

Для цитирования: Антипин, А.А. Детекция аптамерами прионного белка — инфекционного агента губкообразной энцефалопатии коров / А.А. Антипин, Г.А. Надточей // Российский ветеринарный журнал. — 2019. — № 6. — С. 5–8. DOI: 10.32416/2500-4379-2019-6-5-8
 For citation: Antipin A.A., Nadtochey G.A., Detection of prion protein, the infection agent of bovine spongiform encephalopathy, by using aptamers, Rossijskij veterinarnyj zhurnal (Russian veterinary journal), 2019, No. 6, pp. 5–8. DOI: 10.32416/2500-4379-2019-6-5-8

УДК 619: 616.9: 616-076

Детекция аптамерами прионного белка — инфекционного агента губкообразной энцефалопатии коров

А.А. Антипин, научный сотрудник лаборатории молекулярной цитопатологии и электронной микроскопии (antipinbiotech@yandex.ru),

Г.А. Надточей, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной цитопатологии и электронной микроскопии (g_a_nadtochei@mail.ru).

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» Российской академии наук (109428, РФ, Москва, Рязанский проспект, д.24, корп. 1).

В статье представлены результаты анализа специфического взаимодействия отобранных ДНК-аптамеров (выявляющих амилоидные эпитопы) с прионными белками в препаратах из тканей ЦНС экспериментально зараженных губкообразной энцефалопатией коров.

Цель исследования. Изучить возможность детекции ДНК-аптамерами, полученными на прионный белок возбудителя, прионного белка — инфекционного агента губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота (ГЭП КРС), в препаратах из тканей ЦНС зараженных животных.

Материалы и методы. Пробы тканей ЦНС получали из экспериментально зараженной губкообразной энцефалопатией коровы. Заболевание подтверждали морфологическим анализом гистологических срезов. Для контроля наличия в патологическом материале прионов — возбудителей губкообразной энцефалопатии их выделяли с использованием ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы и анализировали иммуноблоттингом и электронной микроскопией.

Результаты. Подтверждено заболевание губкообразной энцефалопатией экспериментально зараженной коровы. Получены препараты тканей ее мозга. Показано специфическое эффективное связывание отобранных ДНК-аптамеров с прионами в тканях головного мозга больной губкообразной энцефалопатией коровы.

Заключение. Продемонстрирована возможность детекции прионных белков — инфекционных агентов заболевания в препаратах из тканей ЦНС зараженных губкообразной энцефалопатией коров ДНК-аптамерами, выявляющими амилоидные эпитопы.

Ключевые слова: прион, губкообразная энцефалопатия коров, ДНК-аптамер.

Detection of prion protein, the infection agent of bovine spongiform encephalopathy, by using aptamers

A.A. Antipin, Research scientist of Laboratory of molecular cytopathology and electron microscopy (antipinbiotech@yandex.ru),

G.A. Nadtochey, PhD in Biology sc., Head of Laboratory of molecular cytopathology and electron microscopy (g_a_nadtochei@mail.ru).

Federal Research Center — All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Y. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences (24-1, Ryazanskyi prospect str., Moscow, RF, 109428).

In the paper results of the specific interaction of selected DNA aptamers with prion protein from CNS tissues from DSE infected cows are described. The test detects amyloid epitops.

The purpose of investigation. To study the possibility of detection of prion protein (BSE infectious agent in tissues CNS infected cows), using DNA aptamers. The DNA aptamers had been selected to yeast prions.

Materials and methods. CNS tissues samples from a DSE experimentally infected cow were used. The infection was confirmed by histological analyses. The prion protein of BSE was isolated by ultracentrifugation in sucrose gradient and analysed, using immunoblotting and electron microscopy.

Results. DSE infection in an experimentally infected cow was confirmed. The brain tissue samples were prepared. Specific effective binding of selected DNA aptamers with prions from DSE cow brain tissues was revealed.

Conclusion. The possibility of detection of prion proteins in brain tissues from a DSE cow, using DNA aptamers, specifically binded with amyloid epitops was shown.

Keywords: prion; bovine spongiform encephalopathy, DNA-aptamer.

Работа выполнена в соответствии с утвержденным планом НИР ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН на период 2019-2021г.г. при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России. Авторы не имеют конфликта интересов.

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ГЭП КРС — губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИФА — иммуноферментный анализ, ПААГ — полиакриламидный гель, РНК — рибонуклеиновая кислота, ЦНС — центральная нервная система.

Введение

Прионы — особый класс инфекционных агентов, вызывающих неизлечимые заболевания ЦНС человека и животных. Их инфекционные свойства определяются прионными белками с особой конформационной структурой. Уникальная особенность прионных заболеваний заключается в том, что они могут возникать не только в результате заражения, но и в спорадической и наследственной форме. Вне зависимости от происхождения прионные заболевания могут быть переданы далее инфекционным путем. В последние годы интерес к прионным болезням возрос в связи с эпидемией ГЭП КРС (так называемое «бешенство коров») в Англии, возбудителем которой является прион, и с возможностью передачи этого заболевания людям [1]. Особая опасность патогенных прионов в их исключительно высокой устойчивости к обычным методам обеззараживания [2].

В настоящее время нет полного знания о всех формах структур прионного инфекционного агента, вызывающего ГЭП КРС, нет диагностических систем для прижизненного выявления ГЭП КРС в связи с крайне малой концентрацией возбудителя в жидкостях тела.

Многообещающий подход для диагностики и изучения прионных заболеваний — использование специфических ДНК- и РНК-аптамеров, коротких олигонуклеотидов, полученных методом Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX). Использование аптамеров для детекции прионов позволяет применить процедуру цепной полимеразной реакции, упрощая и многократно увеличивая чувствительность метода. Имеются сообщения исследователей о получении и специфическом взаимодействии РНК- и ДНК-аптамеров с прионным белком, аналогичном взаимодействию этого белка со специфическими антителами [3...6]. В работе российских авторов получены ДНК-аптамеры к рекомбинантным дрожжевым прионным белкам [7], детектирующие общие для амилоидных белков эпитопы [8]. Несколько из этих ДНК-аптамеров были отобраны нами для дальнейших исследований на препаратах от животных с прионными инфекциями [9].

Цель исследования

Изучить возможность детекции аптамерами, полученными на прионный белок дрожжей и отобранными ранее, прионного белка — инфекционного агента ГЭП КРС в препаратах из тканей ЦНС зараженных животных.

Материалы и методы

Пробы тканей ЦНС получали из головного мозга экспериментально зараженной губкообразной энцефалопатией коровы. Наличие специфических патологических изменений в тканях ЦНС определяли гистологическим методом с окрашиванием срезов гематоксилином и

эозином. Наличие в патологическом материале приона — возбудителя ГЭП КРС контролировали методом иммуноблоттинга с помощью моноклональных антител из набора «БиоРад» для выявления прионного белка. Прионный белок выделяли по методу Prusiner S.B. et al. [10]. Морфологические структуры, образуемые им, изучали методом негативного контрастирования на электронном микроскопе JEOL-100СХ.

Биотинилированные ДНК-аптамеры получали на автоматическом синтезаторе амидо-фосфитным методом с последующей очисткой в ПААГ. Аптамеры конъюгировали со стрептовидин-пероксидазой и использовали для детекции прионных белков в разработанном ИФА-подобном протоколе.

Результаты и обсуждение

В работе использовали фиксированный нейтральным формалином продолговатый мозг коровы, имевшей типичную клиническую картину заболевания через 16...28 месяцев после заражения гомогенатом головного мозга больной губкообразной энцефалопатией коровы. Мозг получен из Англии. Для подтверждения диагноза пробы тканей продолговатого мозга исследовали стандартным гистологическим методом. Приготовленные срезы каждой пробы окрашивали гематоксилин-эозином. Морфологический анализ проб показал в тканях наличие типичной для губкообразной энцефалопатии вакуолизации нейронов с билатеральной симметрией (рис. 1).

Наличие прионного белка — инфекционного агента ГЭП КРС — в препаратах продолговатого мозга подтверждали стандартным методом иммуноблоттинга и электронной микроскопией.

Для этого прионный белок выделяли из гомогената продолговатого мозга методом центрифугирования в градиенте 60...25 % (вес/объем) сахарозы при 40000 мин⁻¹ в роторе SW 41 Ti в течение 180 минут. Градиент делили на 3 фракции. Методом Лоури определяли количество белка, содержащегося в средней фракции градиента сахарозы. В качестве стандарта использовали альбумин сыворотки крови коров. Пробы средней фракции градиента, содержащие примерно

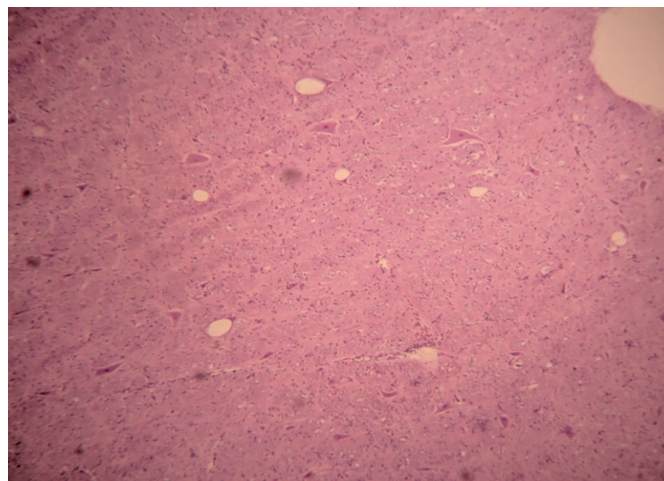


Рис. 1. Вакуолизация нейронов на срезе продолговатого мозга больной губкообразной энцефалопатией коровы (x150)
 Fig. 1. The vacuolation of neurons in microscopic section of the medulla oblongata of spongiform encephalopathy cows (x150)

100 нг белка, разводили в электрофоретическом буфере для проб, содержащем 2 % додецилсульфата натрия и 5 % меркаптоэтанола, и прогревали при 100 °С в течение 2 минут. Пробы подвергали электрофорезу в непрерывной буферной системе по Лэммли в 15%-м ПААГ (микросистема «БиоРад»). В качестве маркеров использовали набор маркеров с низкомолекулярной массой фирмы «Фармадия». По окончании электрофореза гели окрашивали Кумасси, бриллиантовым синим R или серебром по методу Бюрк Р.Р. Основная полоса выявлялась в зоне около 30 кД, слабые полосы контаминации окрашивались в зонах, соответствующих примерно 12 и 40 кД.

Пробы средней фракции подвергли электрофорезу в 15%-м ПААГ, как указано выше, и перенесли влажным методом на PVDF мембраны с помощью ячейки мини-трансблот фирмы «БиоРад». Иммуноокрашивание провели моноклональными антителами из набора «БиоРад» для выявления прионного белка. Далее дорожку с исследуемым белком обработали мечеными антителами к мышинному иммуноглобулину. Дорожку с маркерами молекулярной массы обработали мечеными кроличьими антителами к маркерам (БСА, химотрипсину и мономеру цитохрома С). В дорожке нижней фракции полоса белка с молекулярной массой 40 кД не выявлена и представляет собой неспецифический белок. В средней полосе градиента специфично окрасились три полосы (рис. 2)

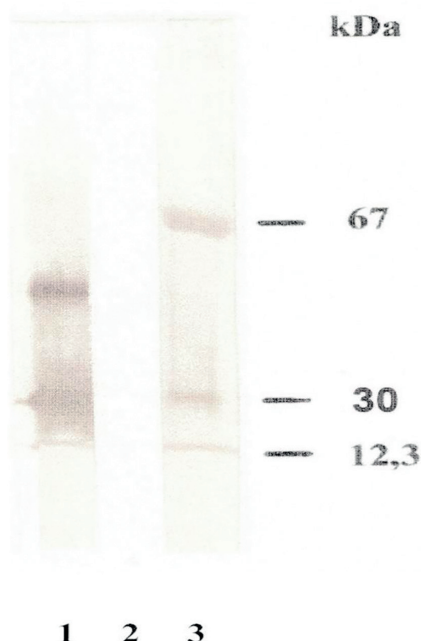


Рис. 2. Результаты анализа прионного белка, содержащегося в препаратах из образцов тканей ЦНС коров с экспериментальной губкообразной энцефалопатией методом иммуноблоттинга. Пояснение в тексте

Fig 2. The results of the immunoblot assay of experimental bovine spongiform encephalopathy prion from the tissues samples of the central nervous system. Explanation in the text

Дорожка 1 — проба средней фракции сахарозного градиента. Специфическая иммунореакция выявлена с белками молекулярной массой 14, 30 и примерно 45...50 кД; в зоне 40 кД иммунореакция не выявлена.

Дорожка 2 — пробы ткани продолговатого мозга здоровой коровы, обработанной аналогично опытному материалу. Специфическая иммунореакция не выявлена. Дорожка 3 — маркеры молекулярной массы: БСА, химотрипсин и мономер цитохрома С.

Морфологическую структуру белков, полученных методом градиентного ультрацентрифугирования, изучали электронной микроскопией. Были выявлены многочисленные фибриллы диаметром 10...20 нм длиной от 165 до 215 нм (рис. 3).



Рис. 3. Электронная фотография скопления фибрилл в пробах средней фракции сахарозного градиента (x45000)

Fig. 3. The electronic photo of fibrils accumulation in samples of the sucrose gradient average fraction (x45000)

Выделенный белок соответствует ожидаемым характеристикам прионного белка — инфекционного агента ГЭП КРС.

ДНК-аптамеры, отобранные нами ранее [9] для дальнейших исследований на препаратах из тканей животных, имеют нуклеотидный состав, приведенный в таблице 1.

1. Нуклеотидная последовательность ДНК-аптамеров 1. The nucleotide sequence of DNA-aptamers

N1	5'-bio-AGCACTAATCTATGCccgacgctagcgacctatcccataaacgagacacgggtccACCTTATGTTGTAGC-3'
N2	5'-bio-AGCACTAATCTATGCccgaccaacgtgtgtacctccataaacacaggagccgACCTTATGTTGTAGC-3'

Эффективность связывания аптамеров с прионом ГЭП КРС изучали методом ИФА в сэндвич варианте, заменяя вторичные антитела аптамерами, связанными с конъюгатом стрептавидин – пероксидаза. В качестве твердой фазы — полистироловые стрипы диагностического набора фирмы «БиоРад», лунки которых покрыты первичными моноклональными антителами к синтетическому полипептиду прионного белка. Такой подход к решению проблемы позволяет свести до минимума влияние на результаты анализа примесей, загрязняющих препарат используемого в опытах прионного белка, а также оценить результаты опыта экспериментально. В качестве отрицательного контроля на аптамер использовали биотинилированный олигонуклеотид S70 такой же длины, но вырожденной структуры. Результаты взаимодействия ДНК-аптамеров с прионом ГЭП КРС (BoPrP)* приведены в таблице 2.

Анализ результатов, представленных в таблице 2, демонстрирует, что ДНК-аптамеры показывают связывание с препаратами прионного белка, превышающее связывание с препаратами из гомогената мозга здоро-

2. Результаты ИФА связывания ДНК-аптамеров с прионом ГЭП КРС (BoPrP)* 2. ELISA results of the binding of DNA-aptamers with bovine spongiform encephalopathy prion (BoPrP)*

Аптамер	Материал		
	BoPrP из гомогената мозга больной коровы (BSE)	Препарат гомогената мозга здоровой коровы (N)	Отношение (BSE/N)* *
N1	0,924	0,427	2.160
N2	1,121	0,505	2,22
N70	0,612	0,775	0,790

Примечание. * — Показатель поглощения при 450 нм за минусом фона буфера для разбавления. * * — Соотношение показателя поглощения положительной на BSE пробы мозга и показателя поглощения пробы мозга здоровой коровы.

вой коровы более чем в 2 раза в отличие от олигонуклеотидов случайной структуры, то есть ДНК-аптамеры проявили специфическое связывание.

Заключение

Продемонстрирована возможность детекции прионных белков — инфекционных агентов в препаратах из тканей ЦНС коров, зараженных губкообразной энцефалопатией, ДНК-аптамерами, выявляющими амилоидные эпитопы.

Конфликт интересов

Авторы статьи не имеют финансовых или личных отношений с другими лицами или организациями, которые могли бы повлиять на достоверность или содержание этой работы.

Прозрачность финансовой деятельности

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Библиография

- Надточей, Г.А. Прионные инфекции: степень риска для животноводства и населения России / Г.А. Надточей, М.И. Гулюкин // Жизнь без опасностей. — 2012. — №2. — С. 40-45.
- Lasmezaz, C.I. Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeld-Jakob disease: implications for human health / C.I. Lasmezaz, J.G. Fournier, V. Nuvel, H. Boe, D. Marce, F. Laumory, N. Kopp, J.J. Hauw, J. Ironside, M. Bruce, D. Dormont and J.P. Deslys // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — No. 98. — pp. 4142-4147.
- Ogasawara, D. Screening of DNA aptamer against mouse prion protein by competitive selection / D. Ogasawara, H. Hasegawa, K. Kaneko, K. Sode, K. Ikebukuro // Prion. — 2007 Oct-Dec. — No. 1(4). — pp. 248-254.
- Bibby, D.F. Application of a novel in vitro selection technique to isolate and characterise high affinity DNA aptamers binding mammalian prion proteins / D.F. Bibby, A.C. Gill, L. Kirby, C.F. Farquhar, M.E. Bruce, J.A. Garson // J. Virol. Methods. — 2008 Jul. — No. 151(1). — pp.107-715.

- Wang, P. Selection and characterization of DNA aptamers against PrP(Sc) / P. Wang, K.L. Hatcher, J.C. Bartz, S.G. Chen, P. Skinner, J. Richt, H. Liu, S. Sreevatsan // Exp. Biol. Med (Maywood). — 2011 Apr. — Vol. 1. — No. 236(4). — pp. 466-476.
- Mashima, T. Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis / T. Mashima, F. Nishikawa, Yu.O. Kamatari, H. Fujiwara, M. Saimura, T. Nagata, T. Kodaki, S. Nishikawa, K. Kuwata, M. Katahira // Nucleic Acids Res. — 2013 Jan. — No. 41(2). — pp. 1355-1362.
- Сурина, Е.Р. Селекция ДНК-аптамеров, специфически взаимодействующих с фибриллярной формой белка Sup35 дрожжей / Е.Р. Сурина, Е.В. Морозкина, А.Н. Марченко, А.А. Антипин, О.В. Митькевич, В.В. Кушниров, М.Д. Тер-Аванесян, С.В. Беневоленский // Молекулярная биология. — 2009. — №43(4). — С. 626-631.
- Mitkevich O.V. DNA aptamers detecting generic amyloid epitopes / O.V. Mitkevich, N.V. Kochneva-Pervukhova, E.R. Surina, S.V. Benevolensky, V.V. Kushnirov, M.D. Ter-Avanesyan // Prion. — 2012 September — Vol. 1. — No. 6(4). — pp. 400-406.
- Антипин, А.А. Изучение эффективности связывания ДНК-аптамеров с прионом губкообразной энцефалопатии коров из тканей центральной нервной системы / А.А. Антипин, Г.А. Надточей. // Труды ВИЭВ. — 2015. — Т. 78. — С.89-96.
- Prusiner, S.B. Immunologic and molecular biologic studies prion proteins in bovine spongiform encephalopathy / S.B. Prusiner, M. Fūzi, M. Scott, D. Serban, H. Serban, A. Taraboulos // J. Infect. Dis. — 1993. — No. 167. — pp. 602-613.

References

- Nadtochey G.A. Gulyurin M.I., Prion infections: Risks for Animal Husbandry and Population in Russia, *Life without Danger*, 2012, No. 2, pp. 40-45.
- Lasmezaz C.I., Fournier J.G., Nuvel V., Boe H., Marce D., Laumory F., Kopp N., Hauw J.J., Ironside J., Bruce M., Dormont D. and Deslys J.P., Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeld-Jakob disease: implications for human health, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, No. 98, pp. 4142-4147.
- Ogasawara D., Hasegawa H., Kaneko K., K. Sode, K. Ikebukuro., Screening of DNA aptamer against mouse prion protein by competitive selection, *Prion*, 2007 Oct-Dec., No. 1(4), pp. 248-254.
- Bibby D.F., Gill A.C., Kirby L., Farquhar C.F., Bruce M.E., Garson J.A., Application of a novel in vitro selection technique to isolate and characterise high affinity DNA aptamers binding mammalian prion proteins, *J. Virol. Methods.*, 2008 Jul., No. 151(1), pp.107-115.
- Wang P., Hatcher K.L., Bartz J.C., Chen S.G., Skinner P., Richt J., Liu H., Sreevatsan S., Selection and characterization of DNA aptamers against PrP(Sc), *Exp. Biol. Med (Maywood)*, 2011 Apr., Vol. 1, No. 236(4), pp.466-476.
- Mashima T., Nishikawa F., Kamatari Yu.O., Fujiwara H., Saimura M., Nagata T., Kodaki T., Nishikawa S., Kuwata K., Katahira M., Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis, *Nucleic Acids Res.*, 2013 Jan., No. 41(2), pp. 1355-1362.
- Surina E.P., Morozkina E.V., Marchenko A.N., Antipin A.A., Mitkevich O.V., Kushnirov V.V., Ter-Avanesyan M.D., Benevolensky S.V., Selection of DNA aptamers specifically interaction with fibrillary form of yeast Sup 35 protein, *Molecular Biology*, 2009, No. 43 (4), pp. 626-631.
- Mitkevich O.V., Kochneva-Pervukhova N.V., Surina E.R., Benevolensky S.V., Kushnirov V.V., Ter-Avanesyan M.D., DNA aptamers detecting generic amyloid epitopes, *Prion.*, 2012 Sept., Vol. 1, No. 6(4), pp. 400-406.
- Antipin A.A., Nadtochey G.A., Studies of effectiveness of binding of DNA aptamers with BSE prions from CNS of cows, *Trudy VIEV*, 2015, No. 78, pp. 89-96.
- Prusiner S.B., Fūzi M., Scott M., Serban D., Serban H., Taraboulos A., Immunologic and molecular biologic studies prion proteins in bovine spongiform encephalopathy, *J. Infect. Dis.*, 1993, No. 167, pp. 602-613.