

УДК 636.09:59.083:616.155.392:636.2

ХОМЕНКО Я.В., e-mail: yaroslavh@ukr.net,
МУШТУК І.Ю., канд. вет. наук, e-mail: mushtuk0104@gmail.com,
АЙШПУР О.Є., д-р вет. наук, e-mail: olenaayshpur@gmail.com,
МІНЦЮК Є.П., e-mail: jeckmints@gmail.com
Інститут ветеринарної медицини

ВИГОТОВЛЕННЯ ПЕРОКСИДАЗНОГО КОН'ЮГАТУ ДЛЯ ІФА ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

У статті викладено результати виготовлення пероксидазного кон'югату рекомбінантного білка *G Streptococcus spp.* для діагностичної лейкозної тест-системи на основі твердофазного варіанту імуоферментного аналізу. Для отримання кон'югату був застосований періодатний метод. Встановлено оптимальне розведення імуоферментного кон'югату, а саме 1:32000 – 1:64000, яке визначали шляхом кратних послідовних розведень під час постановки ІФА зі заздалегідь відомими позитивною та негативною на лейкоз великої рогатої худоби сироватками крові.

Ключові слова: пероксидазний кон'югат, білок *G Streptococcus spp.*, імуоферментний аналіз, лейкоз великої рогатої худоби,.

Вступ. В Україні серед вірусних захворювань сільськогосподарських тварин лейкозу великої рогатої худоби належить одне із провідних місць [1]. Постійно проводиться інтенсивна робота щодо контролю цієї інфекції, проте проблема поки що остаточно не вирішена. Одним із ефективних заходів боротьби з лейкозом великої рогатої худоби, є постійний серологічний моніторинг із застосуванням ефективних методів лабораторної діагностики [2, 3].

Серед традиційних методів серологічної діагностики лейкозу в Україні найчастіше використовують реакцію імунодифузії (РІД) та імуоферментний аналіз (ІФА). Імуоферментний аналіз є одним з напрямів хімічної ензимології, що найбільш активно розвивається як в нашій країні, так і за кордоном [4]. Для нього характерна висока чутливість і висока специфічність. Він також дозволяє виявляти специфічні до вірусу лейкозу антитіла в молоці та у сечі.

Мета роботи. Виготовити пероксидазний кон'югат на основі білка *G* для діагностичної лейкозної імуоферментної тест-системи.

Матеріали і методи дослідження. Для отримання імуоферментного кон'югату на основі рекомбінантного білка *G Streptococcus spp.* та пероксидази хрому застосовували періодатний метод [5]. Для цього до розчину, що містив розчин пероксидази хрому в деіонізованій воді, додавали 0,1 М розчину натрію періодату (NaOI_4) та перемішували протягом 20 хв. в умовах кімнатної температури. Після цього проводили діаліз проти 0,001 М натрію ацетатного буферу (рН 4,4) упродовж 16 год. при +4 °С. До модифікованої таким чином пероксидази хрому додавали 0,2 М натрію карбонатного буфера з рН 9,5 та 1 мг білка *G* в тому ж буфері. Реакційну суміш перемішували на шейкері протягом 3 год. за температури 18–22 °С. Після цього до суміші додавали водний розчин

боргідриду натрію (NaBH_4) та перемішували на шейкері 1,5 год. за температури $+4\text{ }^\circ\text{C}$. Проводили очищення отриманого кон'югату шляхом хроматографії з використанням сефадексу G-25, збираючи фракції, що належали до першого піку. Кон'югат стабілізували та зберігали за температури $+4\text{ }^\circ\text{C}$. Специфічність отриманого кон'югату перевіряли в непрямому твердофазному імуноферментному аналізі.

Імуноферментний аналіз, непрямий варіант. Лейкозний рекомбінантний антиген сорбували на полістиролових планшетах фірми «SARSTEDT» (США) в $0,05\text{ M}$ розчині карбонатно-бікарбонатного буфера рН 9,6. У кожну лунку планшета вносили по 100 мкл розчину антигену і витримували протягом 16-18 год. за температури $+4\text{ }^\circ\text{C}$. Після закінчення інкубації вміст лунок витрушували. Планшети підсушували.

У кожну лунку планшета вносили по $0,090\text{ см}^3$ розчину для розведення по $0,010\text{ см}^3$ досліджуваних зразків сироватки крові і витримували в термостаті протягом 60 хв. при $37\text{ }^\circ\text{C}$. Після завершення інкубації для видалення антитіл, що не зв'язалися, лунки чотирикратно промивали автоматичним промивачем (вошером) фірми «Labsistems» (Фінляндія), вносячи в кожну лунку по $0,350\text{ см}^3$ розчину для промивання планшетів.

Як детектуючий агент використовували кон'югат пероксидази хрому з рекомбінантними білком G *Streptococcus spp.* Кон'югат на однократному розчині для промивання планшетів вносили в кожну лунку планшета по $0,1\text{ см}^3$. Інкубували 30 хв. у термостаті за температури $37\text{ }^\circ\text{C}$. Після цього лунки знову промивали розчином для промивання планшетів шестикратно.

Реакцію проявляли, використовуючи розчин хромогену тетраметилбензидину «NeA-Blue» (TMB) (CLINICAL Science Products Inc., USA). Розчин хромогену вносили по $0,1\text{ см}^3$ у кожну лунку та інкубували упродовж 30 хв. при $18\text{--}25\text{ }^\circ\text{C}$ у темному місці.

Кольорову ферментативну реакцію зупиняли, вносячи в лунки планшета по $0,05\text{ см}^3$ стоп-реагенту ($2\text{M H}_2\text{SO}_4$). Облік реакції проводили за допомогою автоматичного спектрофотометра «Labsistems» (Фінляндія) у двохвильовому режимі: перший фільтр – 450 нм , другий – 620 нм .

Результати досліджень та їх обговорення. Виготовлений пероксидазний кон'югат відтитровували для отримання оптимальної робочої концентрації шляхом кратних послідовних розведень. Для цього ставили ІФА зі заздалегідь відомими позитивною та негативною на лейкоз великої рогатої худоби сироватками крові (табл. 1).

Як свідчать результати, що наведенні в таблиці 1, під час титрування імуноферментного кон'югату було визначено його оптимальне розведення, яке становило $1:32000\text{--}1:64000$. За такого розведення найвищий коефіцієнт співвідношення значень оптичної густини позитивної та негативної сироваток крові дорівнює відповідно $28,1$ та $32,6$.

Результати титрування імуноферментного кон'югату

Розведення кон'югату	Оптична густина (ОГ) при довжині хвилі 450/620 нм		Коефіцієнт співвідношення ОГ позитивної до ОГ негативної сироватки
	позитивної сироватки	негативної сироватки	
1:8000	3,106	0,295	10,5
1:16000	2,689	0,169	15,9
1:32000	2,105	0,075	28,1
1:64000	1,794	0,055	32,6
1:128000	1,191	0,044	27,1
1:256000	0,683	0,028	24,4

Примітки: Позитивна сироватка – позитивний на лейкоз великої рогатої худоби референс-стандарт Е 05 (Germany); Негативна сироватка – сироватка крові великої рогатої худоби, яка не містить антитіл до вірусу лейкозу великої рогатої худоби.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Аналізуючи результати титрування кон'югату, було зроблено висновок: під час конструювання тест-систем для діагностики лейкозу великої рогатої худоби цієї серії оптимальним є ступінь розведення імуноферментного кон'югату – 1 : 64000.

На наступному етапі, маючи робоче розведення кон'югату, потрібно встановити специфічність та чутливість тест-системи, а також визначити відтворюванність. З цією метою проводять випробування розроблюваної тест-системи, застосовуючи внутрішньовиробничі панелі сироваток крові, до складу яких повинні входити позитивні та негативні референс-сироватки та сироватки крові вільних від інфекційних захворювань тварин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мандигра М.С. Епізоотологічний моніторинг, профілактика та системи ліквідації лейкозу великої рогатої худоби в Україні: автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук: спеціальність 16.00.08 «Епізоотологія і інфекційні хвороби». – Харків, 2000. – 37 с.
2. Храмцов В.В. Частота регистрации инфекции ВЛВРХ в сельхозпредприятиях разных форм собственности и хозяйственно-полезные признаки у животных с разной степенью компрометации к лейкозу / В.В. Храмцов [и др.] // Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби: тези допов. міжнар. наук.-практ. конф. – К., 2006. – С. 82.
3. Ярчук Б.М. Сучасні аспекти оздоровлення господарств, неблагополучних щодо лейкозу великої рогатої худоби / Б.М. Ярчук [та ін.] // Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби: тези допов. міжнар. наук.-практ. конф. – К. – 2006. – С. 89 – 90.
4. Егоров А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.]. – М., 1991. – С. 3.
5. Nakane P.K. Peroxidase-labelled antibody: a new method of conjugation / Nakane P.K., Kawaoi A.J. // Histochem Cytochem. – 1974. – Vol. 22. – P. 1084–1091.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ПЕРОКСИДНОГО КОНЬЮГАТА ДЛЯ ИФА ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА/ Хоменко Я.В., Муштук И.Ю., Айшпур Е.Е., Минцюк Е.П.

В статье представлены результаты изготовления пероксидазного конъюгата рекомбинантного белка *G Streptococcus spp.* для диагностической лейкозной тест-системы на основе твердофазного варианта иммуноферментного анализа. Для получения конъюгата был применен периодатный метод. Найдено оптимальное разведение иммуноферментного конъюгата – 1:32000 – 1:64000, которое определяли путем кратных последовательных разведений при постановке ИФА с заранее известными положительной и отрицательной лейкозом крупного рогатого скота сыворотками крови.

Ключевые слова: пероксидазный конъюгат, белок *G Streptococcus spp.*, иммуноферментный анализ, лейкоз крупного рогатого скота.

PEROXIDASE CONJUGATE PREPARATION FOR THE DIAGNOSIS OF ENZOOTIC BOVINE LEUCOSIS BY ELISA KIT / Khomenko Ya., Mushtuk I., Ayshpur O., Mintsyuk E.

Introduction. *Enzootic bovine leucosis (EBL) is one of the most important viral diseases of the cattle in Ukraine. The control and eradication measures of EBL are based on carrying out of regular serological monitoring. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a highly sensitive and specific method widely need for EBL serological diagnostics.*

The goal of the work. *To prepare a protein G peroxidase conjugate for the ELISA Kit for the diagnosis of EBL.*

Materials and methods. *Preparation of the ELISA conjugate based on recombinant protein G from Streptococcus spp. and horseradish peroxidase were performed using the periodate method. Purification of the obtained resulting conjugate was carried out by chromatography using Sephadex G-25, the selected fractions belonged to the first peak. The specificity of the protein G-peroxidase conjugate was verified using an indirect solid phase ELISA.*

For this purpose, recombinant antigens of Bovine leukemia virus were absorbed on polystyrene plates. Test samples of blood serum and a sample dilution solution was added to each well. Horseradish peroxidase conjugate with recombinant G protein of Streptococcus spp. was used as a detection agent. The reaction was performed using TMB chromogen solution «NeA-Blue» (CLINICAL Science Products Inc., USA). The measurements were carried out with an automatic spectrophotometer «Labsystems» in the two-wave mode: the first filter – 450 nm, the second – 620 nm.

Results of research and discussion. *The prepared peroxidase conjugate was titrated to obtain the optimal working dilution by multiple successive dilutions. The optimal dilution of the ELISA conjugate, which was 1: 32000 – 1: 64000, was determined by multiple sequential dilutions during IFF exposure with pre-identified positive and negative serum bovine leukosis. With this dilution, the high ratio of the optical density values of the positive and negative sera is 28.1 and 32.6, respectively.*

Conclusions and prospects for further research. *Analyzing the results of the conjugate titration, it was concluded that the optimal dilution of the immune enzyme conjugate for the developed ELISA Kit for the diagnosis of bovine leukemia of this series was 1: 64000.*

In further experiments with working dilution of the conjugate, it is necessary to assess the specificity and sensitivity of the test kit. For this purpose, intraindustrial panel of samples contained positive and negative reference sera and blood sera from non-infected animals will be used.

Keywords: *peroxidase conjugate, protein G from Streptococcus spp., ELISA, Enzootic Bovine Leukosis.*

REFERENCES

1. Mandyhra, M.S. (2000). Epizootologichnyi monitorynh, profilaktyka ta systemy likvidatsii leikozu velykoi rohatoi khudoby v Ukraini [Epizootiological monitoring, prevention and systems for the elimination of leukosis in cattle in Ukraine]. *Extended abstract of Doctor's thesis*. Kharkiv [in Ukrainian].
2. Khrantsov, V.V., Parshyna, O.N., Yvanov, O.P., & Taslytskyi, S.Ya. (2006). Chastota registratsii infektsii VLVRH v selhozpredpriyatiyah raznyih form sobstvennosti i hozyaystvenno-poleznyie priznaki u zhyvotnyih s raznoy stepenyu komprometatsii k leykozu [The frequency of registration of infection VLVRH in agricultural enterprises of different forms of ownership and economic-useful signs in animals with different degrees of compromise to leukemia]. Proceedings from Epizootology and prevention of infectious diseases of cattle '06: *Mizhnarodna naukovo-praktichna konferentsiya – The International Scientific and Practical Conference* (p. 82). Kyiv [in Ukrainian].
3. Yarchuk, B.M., Tyrsin, R.V., & Dovhal, O.V. (2006). Suchasni aspekty ozdorovlennia gospodarstv, neblahopoluchnykh shchodo leikozu velykoi rohatoi khudoby [Modern aspects of improvement of farms, dysfunctional with regard to leukemia of cattle]. Proceedings from Epizootology and prevention of infectious diseases of cattle: *Mizhnarodna naukovo-praktichna konferentsiya – The International Scientific and Practical Conference* (pp. 89-90). Kyiv [in Ukrainian].
4. Ehorov, A.M., Osypov, A.P., Dzantyeu, B.B., & Havrylova, E.M. (1991). *Teoryia y praktyka ymmunofementnoho analiza [Theory and practice of ELISA]*. Moskva [in Russian].
5. Nakane, P.K., & Kawaoi, A.J. (1974). Peroxidase-labelled antibody: a new method of conjugation. *Histochem Cytochem*, 22, 1084-1091.

УДК 636.09:602:57.083.33:616.98

ХОМЕНКО В.Г., e-mail: yaroslavh@ukr.net,
ХОМЕНКО Я.В., e-mail: yaroslavh@ukr.net
Інститут ветеринарної медицини НААН

ОТРИМАННЯ КОН'ЮГАТУ НА ОСНОВІ ЗОЛЮ ЗОЛОТА ТА РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА G ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЬОЗУ ТВАРИН

У статті викладено результати виготовлення кон'югату на основі золю золота та рекомбінантного білка G Streptococcus spp., який застосовується в дот-імуноаналізі під час діагностики бруцельозу тварин. Для отримання кон'югату спочатку отримували золь золота, який на наступному етапі поєднували з білком G. Властивості кон'югату визначали під час постановки дот-імуноаналізу зі задалегідь відомими позитивними та негативними на бруцельоз тварин сироватками крові.

Ключові слова: бруцельоз, білок G, колоїдне золото, дот-імуноаналіз.

Вступ. Незважаючи на стабільне епізоотичне благополуччя в Україні щодо бруцельозу загроза виникнення інфекції існує, зокрема через контрабандне завезення тварин, продуктів забою, сировини, молочних продуктів із країн, в яких дана проблема актуальна, а також у разі зараження свійських тварин від диких чи тварин-бактеріоносіїв [1].