

Исследование коронавируса SARS-CoV-2 методом электрофореза и иммуноблоттинга

Автор: Романова Валерия, ученица 10 бх класса МАОУ ОЦ гимназии 6 "Горностай",
лаборант отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний ФИЦ ФТМ СО РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель: Казачинская Елена Ивановна –
д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний ФИЦ ФТМ СО РАН.

Цель работы



Исследование профиля вирусных белков очищенного препарата SARS-CoV-2 методом электрофореза и выявление белков SARS-CoV-2 – мишеней для антител сывороток крови людей, переболевших (реконвалесцентов) COVID-19, методом иммуноблоттинга.

Задачи



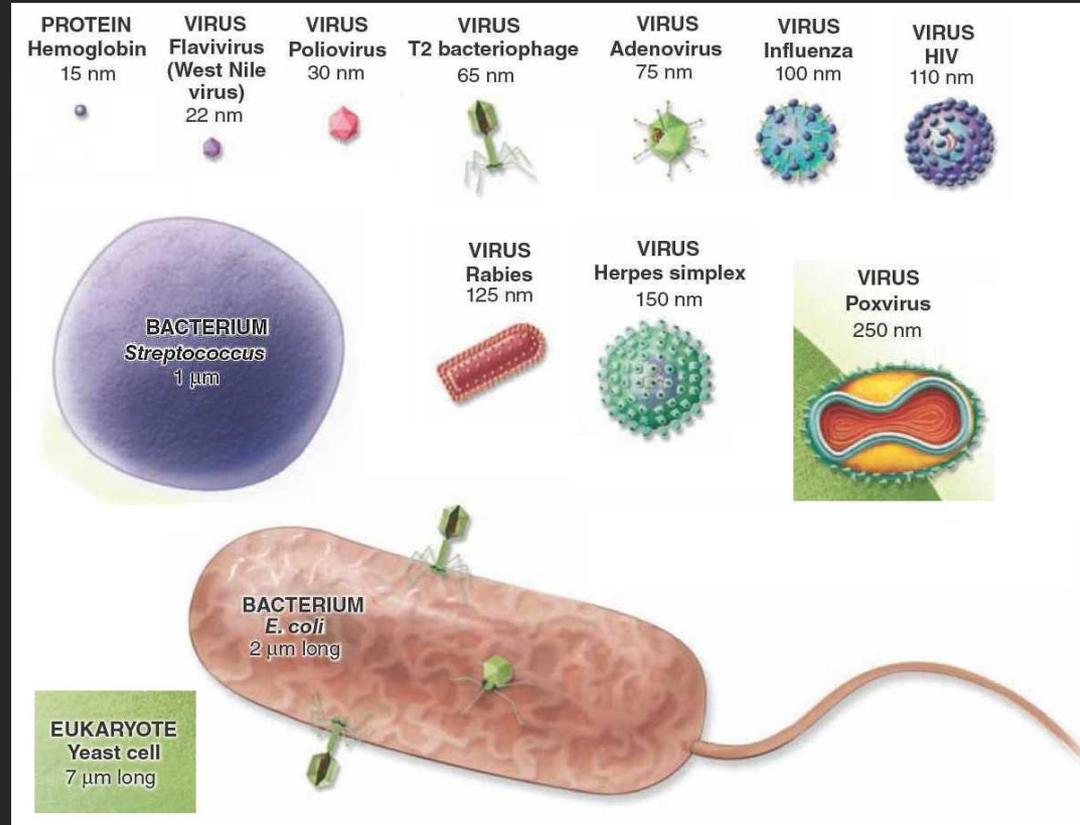
- 1) электрофоретическое разделение в полиакриламидной подложке с додецилсульфатом натрия вирусных белков инаktivированного, концентрированного, очищенного препарата sars-cov-2.
- 2) перенос электрофоретически разделенных вирусных белков на нитроцеллюлозную мембрану.
- 3) проведение иммуноблоттинга (иммунной реакции) вирусных белков с антителами, содержащимися в сыворотках крови реконвалесцентов (переболевших), имевших диагноз covid-19 по результатам тест-системы пцр («реалбест рнк sars-cov-2») (ao вектор-бест, россия) и иммуноферментных тест-систем (ифа) производства ebbott (сша) и ao вектор-бест.

Введение: вирусы



представляют собой простейшую форму жизни на нашей планете. Вирусы — переходная форма между живой и неживой материей.

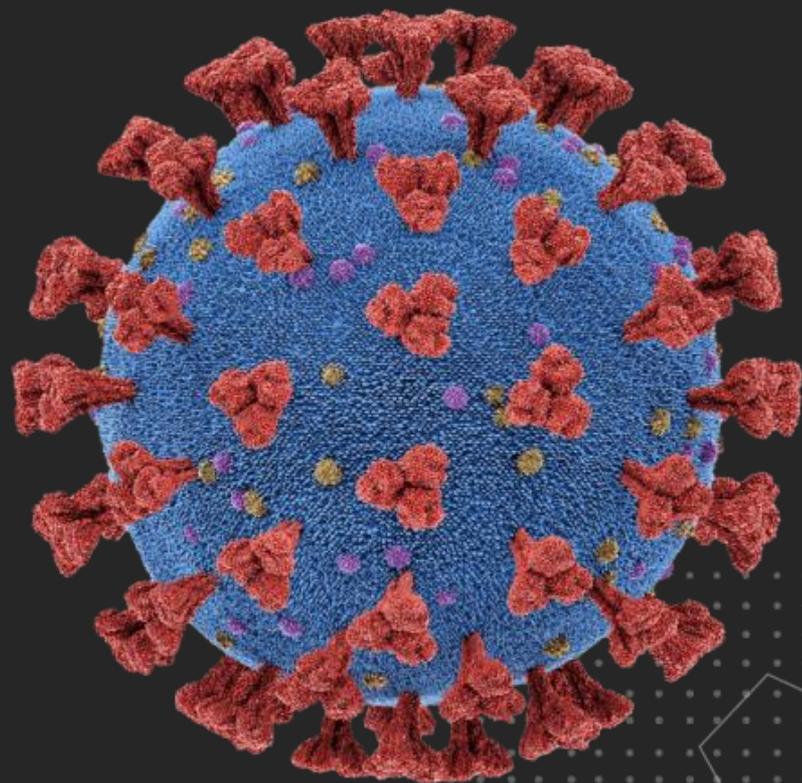
Вирусы настолько малы, что их можно увидеть только с помощью электронного микроскопа.

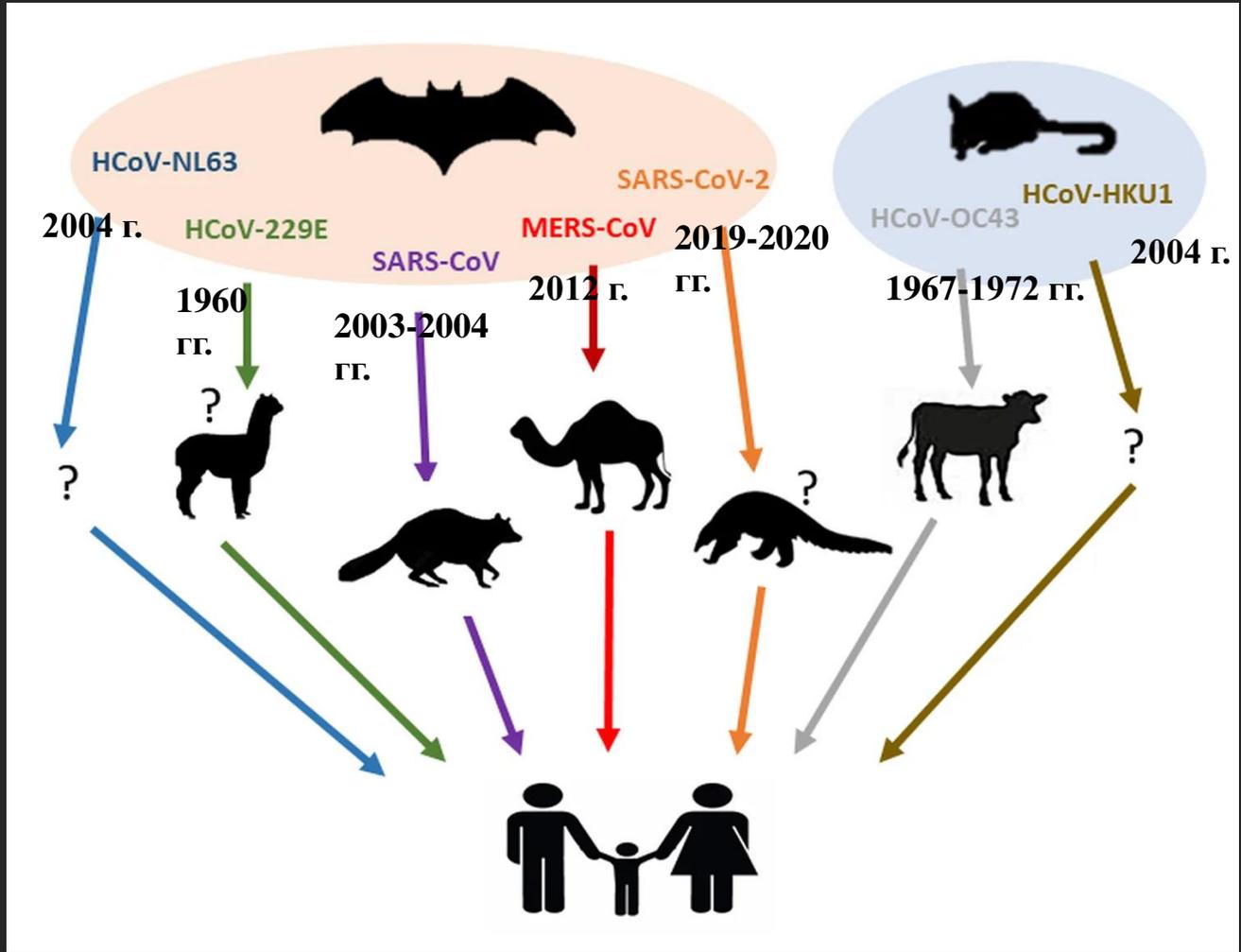


Введение: коронавирусы

КОРОНАВИРУСЫ (*Coronaviridae*)

распространены повсеместно и имеют широкий круг хозяев среди млекопитающих и птиц, вызывая у восприимчивых животных разнообразные по тяжести и клиническим проявлениям заболевания респираторного тракта, гастроэнтериты, гепатиты и поражения ЦНС.





Коронавирусы, выявленные у людей, имеют зоонозное происхождение, т.е. преодолели межвидовые барьеры

Коронавирус SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), который вызвал пандемию новой болезни человека - COVID-19 (coronavirus disease, коронавирусной болезни 2019 года), имеет общее для всех известных коронавирусов строение вириона и размер 90-140 нм.

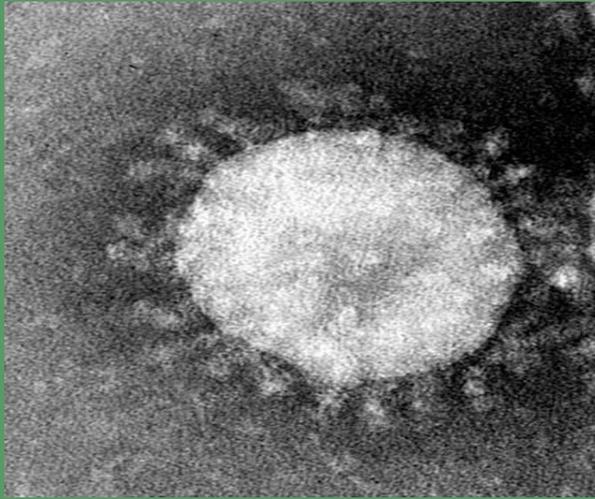


Фото вириона SARS-CoV-2 при электронной микроскопии

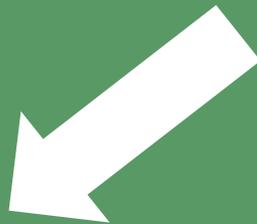
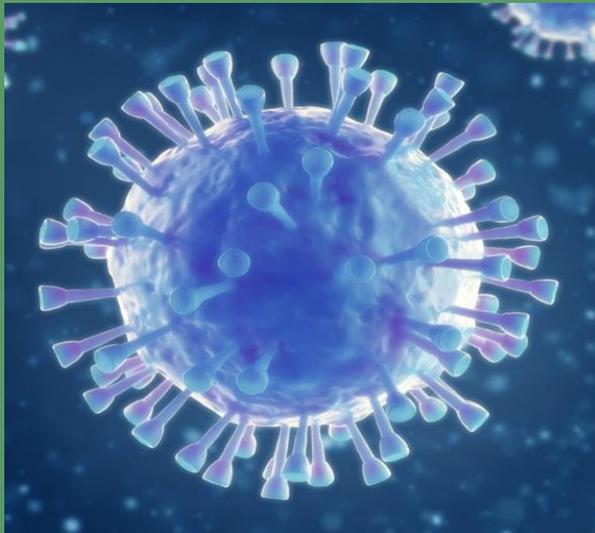
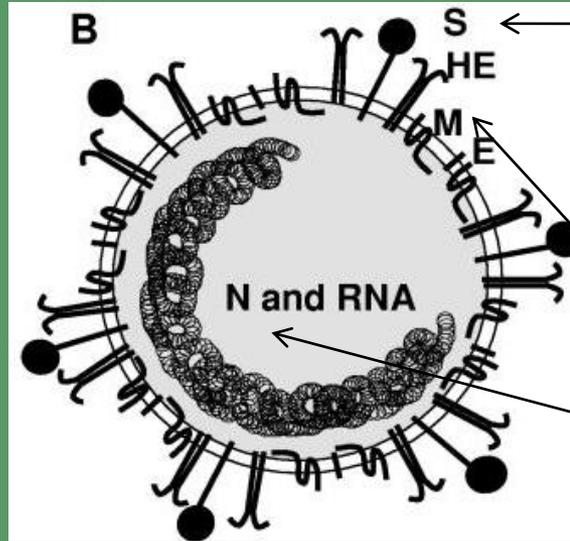


Рисунок коронавируса

Схема вириона [2]



Основные структурные белки:

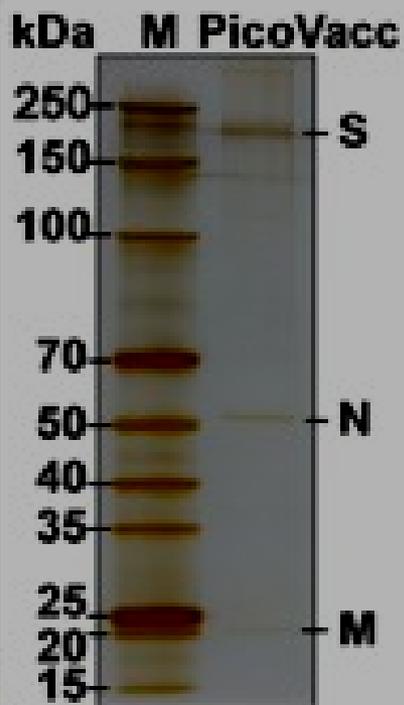
S (spike) – наружный белок, буловидные пепломеры, сформированные тримерами. Вызывает синтез нейтрализующих антител.

M (membrane) – трансмембранный белок.

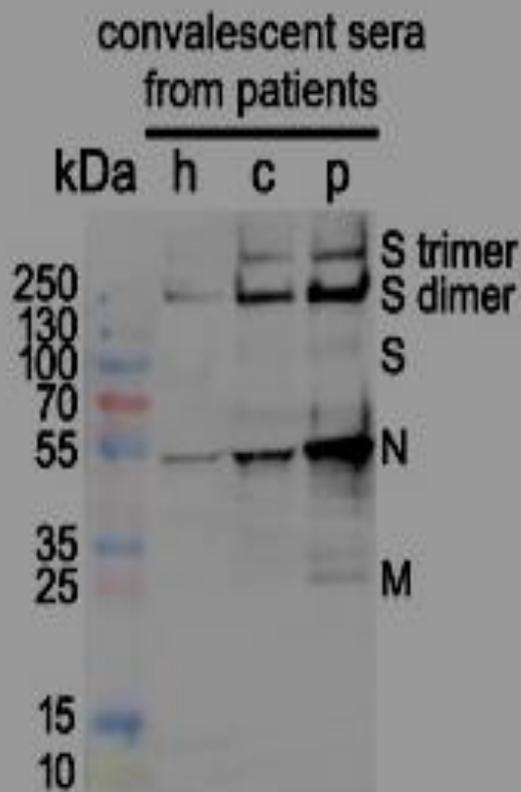
N (nucleocapsid) защищает РНК.

Массы биологических макромолекул выражаются в килодальтонах.
кДа = 10^3 Да

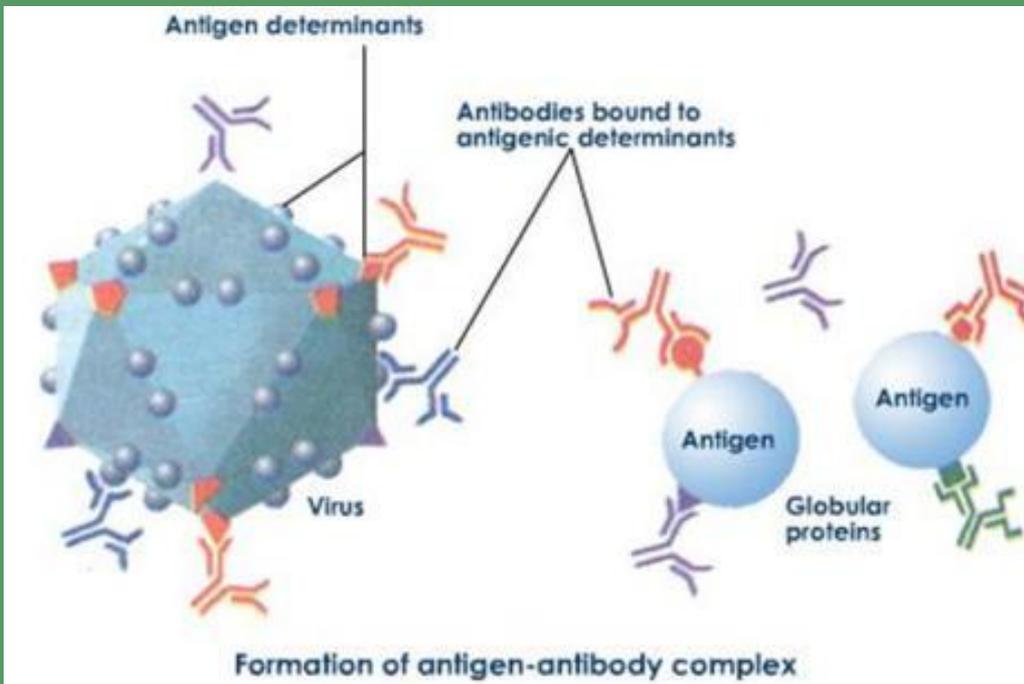
Да (Дальтон) это атомная единица массы = $1/12$ массы свободного покоящегося атома углерода.



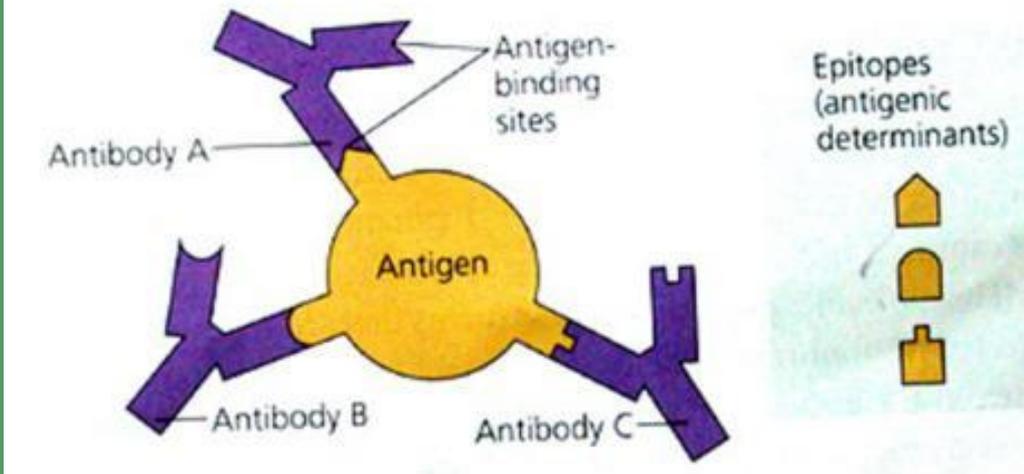
1. По лит. данным структурные белки SARS-CoV-2, выявленного от людей в Китае, имеют молекулярные массы:
S - 180 кДа;
N – 48-50 кДа;
M - 25 кДа [3]



2. Антитела сывороток крови переболевших (реконвалесцентов) специфически взаимодействуют с белками SARS-CoV-2 – с белком S в трех модификациях на уровне 90, 180 и 270 кДа [4]



3. Имму́нная реакция антигенов с антителами ((<https://yandex.ru/images>))



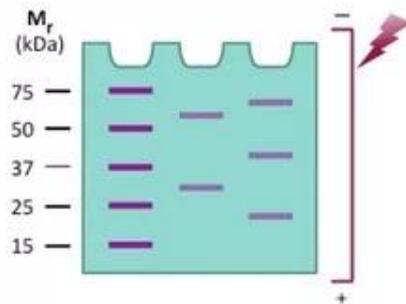
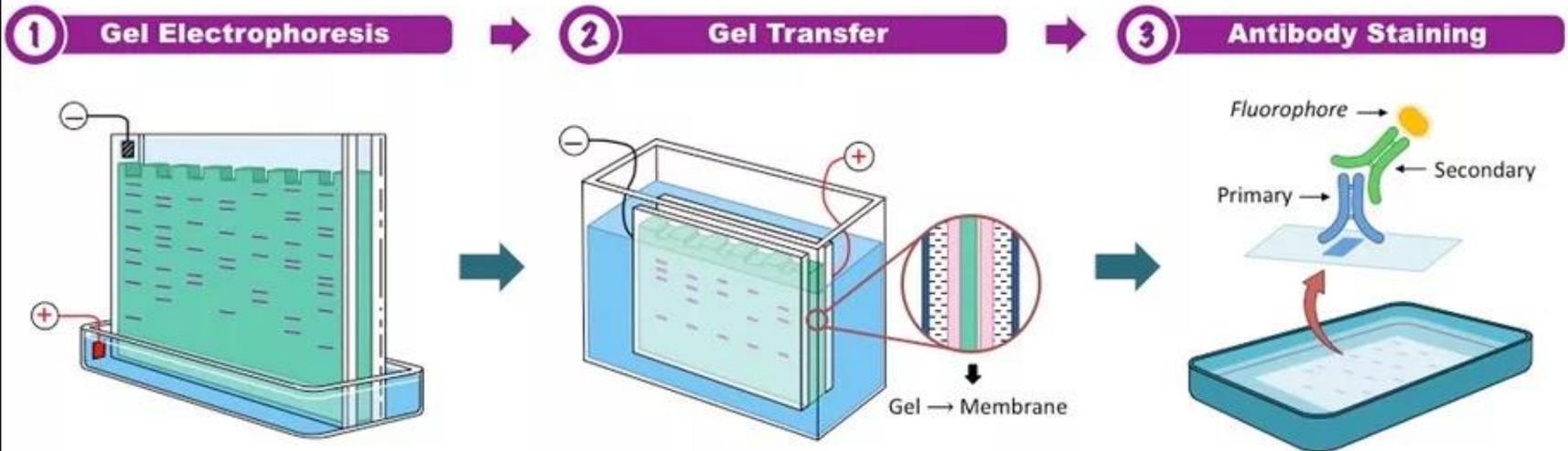
Материалы и методы



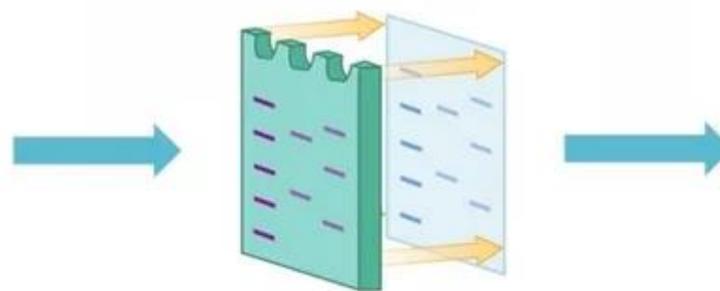
Использован вирусный препарат штамма SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020, полученного на основе вирусного изолята, выделенного в г. Новосибирске из клинического образца (мазка из носоглотки), как описано в [5]. Очищенный, концентрированный, инактивированный вирусный препарат любезно предоставлен д-ром биол. наук, проф. Чепурновым А.А.



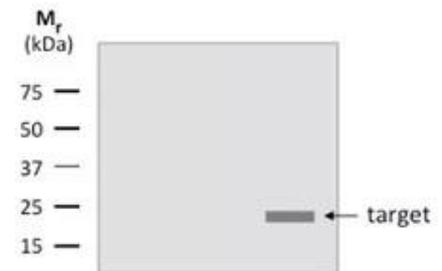
Метод электрофореза белковых препаратов в полиакриламидном геле (пааг) с добавлением додецилсульфата натрия



Electric charge separates proteins according to size



Proteins transferred to a solid support membrane



Proteins stained with specific antibodies for visualisation

Материалы и методы



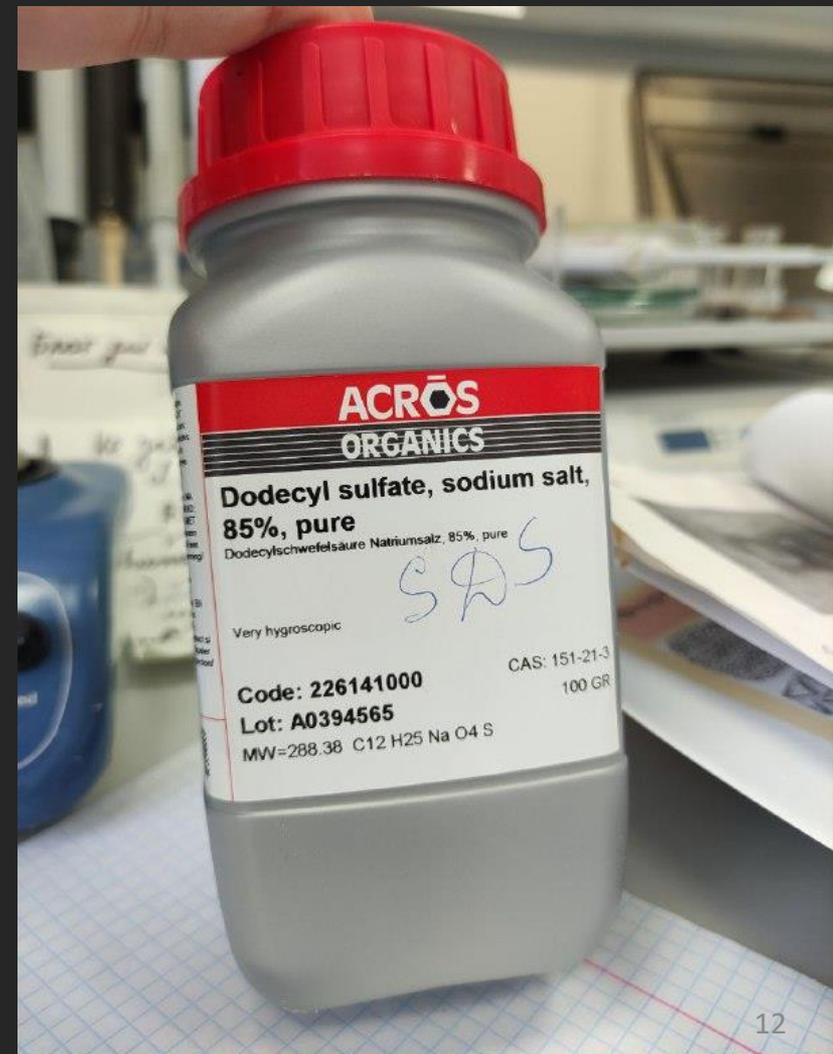
Вирусный препарат инактивирован (в соотношении 1:2) в лизирующем растворе (состав на объем 2 мл):

0,5 мл 1M Tris-HCl с pH 6,8;

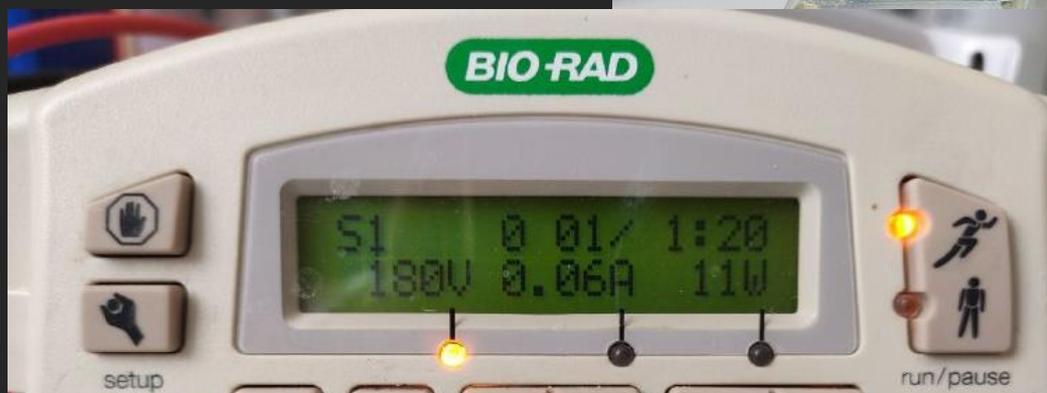
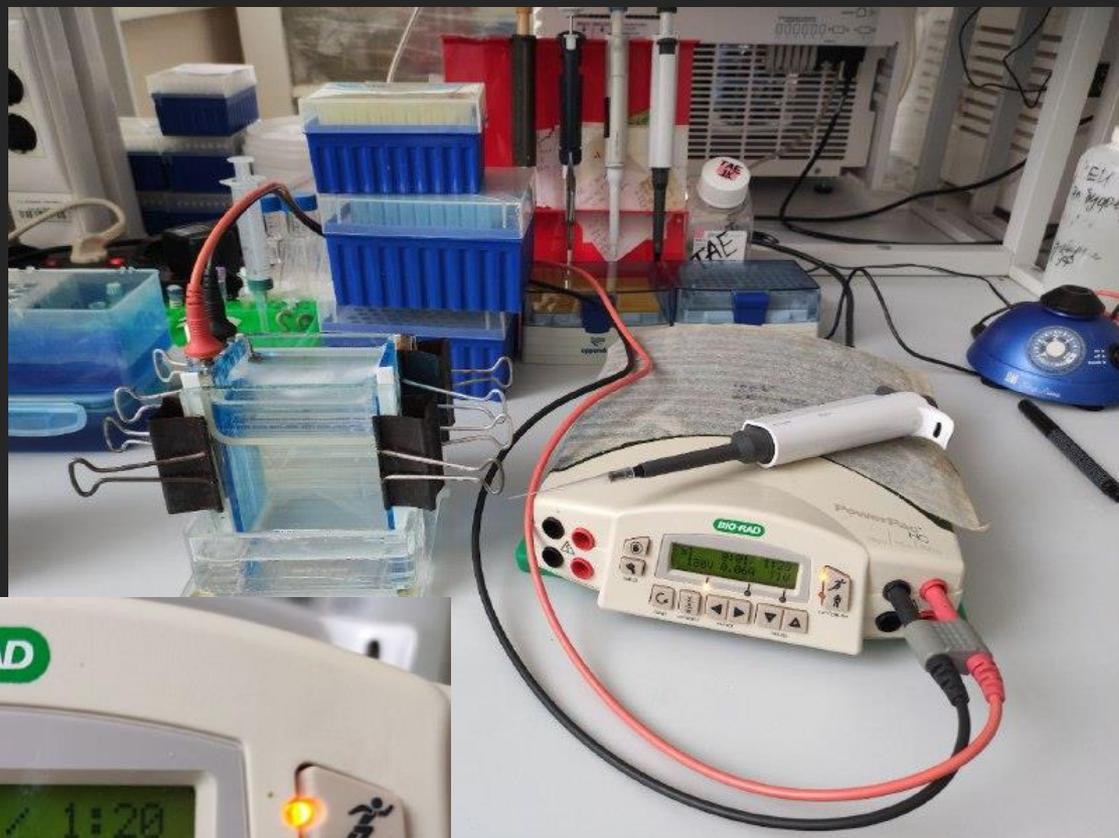
10% раствор додецилсульфата натрия (SDS) – 0,8 мл;

глицерин – 0,2 мл; меркаптоэтанол – 0,2 мл;

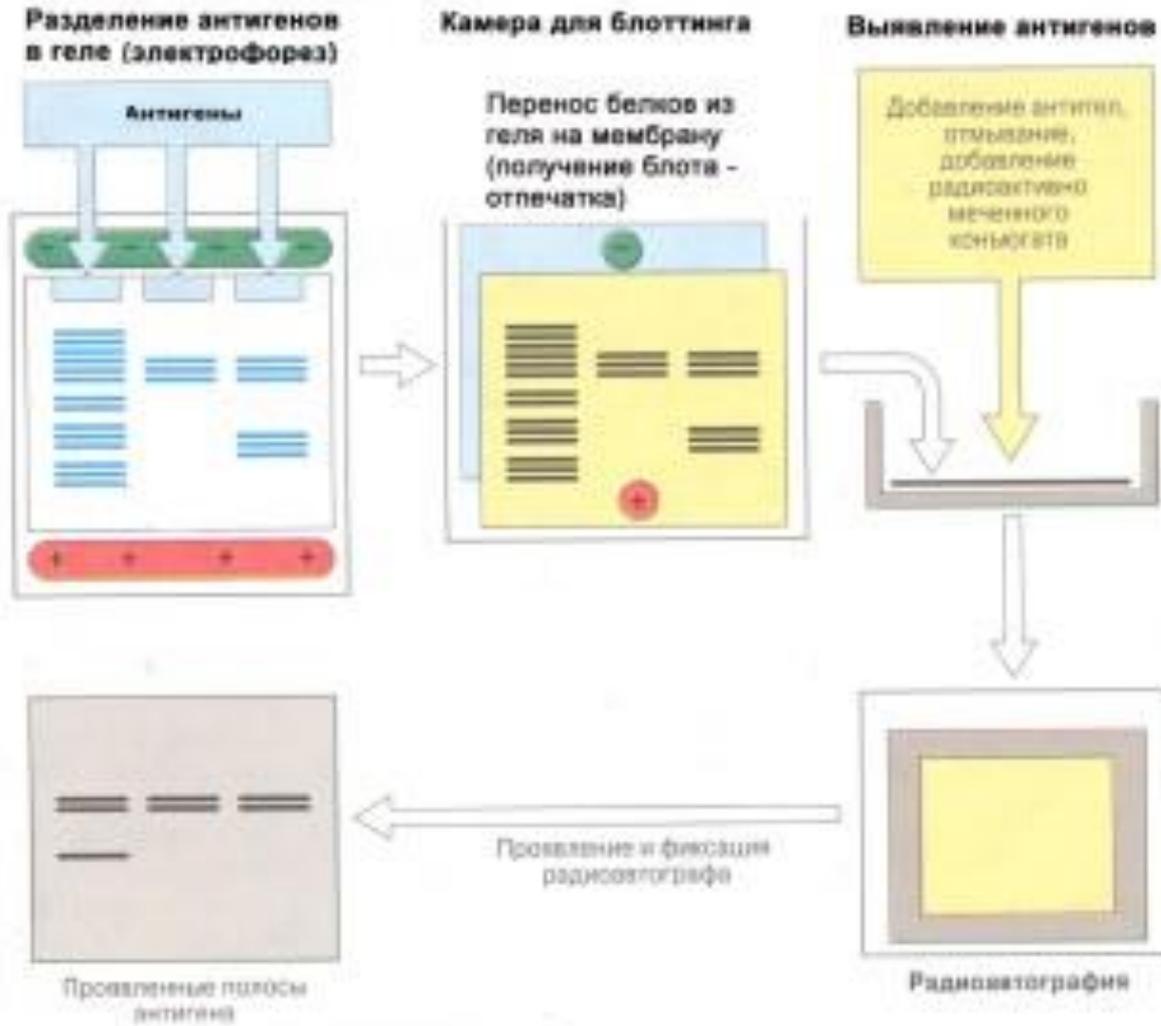
0,4% Bromphenol Blue Na-sulf – 0,1 мл).



Метод электрофореза белковых препаратов в полиакриламидном геле (пааг) с добавлением додецилсульфата натрия



Процедура иммуноблоттинга

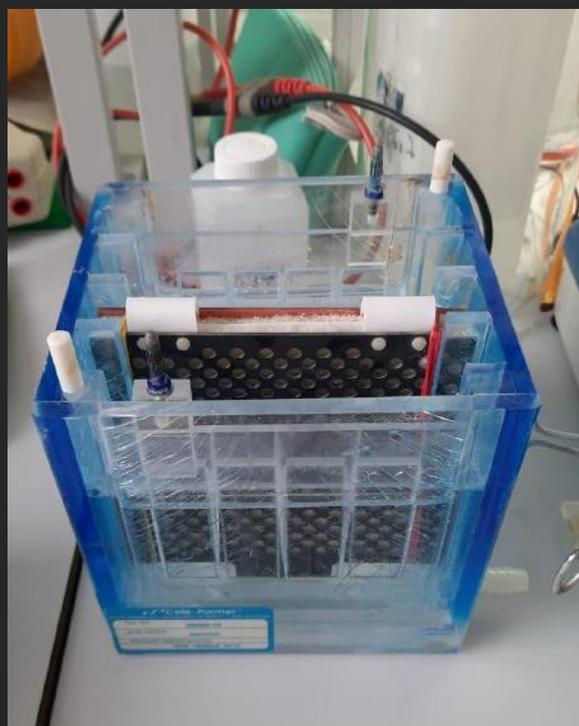
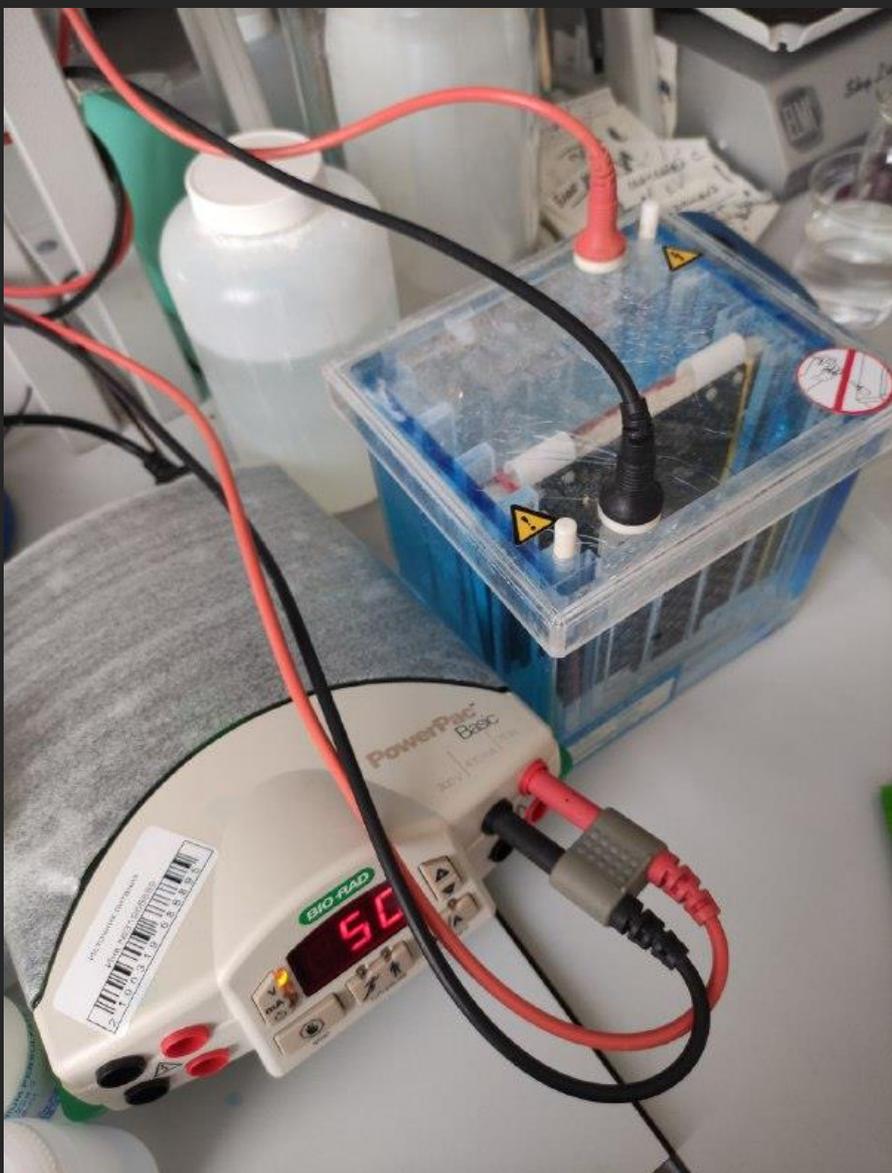


Материалы и методы



Иммунную реакцию на нитроцеллюлозной мембране проявляли в 10 мл физ. раствора с хромогеном (10 мг 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорида) с 100 мкл 3%-го раствора перекиси водорода. Реакцию останавливали отмыванием мембраны в ТСБ-Т буфере (трис-солевой буфер с твином, содержащий 0,15М NaCl; 0,02М трис-HCl pH 7,4; 0,05% твин-20).





МЕТОД ИММУНОБЛЮТИНГА

Материалы и методы



Электрофорез вирусных белков в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с добавлением додецилсульфата натрия и иммуноблоттинг проводили по методикам описанным в работе (Чепурнов А.А. и др., 2020).

Белковые маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific, США).

Окраску гелей проводили при помощи раствора Кумасси G-250, отмывку в дист. воде кипячением в течение 10 мин.

Пероксидазный конъюгат антивидовых антител (Gout anti human, Sigma).

Цитопатическое действие (ЦПД) инфекционного SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 на культуру клеток Vero (почка африканской зеленой мартышки).

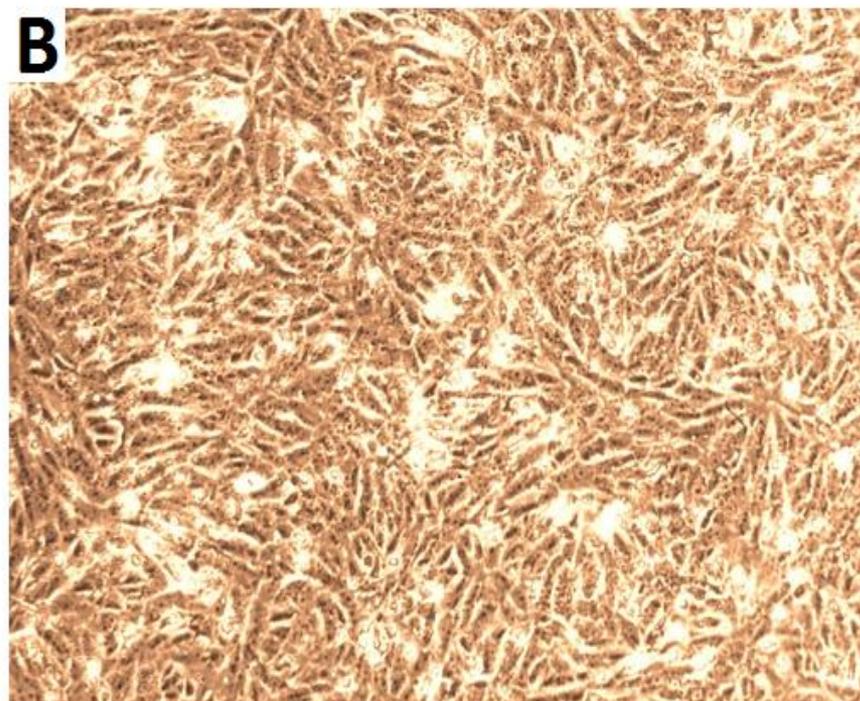
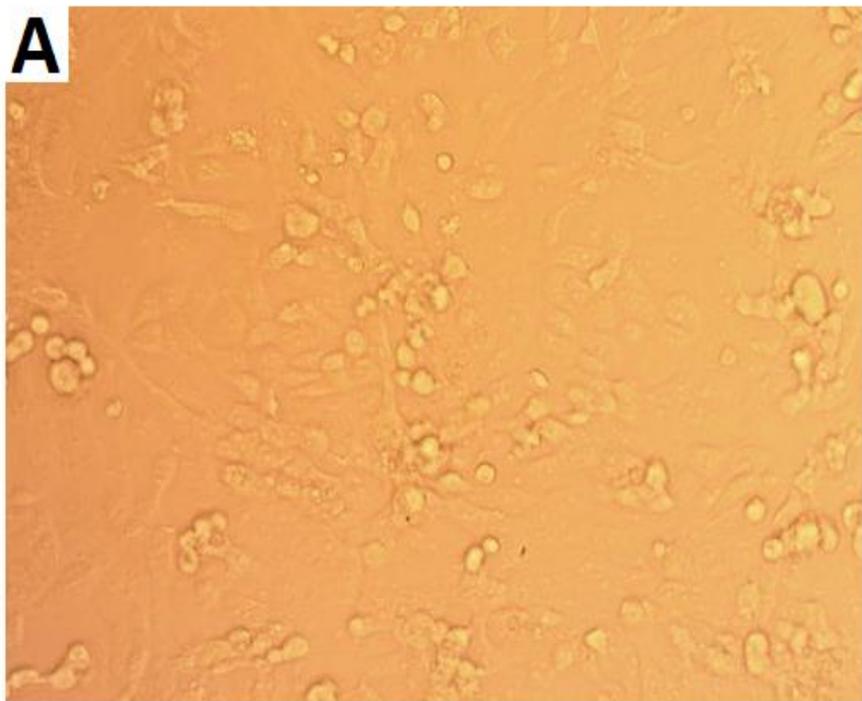


Фото из статьи (Чепурнов А.А. и др. Антигенные свойства изолята коронавируса SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/202, выделенного от пациента в Новосибирске. Журнал инфектологии. 2020;12(3):42-50).

**А – проявление ЦПД изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 на клетках Vero на 3 сутки после заражения (третий пассаж).
В – контроль клеток Vero.**

Электрофореграмма очищенного, концентрированного, инактивированного препарата SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020



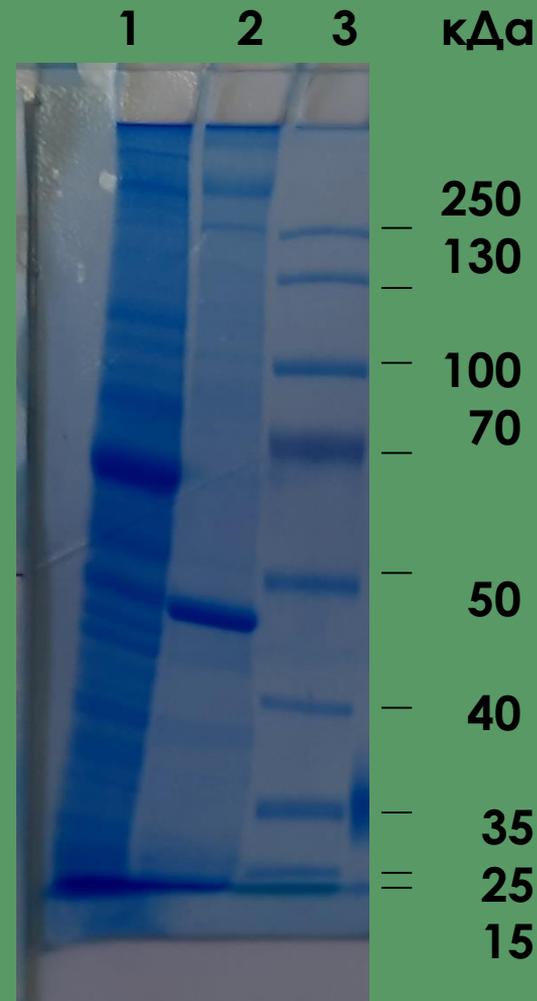
S тример →

S димер →

S мономер →

N →

M →

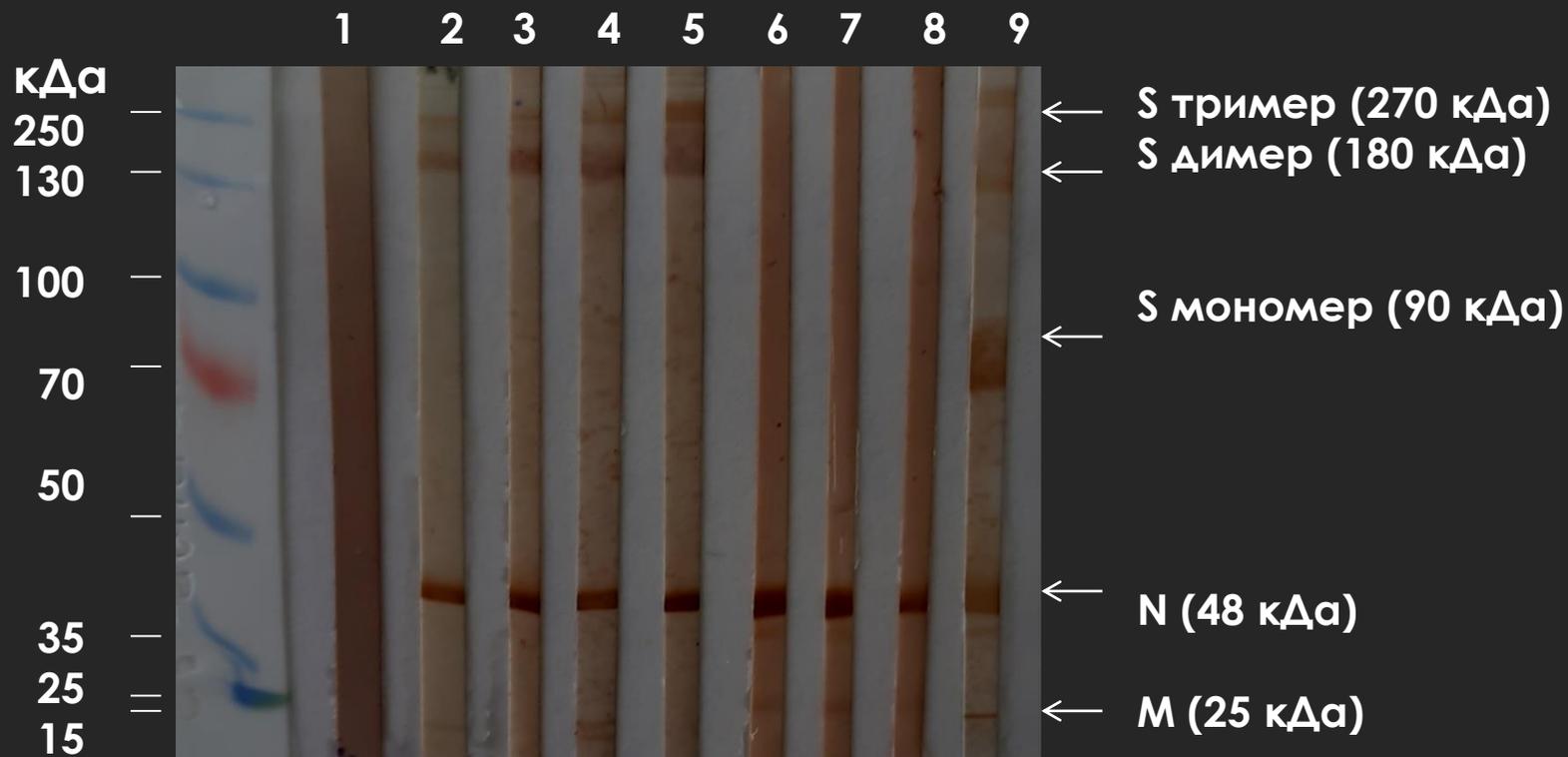


1. неочищенный вирусный препарат (15 мкл);
2. очищенный препарат SARS-CoV-2 (15 мкл);
3. белковые маркеры (5 мкл)

МЕТОД ИММУНОБЛОТИНГА



Результат взаимодействия в иммуноблоттинге белков инактивированного препарата **SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020** с **COVID-19** антителами, присутствующими в сыворотках крови реконвалесцентов с диагнозом



1. отриц. контроль (сыворотка крови здорового человека); 2, 3, 4, 5, 9 – у пациентов был диагноз «пневмония» с высокой температурой;
- 6, 7, 8 -реконвалесценты с легким течением болезни.

Результаты



1. Методом электрофореза показано, что очищенный, концентрированный, инактивированный SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 содержит основные структурные белки: гликопротеин **S (spike) на уровне выше 250 кДа, нуклеопротеин N (nucleoprotein) – 48 кДа и матриксный M (membrane) - 25 кДа**, что соответствует литературным данным по вирусному штамму, выделенному в Китае (Gao Q., Bao L., Haiyan M. et al. *Rapid Development of an Inactivated Vaccine Candidate for SARS-CoV-19. Science. 2020. eabc1932*).
2. Методом иммуноблоттинга определены основные вирусные иммуногены - **гликопротеин S в трех модификациях – тример (выше, чем 250 кДа), димер (180 кДа) и мономер на уровне 90 кДа**, а также **нуклеопротеин N (48 кДа) и матриксный белок M (25 кДа)**, выявляемые антителами сывороток крови реконвалесцентов с диагнозом COVID-19, что также соответствует литературным данным китайских исследователей (). Wang H., Zhang Y., Huang B. et al. [Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. Cell. 2020 Aug 6;182\(3\):713-721.e9](#)

Заключение



Очищенный, концентрированный, инактивированный SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 содержит белки, выявляемые антителами сывороток крови реконвалесцентов с диагнозом COVID-19. Особый интерес представляет выявление антител, специфичных к белку S, т.к. только этот вирусный иммуноген вызывает синтез антител, нейтрализующих вирус в организме ([Jeyanathan M.](#), [Afkhami S.](#), [Smaill F.](#), [Miller M.S.](#), [Lichty B.D.](#), [Xing Z.](#) *Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. Nat Rev Immunol. 2020 Oct;20(10):615-632*).

Таким образом, инактивированный вирусный препарат можно использовать для иммуноферментной диагностики COVID-19, в частности, при исследовании методом иммуноблоттинга специфичности антител сывороток крови реконвалесцентов и людей, участвующих в программе вакцинации.

ИСТОЧНИКИ



- [1] ([Zi-Wei Ye](#), [Shuofeng Yuan](#), [Kit-San Yuen](#), [Sin-Yee Fung](#), [Chi-Ping Chan](#), [Dong-Yan Jin](#). Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci*. 2020 Mar 15;16(10):1686-1697. doi: 10.7150/ijbs.45472).
- [2] ([Weiss S.R.](#), [Navas-Martin S.](#), 2005)
- [3] ([Gao Q.](#) et al., Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2/ *Science*. 2020 Jul 3;369(6499):77-81).
- [4] ([Wang H.](#) et al. Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. *Cell*. 2020 Aug 6;182(3):713-721.e9).
- [5] (Чепурнов А.А., Шаршов К.А., Казачинская Е.И., Кононова Ю.В., Казачкова Е.А., Хрипко О.П., Юрченко К.С., Алексеев А.Ю., Воевода М.И., Шестопалов А.М. Антигенные свойства изолята коронавируса SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/202, выделенного от пациента в Новосибирске. *Журнал инфектологии*. 2020;12(3):42-50. [Электронный ресурс]. URL: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2020-12-3-42-50>).

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

