

Разработка диагностической тест-системы, основанной на методе поляризационного флюоресцентного иммуноанализа, для выявления антител к нуклеокапсидному белку вируса гепатита С

¹ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва;

²ГБУЗ Москвы НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения Москвы

При помощи поляризационного флюоресцентного иммуноанализа (ПФИА) изучена антигенная активность синтетических флюоресцентно-меченных пептидов, перекрывающих иммунореактивные участки из аминокислотных остатков (а. о.) 7–19, 20–34 из N-концевой части и а. о. 73–85 из центральной области нуклеокапсидного белка вируса гепатита С (ВГС). На основе данных пептидов разработана ПФИА-тест-система для выявления антител к нуклеокапсидному белку ВГС. Проведено сравнительное изучение аналитических характеристик ПФИА-тест-системы и коммерческой иммуноферментной тест-системы для выявления анти-ВГС. Исследования показали, что разработанный метод обладает 85% чувствительностью и высокой специфичностью относительно тест-системы сравнения. Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности применения метода ПФИА для определения антител к нуклеокапсидному белку ВГС в клинических образцах сывороток крови.

Ключевые слова: *вирус гепатита С, нуклеокапсидный белок, эпитопы, синтетические пептиды, метод поляризационного флюоресцентного иммуноанализа*

Development of Diagnostic Test System Based on Fluorescent Polarization Immunoassay Method for Detection of Antibodies to HCV Nucleocapsid Protein

A. A. Sharyshev¹, A. I. Bazhenov², V. A. Shibnev¹

¹ Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia;

² Sklifosovsky Institute of Emergency First Aid, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

The antigen activity of the synthetic fluorescently labeled peptides, overlapping immunoresponsive epitops a.a. 7-19, 20-34 from N-end part and a.a. 73-85 from the central area of the nucleocapsid protein of C hepatitis virus, was tested using the method of fluorescent polarization immunoassay (FPIA) with 40 samples of the blood serum of patients with viral C hepatitis. A comparative study of analytic characteristics of FPIA method was performed, based on the application of synthesized peptides, as well as of the commercial ELISA test system (BEST anti-HCV-test 4, Vector Best Ltd.). The performed research revealed that the developed method has a high specificity and sensitivity level. The comparability of summary FPIA results with the commercial ELISA test system was 85%, which evidences the prospects of further research in this direction. The principal possibility of the application of the polarization fluorescent immunoassay for the determination of antibodies to the nucleocapsid protein of the C hepatitis virus in clinical serum samples was demonstrated.

Key words: *HCV virus, HCV nucleocapsid protein, epitops, synthetics peptides, fluorescent polarization immunoassay*

Гепатит С (ГС) является одним из широко распространенных заболеваний печени. Распространенность в мире хронической формы ГС колеблется в пределах от 0,5 до 3%. В России заболеваемость составляет 56,2 на 100 тыс. населения. У каждого пятого больного хроническим ГС развивается цирроз, у каждого двадцатого — рак печени. В связи с тем что вакцины для профилактики ВГС не существует, в настоящее время является актуальной своевременная диагностика этого заболевания. Лабораторная диагностика ГС основана на выявлении в образцах сывороток или плазмы крови человека антител к антигенам ВГС (анти-ВГС) и проводится с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), который имеет ряд ограничений. В последнее время все более актуальной становится разработка экспрессных методов диагностики, среди которых наиболее перспективным является метод поляризационного флюоресцентного иммуноанализа (ПФИА) [14]. ПФИА относится к гомогенным методам анализа и поэтому по сравнению с повсеместно при-

меняемыми диагностическими ИФА-тест-системами обладает следующими преимуществами:

- не требуется разделение свободной и связанной фракций антигена (отсутствуют стадии отмывки);
- анализ выполняется одностадийно;
- реакция антиген–антитело протекает в растворе, что сокращает время, необходимое для достижения равновесия системы,

Таким образом, анализ методом ПФИА занимает несколько минут, не требует дополнительных стадий промывок и инкубаций.

В настоящей работе проведен поиск флюоресцентно-меченных пептидных последовательностей, наиболее полно отражающих антигенную структуру нуклеокапсидного белка ВГС. Отобранные по результатам поиска пептиды использовали в составе ПФИА-тест-системы, основанной на взаимодействии флюоресцентно-меченных, иммунореактивных В-эпитопов нуклеокапсидного белка ВГС со специфическими анти-ВГС.

Материалы и методы

Таблица 1

Физические основы метода ПФИА. Метод ПФИА широко вошел в современную практику биохимических исследований после выхода работы G. Weber [13] и предложения W. Dandliker и G. Feigen использовать ПФИА в иммунохимических исследованиях [2]. Поляризацию флюоресценции используют для изучения взаимодействия друг с другом сильно различающихся по размерам молекул [12], например антиген-антитело [9].

Явление поляризации флюоресценции обусловлено двумя одновременно протекающими процессами: броуновским движением молекул и поглощением и испусканием ими плоско поляризованного света. Маленькие флюоресцентные молекулы в водной среде вращаются очень быстро и между поглощением и эмиссией равновероятно принимают любую ориентацию в пространстве, что приводит к полной деполаризации испускаемого света. Если такие молекулы ассоциированы в высокомолекулярный комплекс, степень поляризации флюоресценции будет возрастать, так как большие молекулы и при эмиссии частично сохраняют ту же молекулярную ориентацию, которую имели при поглощении плоско поляризованного света, поэтому их флюоресценция поляризована. Эти процессы иллюстрирует рисунок.

Если синтетически сконструировать флюоресцентно-меченный пептид, аналогичный эпитопу вируса ГС, вызывающему выработку специфических анти-ВГС-антител у инфицированных пациентов, при добавлении флюоресцентно-меченного пептида к сыворотке крови больного по возрастанию поляризации флюоресценции можно детектировать образование антиген-антительного комплекса, а значит и диагностировать вирусный ГС. Данный принцип является основой для разрабатываемой ПФИА диагностической тест-системы.

Вирус гепатита С. Вирусный геном ГС, представленный односпиральной (+) РНК, кодирует полипротеинпредшественник размером около 3000 аминокислотных остатков (а. о.), посттрансляционный процессинг которого приводит к образованию ряда структурных и неструктурных белков [6]. Нуклеокапсидный белок ВГС (НСV-core), ограниченный а. о. 1-192, является одним из наиболее консервативных [6] и иммуногенных в составе вируса и вызывает появление в крови специфических антител уже в ранних стадиях инфекции [1, 5]. Определение антител к нуклеокапсидному белку (анти-НСV-core-антител) лежит в основе скрининговых тестов для диагностики инфекции [5], базирующихся на рекомбинантных

Аминокислотные последовательности синтезированных пептидов

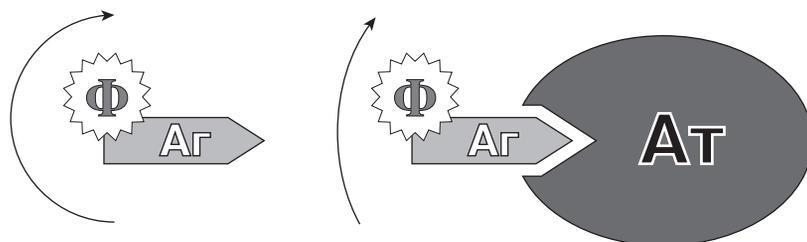
Пептид №	Аминокислотная последовательность	Район белка, а. о.
1	FAM-RPQDVKFPGG	17-27
2	FAM-RPQDVKFPGGGQIVGGV	17-34
3	FAM-PGYWPL	79-85
4	FAM-AQPGYPWPL	77-85
5	FAM-TWAQPGYPWPL	75-85

и (или) синтетических антигенах [8, 15]. Согласно современным данным по исследованию антигенной структуры НCV-core-белка, основные иммунореактивные В-эпитопы локализуются в N-концевой части [3, 4, 10, 11], высокой антигенной активностью обладают также эпитопы из центрального региона [17].

Выбор аминокислотных последовательностей. Основываясь на ранее полученных результатах и данных литературы [3, 4, 10, 11, 17], мы решили разрабатывать ПФИА-тест-систему с использованием пептидов, меченных карбоксифлюоресцеином (FAM) с N-конца полипептидной цепи НCV-core-белка. Аминокислотные последовательности пептидов перекрывали иммунореактивные участки а.о. 7-19 и 20-34 из N-концевой части и а.о. 73-85 из центральной области нуклеокапсидного белка вируса ГС (субтип 1b).

Последовательности аминокислот синтетических пептидов соответствовали нуклеотидной последовательности генома изолята ВГС (субтип 1b), определенной в результате анализа кДНК клонов из образцов плазмы крови японских пациентов с хроническим гепатитом [7].

Аминокислотный синтез пептидов. Синтез пептидов осуществляли твердофазным методом путем наращивания пептидной цепи с N-конца на тефлоне с радиационно-привитым полистиролом по Boc/Bzl-стратегии. В синтезе были использованы Boc-аминокислоты и их производные ("Reanal", Венгрия), имеющие L-конфигурацию. Полноту прохождения реакций на носителе проверяли с помощью нингидринового теста. Синтез выполняли в ручном режиме методами активированных эфиров и симметричных ангидридов, используя стандартный протокол проведения синтетического цикла, блокирования непрореагировавших аминогрупп и отщепления пептидов от полимера [18]. Флюоресцентный зонд вводили в структуры пептидов присоединением FAM по карбодимидной методике. Обессоливание и удаление низкомолекулярных продуктов пептидной природы проводили методом гель-фильтрации на сефадексах G-10, G-15 или G-15 в 10% уксусной кислоте. Пептиды очищали путем полупрепаративной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе фирмы "Du Pont" (США). Индивидуальность пептидов подтверждали в ходе аналитической ВЭЖХ и по данным количественного аминокислотного анализа.



Малый размер молекулы
Низкая поляризация флюоресценции

Большой размер молекулы (комплекса)
Высокая поляризация флюоресценции

Зависимость поляризации флюоресценции от размера молекулы.

Таблица 2

Выявление методом ПФИА, основанного на пептидах № 1–5, анти-НСV-соге-позитивных сывороток пациентов с диагнозом ВГС

Образец №	ОП в ИФА-тест-системе "Вектор-Бест спектр"		Позитивность образцов сывороток в ПФИА-тест-системе.				
	анти-соге	анти-NS	N-конец HCV-соге-белка		центральная область HCV-соге-белка		
			пептид № 1	пептид № 2	пептид № 3	пептид № 4	пептид № 5
1	3,4	2,2	+	+	+	+	+
2	3,3	3,3	-	+	-	-	+
3	3,5	3,3	-	-	-	-	+
4	3,5	3,3	+	+	+	+	+
5	3,4	3,2	+	+	+	+	+
6	3,3	3,2	+	+	+	+	+
7*	3,3	2,7	-	-	-	-	-
8	3,4	3	+	+	+	+	+
9*	3,3	3,3	-	-	-	-	-
10	3,4	3,4	+	+	+	+	+
11	3,6	3,2	+	+	+	+	+
12	3,4	3	-	-	-	-	+
13	3,3	3,3	+	+	+	+	+
14*	3,4	3,4	-	-	-	-	-
15	3,3	3	+	+	-	+	+
16	3,5	3,5	-	+	-	-	-
17	3	3,2	+	+	-	+	+
18	3,3	3,2	-	+	-	-	-
19	3,6	3,3	-	+	-	-	+
20	3,7	3,8	+	+	+	+	+
21	3,6	3,8	-	-	-	+	-
22	3,7	3,8	-	-	-	-	+
23*	3,6	3,9	-	-	-	-	-
24	1	2,1	+	+	+	+	+
25	3,6	3,7	+	+	+	+	+
26	2	0,8	-	-	-	+	-
27	3,5	3	-	+	+	-	+
28	2,9	-	+	+	+	+	+
29	3,5	3,5	+	+	+	+	+
30*	3,2	3,2	-	-	-	-	-
31	3,5	3,6	+	+	+	+	+
32	3,5	3,6	+	+	+	+	+
33	3,3	3,5	+	+	+	+	+
34*	3,4	3	-	-	-	-	-
35	3	0,7	-	+	-	-	+
36	3,3	3,3	+	+	+	+	+
37	3,5	3,4	+	+	+	+	+
38	3,2	3,2	+	+	+	+	+
39	3,7	3,8	-	-	-	-	+
40	3,6	3,8	+	+	+	+	+
% выявления			55	70	53	60	75

Примечание. * – сыворотки, не взаимодействующие ни с одним из пептидов.

Иммуногенность флюоресцентно-меченных пептидов. Флюоресцентно-меченные пептиды были проверены иммуноферментным методом, который показал, что введение флюоресцентной метки не влияет на иммуногенные свойства синтезированных

пептидов. ИФА выполняли по стандартному протоколу [18].

Биологический материал – образцы сывороток крови, содержащие анти-ВГС. Сыворотки отбирались в ходе плановой работы скрининговой лаборатории НИИ СП им. Н.В. Склифосовского. Тестирование проводили при помощи коммерческой ИФА-тест-системы "БЕСТ анти-ВГС-комплект 4" производства ЗАО "Вектор-Бест". Анализ выполняли согласно рекомендованному фирмой-производителем протоколу. По совокупности результатов лабораторных исследований у всех 40 пациентов был установлен диагноз вирусного гепатита С.

Методика проведения ПФИА. В боросиликатную кювету вносили 1000 мкл фосфатного буфера (рН 7,4) с добавлением лаурилсульфата натрия в концентрации 0,05% и 0,1 г/л бычьего гамма-глобулина, содержащего флюоресцентно-меченный пептид в концентрации, при которой интенсивность флюоресценции раствора составляет 1000 усл. ед. Сыворотки вносили таким образом, чтобы итоговое разведение составляло 1/100. Стадии инкубации отсутствовали. Для измерения поляризации флюоресценции использовали ТDх-анализатор фирмы "Abbot" в режиме Photo-check.

Границы "серой зоны" и "cut off" рассчитывали отдельно для каждого пептида, прибавляя к среднему арифметическому сигналу в кюветах с 20 отрицательными сыворотками (отрицательный контроль) два стандартных арифметических отклонения, рассчитанного для данной выборки. Коэффициентом позитивности (КП) считали отношение значения поляризации флюоресценции в ВГС-позитивном образце к значению "cut off".

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены аминокислотные последовательности пептидов № 1–5. Первичная структура синтезированных пептидов соответствует последовательности изолята HCV-J, относящегося к генотипу 1b [7], самому распространенному на территории РФ [16]. Известно, что N-концевая часть нуклеокапсидного белка наиболее консервативна, и отдельные аминокислотные замены в зависимости от типа или субтипа ВГС существенно не влияют на его антигенную активность, что обуславливает универсальность разрабатываемой диагностической тест системы.

Иммунореактивность полученных пептидов оценивали по их взаимодействию с анти-НСV-позитивными сыворотками в ПФИА-тест-системе.

В табл. 2 представлены результаты определения оптических плотностей (ОП) в коммерческой ИФА-тест-системе ("БЕСТ анти-ВГС-комплект 4", ЗАО "Вектор Бест") и взаимодействия флюоресцентно-меченных пептидов с исследуемыми клиническими образцами.

Положительными образцами в ПФИА-тест-системах, основанных на пептидах № 1–5, считались те сыворотки, в которых значение поляризации флюоресценции превышало значение суммы среднего арифметического сигнала в кюветах с 20 стандартными отрицательными сыворотками и двух стандартных арифметических отклонениях, рассчитанных для каждого пептида индивидуально.

Как видно из табл. 2 из двух пептидов, перекрывающих эпитопы N-концевой части HCV-core-белка, и пептида № 2 отмечен наибольший процент выявления анти-HCV-позитивных сывороток. КП пептида № 2 также был выше КП пептида № 1. Высокая иммуногенность пептида № 2 и более высокий процент выявления им положительных образцов обусловлены наличием дополнительного В-эпитопа по сравнению с пептидом № 1 [17]. Тенденция к увеличению процента выявления от 53 до 75% позитивных сывороток и КП сохраняется и при увеличении полипептидной цепи у пептидов № 3–5 из центральной области нуклеокапсидного белка вируса гепатита С.

Следует отметить, что из позитивных сывороток только № 7, 9, 14, 23, 30, 34 (15%) не прореагировали ни с одним из синтезированных пептидов, что свидетельствует о сопоставимости результатов диагностической тест-системы, основанной на методе ПФИЛ, и коммерческой ИФА-тест-системы, которая составила около 85%.

Выводы

1. Впервые применен метод поляризационного флюоресцентного иммуноанализа для диагностики вирусного гепатита С.

2. Сопоставимость результатов разработанной диагностической тест-системы, основанной на методе ПФИА, и коммерческой ИФА-тест-системы составила 85%.

3. Продемонстрирована возможность повышения чувствительности разрабатываемой ПФИА-тест-системы при увеличении полипептидной цепи в синтетическом флюоресцентно-меченном пептиде.

4. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований по разработке ПФИА-тест-системы для диагностики вирусного гепатита С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chiba J., Ohba H., Matsuura Y. et al. Serodiagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection with an HCV core protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991; 88: 4641–5.
2. Dandliker W.B., Feigen G. A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1961; 5: 29.
3. Ferroni P., Mascolo G., Zaninetti M. et al. Identification of four epitopes in hepatitis C virus core protein. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 1586–91.
4. Goeser T., Muller H. M., Ye J. et al. Characterization of antigenic determinants in the core antigen of the hepatitis C virus. Virology. 1994; 205: 462–9.
5. Hosen B., Fang C. T., Popovsky M. A. et al. Improved serodiagnosis of hepatitis C virus infection with synthetic peptide antigen from capsid protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991; 88: 3647–51.
6. Houghton M., Weiner A., Han J. et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. Hepatology. 1991; 14: 381–8.
7. Kato N., Hijikata M., Ootsuyama Y. et al. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990; 87: 9524–28.
8. Katayama T., Mazda T., Kikuchi S. et al. Improved serodiagnosis of non-A, non-B hepatitis by an assay detecting antibody to hepatitis C virus core antigen. Hepatology. 1992; 15: 391–94.
9. Lucero N., Escobar G., Ayala S. et al. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. J. Med. Microbiol. 2003; 883–7.
10. Nasoff M. S., Zebede S. L., Inchauspe G. et al. Identification of an immunodominant epitope within the capsid protein of hepatitis C virus. Proc. Natl. Acad. USA. 1991; 88: 5462–6.
11. Sallberg M., Pumpen P., Zhang Z. X. et al. Locations of antibody binding sites within conserved regions of the hepatitis C virus core protein. J. Med. Virol. 1994; 43: 62–8.
12. Stricher F., Martin L., Barthe P. et al. A high-throughput fluorescence polarization assay specific to the CD 4 binding site of HIV-1 Glycoproteins based on a fluorescein-labelled CD4 mimic. Biochem. J. 2005; 390 (Pt1): 29–39.
13. Weber G. Polarization of fluorescence of macromolecules. Biochem. J. 1952; 51: 155–67.
14. Westerfeld J.G. Detection trends in high throughput screening. Anal. Bioanal. Chem. 2002; 372: 43–5.
15. Zaaijer H. L., Vrieling H., van Exel-Oehlers P. J. et al. Confirmation of hepatitis C infection: a comparison of five immunoblot assays. Transfusion. 1994; 34: 603–7.
16. Львов Д. К., Миширо С., Селиванов Н. А. и др. Распространение генотипов вируса гепатита С, циркулирующих на территориях северо-западной и центральной частей России. Вопросы вирусологии. 1995; 6: 251–3.
17. Речкина Е. А., Денисова Г. Ф., Масалова О. В. и др. Картирование антигенных детерминант белков вируса гепатита С при помощи технологии фагового дисплея. Молекулярная биология. 2006; 40 (2): 357–68.
18. Семилетов Ю. А., Фирсова Т. В., Шибнев В. А. и др. Синтез и антигенная активность пептидов из состава core- и NS3-белков вируса гепатита С. Биоорганическая химия. 1993; 19: 126–9.

Поступила 16.02.12