Слайд 1

Здравствуйте, уважаемые члены экзаменационной комиссии. Вашему вниманию представляется доклад по результатам выполнения ВКР на тему «Получение и характеристика фрагмента фибриллы аденовируса 5 серотипа».

Слайд 2

Аденовирусы являются патогенами, вызывающими инфекции верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, конъюнктивы глаза и мочевыводящих путей. Аденовирусы не вызывают тяжелых заболеваний, при этом особый риск данная инфекция представляет для людей с ослабленным иммунитетом, детей и пациентов, перенёсших операцию по трансплантации органов. Многообразие клинических форм проявление инфекции и случаи локальных эпидемических вспышек, вызываемых данными патогенами, широкая распространенность аденовирусов и способность вызывать серьёзные патологии у иммунокомпрометированных пациентов обуславливает необходимость в эпидемиологическом надзоре за инфекцией.

Слайд 3

Антигенная структура Ад обладает стабильностью. Основные структурные белки вириона аденовируса, на которых расположены группоспецифические и типоспецифические антигены, представлены на слайде. Это, соответственно гексон, пентон и фибрилла. Фибрилла аденовируса содержит типоспецифические эпитопы и структурно подразделяется на С-концевую глобулярную структуру (fiber-knob), и N-концевой участок, связанный с пентоном.

Слайд 4

При проникновении в клетку, глобулярный домен fiber knob связывается с клеточным рецептором. Его трехмерная структура изображена на слайде. Цветами показаны отличия в структуре у различных серотипов. Эти отличия подтверждаю его типоспецифичность.

Слайд 5

При условии, что аденовирусы являются естественными патогенами, вектора на их основе нашли широкое применение в биотехнологии. В настоящее время на разных стадиях клинических испытаний находятся около 200 векторов для профилактики и борьбы с такими инфекциями как ВИЧ, грипп, малярия, … Однако наличие антител против аденовируса у пациентов, проходящих векторную терапию, может блокировать действие вектора, и вызывать нежелательные реакции, что обуславливает необходимость в диагностике.

Слайд 6

Для выявления нейтрализующих антител к Ад в настоящее время используется реакция нейтрализации, для постановки которой необходима хорошо оснащенная вирусологическая лаборатория, квалифицированный персонал, наличие вируса, а постановка анализа занимает продолжительное время (4-5 суток).

На сегодняшний день наблюдается переход от сложных вирусологических исследований к относительно простому тесту, на основе реакции «антиген-антитело», однако при конструировании ИФА тест-систем для определения антител к Ад 5 необходим подбор антигена.

Слайд 7

Цель работы – получить и охарактеризовать синтетический фрагмент белка фибриллы аденовируса 5 серотипа, определить его специфическую активность и иммуногенность.

Слайд 8

Задачи работы представлены на слайде, позвольте их не зачитывать.

Слайд 9

Научная новизна данной работы в том, что была разработана оригинальная технология получения фрагмента фибриллы аденовируса 5 серотипа, который может быть использован для изучения наличия вируснейтрализующих антител к аденовирусу 5 типа в человеческой популяции.

Слайд 10

Практическая значимость заключается в необходимости разработки отечественных высокоспецифичных тест-систем для изучения наличия вируснейтрализующих антител к аденовирусу 5 типа в человеческой популяции.

Слайд 11

На данном слайде представлена целевая аминокислотная последовательность домена белка fiber-knob.

Слайд 12

Нуклеотидная последовательность вектора pET28a (+) со вставкой knobAdeno5, окрашенной зеленым цветом, показана на слайде. Сайты рестрикции XhoI и NdeI.

Слайд 13

Для экспрессии фрагмента гена фибриллы, кодирующего домен Adeno5Knob, использовали штамм-продуцент E. coli BL21/pET28a-knobAdeno5. Культуру продуцента последовательно культивировали на среде LB в 100 мл и 1000 мл колбах Эрленмейера. Индукция проводилась ИПТГ.

Слайд 14

Экспрессию синтетического белка подтверждали электрофорезом в ПААГ. По результатам постановки белок синтезировался штаммом-продуцентов через 1,5-3 часа после индукции. Молекулярная масса белка примерно 23 кДа.

Слайд 15

Лизис клеток штамма-продуцента проводили соникацией. Лизат клеток осветляли центрифугированием. Тонкую очистку белка проводили методом металл-аффинной хроматографии. В данной работе использовался сорбент с иммобилизованным кобальтом. На слайде представлена хроматограмма процесса очистки белка Adeno5Knob. Синим цветом показано поглощение на длине волны 280 нм, розовым отмечена элюция, красным — собранные фракции. Фракции 14-30 соответствуют элюции не связавшегося с сорбентом клеточного дебриса. Фракции, имеющие поглощение более 150 mAU, – 45-52 соответствующие пику целевого продукта, собирали и объединяли. Наличие фракций, имеющих поглощение до 150 mAU, элюируемых после целевого продукта объясняется наличием имидазола, входящего в состав элюента и поглощающего излучение при длине волны 280 нм. Для удаления имидазола и примесных солей использовали диализ против ФСБ. В итоге было получено 1,7 мг (6,7 мл раствора белка Adeno5Knobс концентрацией 0,26 мг/мл).

Слайд 16

Для оценки специфической активности синтетического белка Adeno5Knob проводили методом ИФА с использованием очищенного концентрата аденовируса 5 серотипа в качестве препарата сравнения. В постановке использовали сыворотки крови людей (n = 49), содержащие антитела к Ад 5 серотипа по результатам реакции микронейтрализации. Согласно результатам, сыворотки обладали специфической активностью как к белку fiber-knob, так и к окAd5.

Слайд 17

Расхождения в титрах могут быть связаны с различной концентрацией антител против различных белков аденовируса. Поскольку очищенный концентрат вируса содержит помимо белка фибриллы другие структурные белки, эпитопы на поверхности этих белков могут выступать в качестве антигенных детерминант по отношению к поликлональным антителам против аденовируса, содержащимся в сыворотке. Возможно предположить, что содержание антител к домену «fiber-knob» аденовируса у них различалось.

Слайд 18

Для исследования иммуногенности синтетического белка Adeno5Knob было сформировано 2 группы мышей, которых иммунизировали дважды с интервалом в 3 недели, внутрибрюшинно, вводя синтетический белок Adeno5Knob по 20 - 40 мкг/ мышь. Раствор белка готовили в ФСБ с добавлением или без адъюванта (гидроокись алюминия). Забор проб крови у экспериментальных мышей проводили на 21 и 42 дни после первой иммунизации. Наличие специфических антител в сыворотках иммунизированных животных исследовали в ИФА с использованием окAd5 и Adeno5Knob в качестве антигенов. На слайде представлены результаты ИФА (42 день). На графике представлены уровни антител у мышей, иммунизированных с адьювантом. Внутрибрюшинная иммунизация синтетическим белком Adeno5Knob стимулировала прирост анти-Adeno5Knob и анти-окAd5 специфических антител в случае иммунизации с адъювантом. У мышей, иммунизированных без адъюванта, прироста антител к использованным антигенам не выявлено на протяжении исследования.

Слайд 19

Заключения по проделанной работе представлено на слайде. Позвольте не зачитывать.

Слайд 20

На данном слайде представлены публикации по проделанной работе.

Слайд 21

Благодарю за внимание!