявлено взаимодействия сывороток крови неиммунизированных кроликов

с рекомбинантным полипептидом NEF. Из гипериммунных кроличьих сывороток к белку NEF и β -галактозидазе *E. coli* хроматографически очищены фракции специфических IgG. Полученные препараты антител взаимодействовали с гомологичными антигенами в ИФА и Вестерн-блоттинге.

Исследование цитотоксического действия препаратов кроличьих антител к рекомбинантному белку NEF и β -галактозидазе *E. coli* в различных концентрациях на неинфицированной культуре клеток показало, что данные препараты в разведении 1:10 не обладают токсичностью (табл. 1). Результаты изучения нейтрализующей активности

антител на культуре клеток МТ-4, инфицированной ВИЧ-1, представлены в таблице 2. Подавление инфекционной активности ВИЧ наблюдалось при разведении 1:320 препарата антител к рекомбинантному белку NEF. При этом степень защиты клеток от цитотоксического действия вируса при схемах инфицирования № 1 и № 2 составила 92,3 и 92,5% соответственно. При инфицировании по схеме № 2 антитела к рекомбинантному белку обладали несколько более выраженной вируснейтрализующей активностью в более высоких разведениях (1:1280), а при разведениях от 1:10 до 1:40 степень защиты инфицированных клеток, соответствующая жизнеспособности неинфицированных клеток, наблюдалась при инфицировании по схеме № 1 (рис. 3). Снижение защитного эффекта в культуре инфицированных клеток в разведениях 1:640 и 1:1280 проявлялось в виде характерных цитодеструктивных изменений и образовании синцитиев, свидетельствующих об активной репликации ви-

руса (рис. 2). Антитела к β -галактозидазе *E. coli* не оказывали подавляющего действия на репликацию вируса. Для изучения методом иммунофлуоресценции взаимодействия антител к рекомбинантному белку NEF с вирусным антигеном была выбрана схема инфицирования № 2, так как при ее использовании наблюдались более выраженные изменения в жизнеспособности клеток в зависимости от разведения антител. При разведении антител 1:640 наличие клеток, экспрессирующих вирусный антиген, обнаруживалось в виде специфического свечения, что подтверждало репликацию вируса. При разведении антител 1:160 уровень свечения был близок к наблюдаемому в неинфицированной культуре клеток, что соответствовало подавлению экспрессии вирусных антигенов в реакции нейтрализации (табл. 3, рис. 4). В присутствии антител к β -галактозидазе *E. coli* в инфицированной культуре клеток флуоресценция не превышала уровня фона (рис. 4, Б)

Таблица 1.

Исследование цитотоксичности антител к рекомбинантному антигену NEF и антител к β -галактозидазе *E. coli* на неинфицированной культуре клеток МТ-4

Разведение антител	Количество жизнеспособных клеток МТ-4, %		
	Антитела к рекомбинантному белку NEF	Антитела к β -галактозидазе	Контроль клеток (без добавления антител)
1: 10	100,0	100,0	100,0
1: 20	100,0	100,0	100,0
1: 40	99,8	99,7	100,0
1: 80	100,0	100,0	99,7
1: 160	99,7	100,0	100,0

Примечание: представлены результаты 3-х независимых опытов; в каждом опыте среднее значение бралось по 3-м лункам; $\leq 0,05$

Таблица 2.

Исследование вируснейтрализующей активности антител к рекомбинантному антигену NEF на инфицированной ВИЧ-1 культуре клеток МТ-4

Разведение антител	Защита клеток, %	
	Схема № 1 «препарат + вирус, контакт 30 мин + клетки»	Схема № 2 «препарат + клетки, контакт 30 мин + вирус»
1: 10	95,6	89
1: 20	95,9	80
1: 40	100	100
1: 80	82,7	75,7
1: 160	82,7	100
1: 320	82,3	92,5
1: 640	75,4	77,1
1: 1280	68,1	77,9
Контроль клеток*	99,0	
Контроль вируса**	46,5	

Примечание: *контроль клеток – неинфицированная культура клеток МТ-4;

**контроль вируса – инфицированная ВИЧ-1 культура клеток МТ-4 без добавления антител.

Представлены результаты 3-х независимых опытов; в каждом опыте среднее значение бралось по 3-м лункам; $p \leq 0,05$.

Рисунок 3.

Ракция нейтрализации с антителами к рекомбинантному белку NEF:

А) – неинфицированная культура клеток; Б) – культура клеток, инфицированная ВИЧ-1 без добавления антител; В) – культура клеток, инфицированная по схеме № 2 (разведение антител 1:640); Г) – культура клеток, инфицированная по схеме № 2 (разведение антител 1:40)

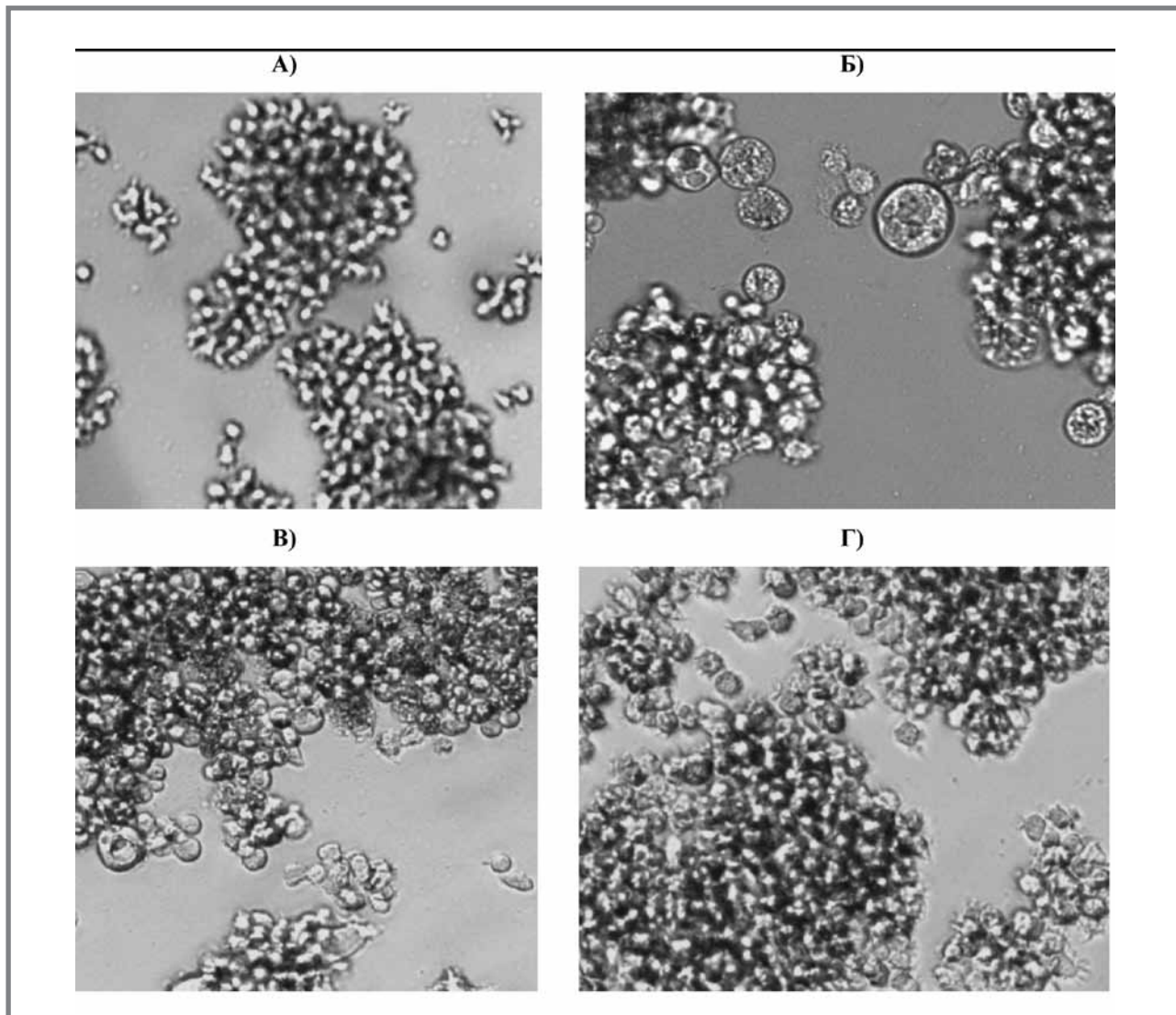


Таблица 3.

Процентное содержание клеток, экспрессирующих антиген ВИЧ-1, при обработке антителами к белку NEF

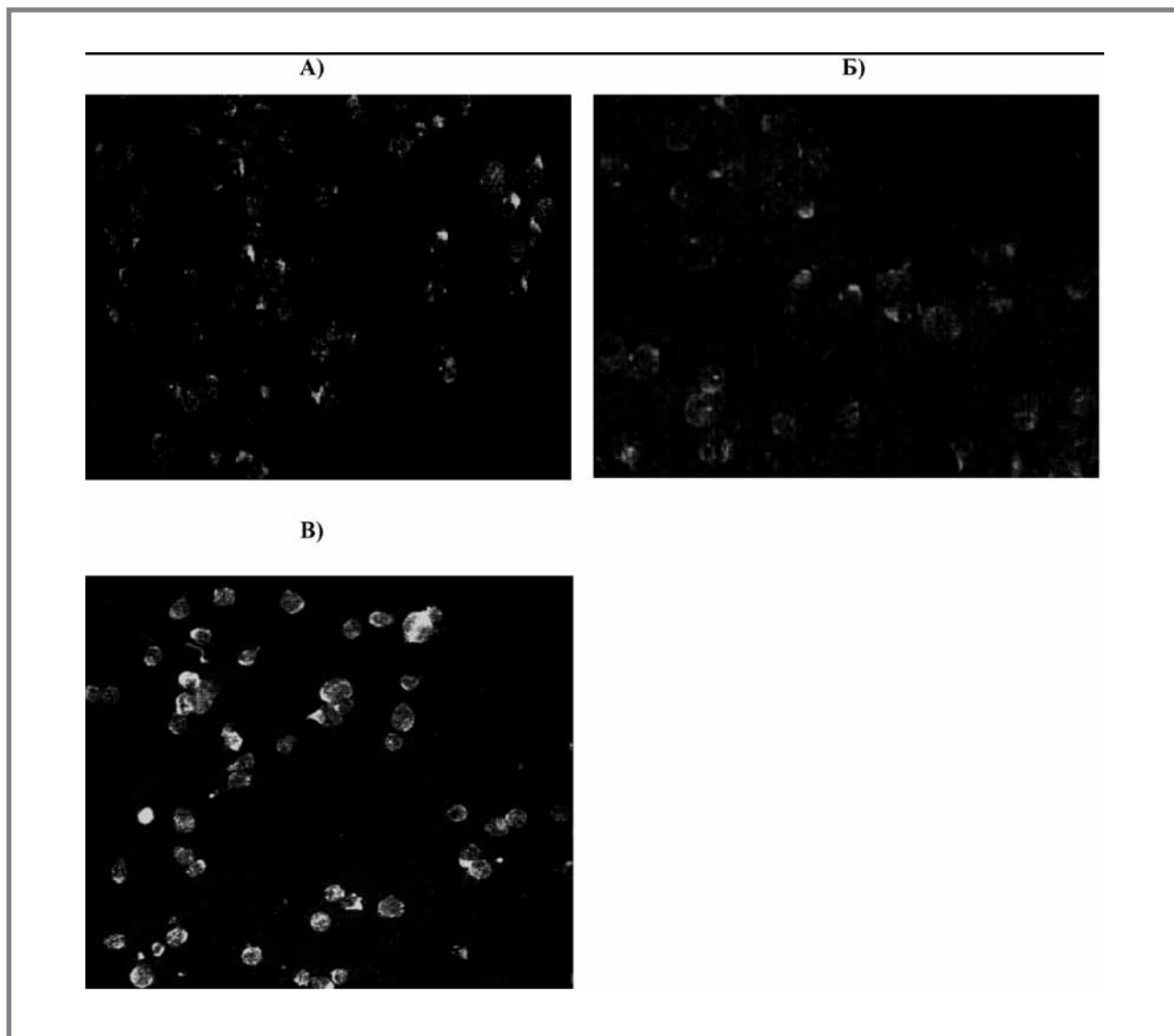
Разведение	Количество клеток, экспрессирующих антиген (схема № 2), %
1:10	0
1:20	0
1:40	0
1:80	0
1:160	0
1:320	30
1:640	75
1:1280	100
Контроль клеток*	0
Контроль вируса**	100

Примечание: *контроль клеток – неинфицированная культура клеток МТ-4;

**контроль вируса – инфицированная ВИЧ-1 культура клеток МТ-4 без добавления антител.

Рисунок 4.

Реакция непрямой иммунофлуоресценции с антителами к рекомбинантному антигену NEF на культуре клеток MT-4: А) не инфицированной ВИЧ-1, разведение антител к белку NEF 1:10; Б) инфицированной ВИЧ-1, разведение антител к β -галактозидазе *E. coli* 1:10; В) инфицированной ВИЧ-1, разведение антител к белку NEF 1:640.



Таким образом, с помощью вирусологических методов показано взаимодействие антител, полученных к рекомбинантному антигену NEF, с вирусным антигеном. В научной литературе имеется много данных по исследованию вируснейтрализующих свойств антител, выделенных из сывороток крови животных, иммунизированных оболочечными белками ВИЧ-1 [18]. Есть также данные о комплемент-опосредованном цитотоксическом действии на клетки, зараженные ВИЧ-1, мышиных антител к синтетическому пептиду, соответствующему фрагменту $Y_{81} - D_{123}$ белка p27/p25 ВИЧ-1 [19]. Показанное в данной работе в целом более эффективное подавление репликации вируса при заражении по схеме № 1 («препарат + вирус, контакт 30 мин + клетки») позволяет предположить, что предварительный контакт антител с вирусом облегчает их проникновение в клетку.

Высокая специфичность взаимодействия антител, выделенных из гипериммунных сывороток

к рекомбинантному антигену, с клетками культуры, инфицированной ВИЧ-1, подчеркивает подобие антигенных детерминант рекомбинантного антигена NEF и натурального вирусного белка p27/p25. По-видимому, ответственные за это взаимодействие эпитопы являются конформационно стабильными и представлены линейной структурой как в составе вирусного белка, так и в составе его рекомбинантного аналога, так как методы выделения рекомбинантных белков, накапливающихся в составе телец-включений в биомассах штаммов-продуцентов *E. coli*, включают обработку денатурирующими агентами. Подавление цитопатического действия вируса и экспрессии вирусных антигенов в присутствии антител к белку NEF позволяет также предположить, что в составе исследуемого рекомбинантного антигена воспроизведены консервативные домены, ответственные за участие белка p27/p25 в репликации вируса.

Тестирование клинических образцов. Оценку диагностической значимости рекомбинантного антигена NEF при выявлении IgG к ВИЧ-1 проводили методами линейного иммуноанализа и ИФА с использованием сывороток 316 пациентов с лабораторно подтвержденной ВИЧ-инфекцией. IgG к белку NEF методом ИФА с последующим подтверждением методом линейного иммуноанализа были обнаружены в 95 (30%) исследованных образцах ВИЧ-инфицированных пациентов. Частота обнаружения антител к различным комбинациям рекомбинантных белков Env, Gag, Pol ВИЧ-1, Env ВИЧ-1 группы 0, Env ВИЧ-2 в NEF-позитивных образцах сывороток составила от 1,0 до 90,5% (табл. 4). Все образцы, выявляемые как позитивные по отношению к рекомбинантному антигену NEF, содержали антитела к рекомбинантным антигенам gp41 и gp120 ВИЧ-1 (рис. 5), то есть по современным критериям являлись ВИЧ-позитивными [1].

В качестве группы сравнения исследовали сыворотки крови 65 больных кишечными патологиями без ВИЧ-инфекции. Кроме того, в качестве отрицательных образцов использовали сыворотки стандартной панели ГИСК (ОСО 42028-214-02П), не содержащие антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антигену p24 ВИЧ-1, и сыворотки крови 32 здоровых доноров. Не выявлено антител к рекомбинантному антигену NEF в образцах стандартной панели и в сыворотках крови пациентов из групп сравнения.

Поскольку исследуемый полипептид является гибридным белком, содержащим в своем составе β -галактозидазу *E. coli*, изучено взаимодействие NEF-позитивных и NEF-негативных сывороток с β -галактозидазой. В ИФА с β -галактозидазой значения оптической плотности не превышали порогового значения, а в линейном иммуноанализе отсутствовало окрашивание в области соответствующей полосы (рис. 5).

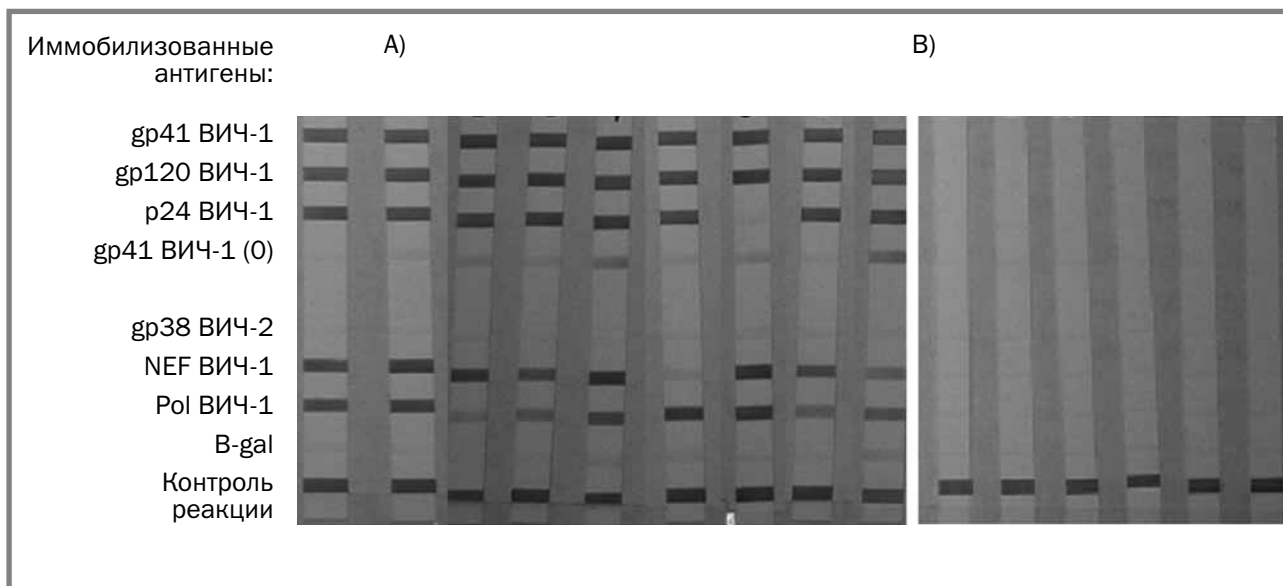
Таблица 4.

Частота обнаружения антител к индивидуальным антигенам ВИЧ в NEF-позитивных образцах сывороток крови (n = 95)

Наименование антигенов	Количество позитивных реакций	
	Абс.	%
gp120, gp41, p24, Pol ВИЧ-1	86	90,5
gp120, gp41, p24, Pol ВИЧ-1, Env ВИЧ-1 группы 0	42	44,2
gp120, gp41, p24, Pol ВИЧ-1, Env ВИЧ-1 группы 0, gp38 ВИЧ-2	7	7,4
gp120, gp41, p24 ВИЧ-1, Env ВИЧ-1 группы 0	3	3,2
gp120, gp41, p24 ВИЧ-1	3	3,2
gp120, gp41, p24, Pol ВИЧ-1, gp38 ВИЧ-2	2	2,1
gp120, gp41, Pol ВИЧ-1	2	2,1
gp120, gp41, Pol, ВИЧ-1, Env ВИЧ-1 группы 0	1	1,0

Рисунок 5.

Линейный иммуноанализ с положительными (А) и отрицательными (Б) сыворотками



По мнению ряда авторов, присутствие антител к белку р27/р25 является потенциальным прогностическим маркером развития ВИЧ-инфекции [20, 21]. Разная частота обнаружения антител к определенным комбинациям рекомбинантных аналогов белков ВИЧ возможно связана с особенностями формирования гуморального иммунитета к индивидуальным антигенам ВИЧ на определенной стадии развития заболевания.

Так как полипептид, содержащий антигенные детерминанты белка р27/р25, является одним из компонентов некоторых разрабатываемых вакцин против ВИЧ-инфекции [22], определение специфических антител к данному белку может найти применение не только для диагностики и оценки иммунного статуса при ВИЧ-инфекции, но и для изучения эффективности вакцинации.

Выводы

1. В работе экспериментально обоснована возможность применения рекомбинантного поли-

пептида NEF для детекции антител к белку р25/р27 ВИЧ-1.

2. Учитывая низкое содержание данного антигена в препаратах нативного вируса, использование его рекомбинантного аналога является перспективным при создании диагностических тест-систем, при отборе и анализе различных биоматериалов (гипериммунных сывороток, моноклональных антител и т.д.), а также в решении исследовательских и прикладных задач.
3. Целесообразным представляется использование рекомбинантного антигена NEF для изучения формирования гуморального иммунного ответа на отдельные антигены ВИЧ с целью прогнозирования развития ВИЧ-инфекции.
4. Определение специфических антител к белку NEF может найти применение при изучении эффективности вакцинации и закономерностей формирования поствакцинального иммунитета.

Литература

1. Методическое письмо № 4174-PX от 04.08.2006 г. Проведение лабораторного обследования на ВИЧ-инфекцию (в том числе исследование иммунитета и вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции): 1 – 19.
2. Kim S.Y., Byrn R., Groopman J., Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: Evidence for differential gene expression. J. Virol. 1989. 63: 3708 – 3713.
3. Pandori M.W., Fitch N.J., Craig H.M., Richman D.D., Spina C.A., Guatelli J.C.. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. J. Virol. 1996. 70: 4283 – 4290.
4. Wieland U., K hn J.E., Jassoy C., R bsamen-Waigmann H., Wolber V., Braun R. Antibodies to recombinant HIV-1 NEF, tat, and nef proteins in human sera. Medical Microbiology and Immunology. 1990. 179. 1: 1 – 11.
5. O'Neil C., Lee D., Clewley G., Johnson M.A., Emery V.C. Prevalence of anti-NEF antibodies in HIV-1 infected individuals assessed using recombinant baculovirus expressed NEF protein. J. Med. Virol. 1997: 139 – 44.
6. Frahma N., Lindea C., Brander C. Identification of HIV-Derived, HLA Class I Restricted CTL Epitopes: Insights into TCR Repertoire, CTL Escape and Viral Fitness. HIV Molecular Immunology. 2006: 3 – 28.
7. Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Волинская Е.А., Амиантова И.И., Кабаргина В.Ю., Жукина М.В. и др. Получение рекомбинантного полипептида, содержащего антигенные детерминанты белка nef ВИЧ-1 и его применение для диагностики ВИЧ-инфекции методом линейного иммуноблоттинга. Труды XI Международного конгресса «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии». Российский аллергологический журнал. 2011. 4 (1): 12 – 14.
8. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ. 1992. № 2043409 на изобретение «Штамм бактерий *Escherichia coli*, используемый для получения рекомбинантных белков».
9. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ. 1992. № 2071501 на изобретение «Вектор pEL5a, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК».
10. Новое в клонировании ДНК. Методы. Ред. Гловер Д., Москва, 1989: 122 – 128.
11. Sameh Magdeldin and Annette Moser. Affinity Chromatography: Principles and Applications, Affinity Chromatography. Ed.: S. Magdeldin. In Tech. 2012: 70 – 75.
12. Virca G.D., Travis J., Hall P.K., Roberts R.C. Purification of γ -2-Macroglobulin by Chromatography on Cibacron Blue Sepharose. Analytical Biochemistry. 1978. 8: 274 – 276.
13. Rattana Wongchuphan, Beng Ti Tey, Wen Siang Tan, Senthil Kumar Subramanian, Farah Saleena Taip, Tau Chuan Ling. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G using anion exchangers. Process Biochemistry 2011. 46: 101 – 107.
14. Практическая химия белка. А. Дарбре, ред. Пер. с англ. Москва. 1989: 1 – 621.
15. Towbin H., Staehlin T., Gordon Y. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. nat. Acad. Sci. USA. 1979; 76: 4350 – 4359.
16. Носик М.Н., Рыжов К.А., Киселева И.А., Кравченко А.В., Покровский В.В. Биологические свойства штаммов вируса иммунодефицита человека, выделенных от ВИЧ-инфицированных лиц на территории России за 2009-2010 гг. ЗНИСО. 2011; 4 (217): 31 – 34.
17. End point neutralization assay. WHO Guidelines for Standard HIV Isolation Procedures 1994, 1998 update.
18. McCoy L.E., Weiss R.A. Neutralizing antibodies to HIV-1 induced by immunization. J. Exp. Med. 2013; 210 (2): 209 – 223.
19. Pleguezuelos O., Stloff G.A., Caparr s-Wanderley W. Synthetic immunotherapy induces HIV virus specific Th1 cytotoxic response and death of an HIV-1 infected human cell line through classic complement activation. Virology Journal. 2013; 10: 107 – 120.
20. Chen Y.M., Lin R.H., Lee C.M., Fu C.Y., Chen S.C., Syu W.J. Decreasing levels of anti-Nef antibody correlate with increasing HIV type 1 viral loads and AIDS disease progression. AIDS Res. Hum Retroviruses. 1999; 15 (1): 43 – 50.
21. Duri K., M ller F., Gumbo F.Z., Kurewa N.E., Rusakaniko S., Chirenje M.Z. et al. Human immunodeficiency virus (HIV) types Western blot (WB) band profiles as potential surrogate markers of HIV disease progression and predictors of vertical transmission in a cohort of infected but antiretroviral therapy naïve pregnant women in Harare, Zimbabwe. BMC Infect. Dis. 2011; 11: 7.
22. Opendra Narayan, Zhenqian Liu. HIV DNA vaccine composition and methods of use. Patent USA. 2011. № 8,003,113 B2.

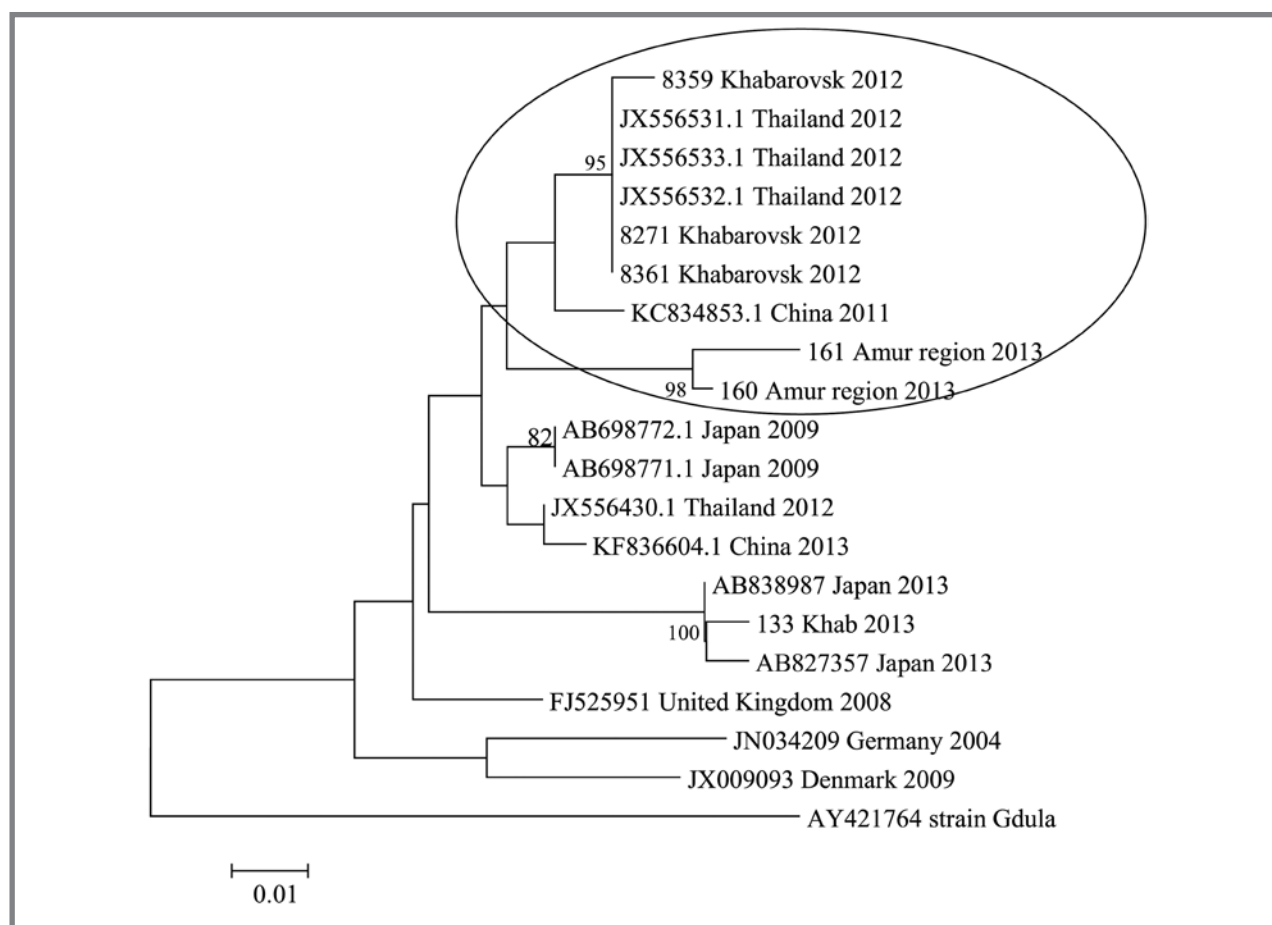
References

1. Methodological letter No. 4174-PX dated 04.08.2006. Laboratory testing for HIV infection (including the study of immunity and viral load in HIV infection): 1 – 19 (in Russia).
2. Kim S.Y., Byrn R., Groopman J., Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: Evidence for differential gene expression. J. Virol. 1989. 63: 3708 – 3713.
3. Pandori M.W., Fitch N.J., Craig H.M., Richman D.D., Spina C.A., Guatelli J.C.. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. J. Virol. 1996. 70: 4283 – 4290.
4. Wieland U., K hn J.E., Jassoy C., R bsamen-Waigmann H., Wolber V., Braun R. Antibodies to recombinant HIV-1 NEF, tat, and nef proteins in human sera. Medical Microbiology and Immunology. 1990. 179. 1: 1 – 11.

5. O'Neil C., Lee D., Clewley G., Johnson M.A., Emery V.C. Prevalence of anti-NEF antibodies in HIV-1 infected individuals assessed using recombinant baculovirus expressed NEF protein. J. Med. Virol. 1997: 139 – 44.
6. Frahma N., Linde C., Brander C. Identification of HIV-Derived, HLA Class I Restricted CTL Epitopes: Insights into TCR Repertoire, CTL Escape and Viral Fitness. HIV Molecular Immunology. 2006: 3 – 28.
7. Alatortseva G.I., Nesterenko L.N., Volynskaya E.A., Amiantova I.I., Kabargina V.Y., Zukina M.V., Dotsenko V.V., Kudryavtseva E.N., Chartchenko O.S., Goltsov V.A., Zverev V.V. Production of recombinant polypeptide containing antigenic determinants of HIV-1 nef protein and its application for diagnosis of HIV infection by the line blot. Proceedings of the XI international Congress on modern problems of allergology, immunology and immunopharmacology. Russian Allergology J. 2011. 1 (4): 12 – 14 (in Russia).
8. Alatortsev V.E., Alatortseva G.I. Strain of bacterium Escherichia coli used for recombinant proteins preparing. Patent RF, № 2043409; 1995 (in Russian).
9. Alatortsev V.E., Alatortseva G.I. Vector pGL5a designated for foreign DNA expression. Patent RF, № 2071501; 1992 (in Russian).
10. News in DNA cloning. A practical approach. Ed. Glover D.M. Moscow, 1989: 122 – 128 (in Russian).
11. Sameh Magdeldin and Annette Moser. Affinity Chromatography: Principles and Applications, Affinity Chromatography. Ed.: S. Magdeldin. In Tech. 2012: 70 – 75.
12. Virca G.D., Travis J., Hall P.K., Roberts R.C. Purification of γ -2-Macroglobulin by Chromatography on Cibacron Blue Sepharose. Analytical Biochemistry. 1978. 8: 274 – 276.
13. Rattana Wongchuphan, Beng Ti Tey, Wen Siang Tan, Senthil Kumar Subramanian, Farah Saleena Taip, Tau Chuan Ling. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G using anion exchangers. Process Biochemistry 2011. 46: 101 – 107.
14. Practical Protein Chemistry. A Handbook. Ed.: A. Darbre. Moscow, 1989: 1 – 621 (in Russian).
15. Towbin H., Staehlin T., Gordon Y. Proc. nat. Acad. Sci. USA. 1979; 76: 4350 – 4359.
16. Nosik M.N., Ryzhov K.A., Kiseleva I.A., Kravtchenko A.V., Pokrovsky V.V. Biological properties of Human Immunodeficiency Virus strains isolated from HIV-infected individuals living in the territory of Russia over period of 2009-2010 year. ZhiSO. 2011; 4 (217): 31 – 34 (in Russia).
17. End point neutralization assay. WHO Guidelines for Standard HIV Isolation Procedures 1994, 1998 update.
18. McCoy L.E., Weiss R.A. Neutralizing antibodies to HIV-1 induced by immunization. J. Exp. Med. 2013; 210 (2): 209 – 223.
19. Pleguezuelos O., Stoll G.A., Caparr s-Wanderley W. Synthetic immunotherapy induces HIV virus specific Th1 cytotoxic response and death of an HIV-1 infected human cell line through classic complement activation. Virology Journal. 2013; 10: 107 – 120.
20. Chen Y.M., Lin R.H., Lee C.M., Fu C.Y., Chen S.C., Syu W.J. Decreasing levels of anti-Nef antibody correlate with increasing HIV type 1 viral loads and AIDS disease progression. AIDS Res. Hum Retroviruses. 1999; 15 (1): 43 – 50.
21. Duri K., Miller F., Gumbo F.Z., Kurewa N.E., Rusakaniko S., Chirenje M.Z. et al. Human immunodeficiency virus (HIV) types Western blot (WB) band profiles as potential surrogate markers of HIV disease progression and predictors of vertical transmission in a cohort of infected but antiretroviral therapy naïve pregnant women in Harare, Zimbabwe. BMC Infect. Dis. 2011; 11: 7.
22. Opendra Narayan, Zhenqian Liu. HIV DNA vaccine composition and methods of use. Patent USA. 2011. № 8,003,113 B2.

ERRATA

На странице 46 № 2 (87) журнала рисунок 3 «**Филогенетические взаимоотношения штаммов Коксаки А6, выделенных в г. Райчихинске Амурской области в 2013 году**» должен выглядеть следующим образом:



На странице 93 № 2 (87) журнал в Резюме на английском языке искажена фамилия автора Курильщикова, должно быть Kuril'schikov. Редакция приносит глубокие извинения за допущенные ошибки.