

УДК 57.083.2; 578.53; 578.832.1

## Получение и характеристика панели моноклональных антител, специфичных к белку NS1 вируса гриппа А

© 2017 В.З. КРИВИЦКАЯ\*, Е.В. СОРОКИН, Т.Р. ЦАРЕВА, М.В. СЕРГЕЕВА, Р.А. КАДЫРОВА, Е.А. РОМАНОВСКАЯ–РОМАНЬКО, А.А. ШАЛДЖЯН, С.В. ПЕТРОВ, Е.Р. ПЕТРОВА, Н.И. КОНОВАЛОВА, П.А. ПЕТРОВА

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации (НИИ гриппа), Санкт-Петербург, 197376

e-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru\*

Поступила 02.02.2017 г.

Принята в печать 12.04.2017 г.

Получена панель из семи новых моноАТ, специфически взаимодействующих в непрямом ИФА с фрагментом белка NS1<sub>1-124</sub> вируса A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), а также с полноразмерным нативным белком NS1 в клетках, инфицированных вирусами гриппа А различных субтипов (A(H1N1), A(H1N1)pdm09, A(H2N2), A(H3N2) и A(H9N2)). Предложен чувствительный вариант микрокультурального ИФА с использованием полученных моноАТ, который может быть применен для детекции белка NS1 в инфицированных клетках и анализа его антигенной изменчивости. Результаты микрокультурального ИФА свидетельствуют о типологической и субтипоспецифической антигенной вариабельности белка NS1 вируса гриппа.

**Ключевые слова:** антигенная и генетическая изменчивость NS1, белок NS1, вирус гриппа, микрокультуральный ИФА, моноклональные антитела.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-5-61-72

Совместная эволюция вирусов и их хозяев привела, с одной стороны, к возникновению целого комплекса механизмов защиты от инфекции со стороны иммунной системы инфицированного организма, включая выработку интерферонов, а с другой, к появлению вирусов, способных препятствовать развитию направленного против них иммунного ответа хозяина. Ключевую роль в одном из таких адаптационных механизмов у вирусов гриппа выполняет белок NS1.

NS1 – неструктурный белок вируса гриппа А – состоит из 217–237 АК, формирующих два функ-

циональных домена: N-концевой РНК-связывающий (1–73 АК), который взаимодействует с дунитевыми РНК, образующимися в процессе репликации вирусов и запускающими противовирусный ответ, и С-концевой эффекторный (начиная с 74-й АК), способный образовывать комплексы с рядом клеточных белков.

Белок NS1 играет важную роль в патогенезе гриппозной инфекции, выполняя целый ряд регуляторных функций. Он вовлечен в контроль над репликацией вируса, регулируя активность вирусной РНК-полимеразы и стимулируя трансляцию

*Список сокращений:* АК- аминокислота (аминокислотный); АТ – антитела; БСА – бычий сывороточный альбумин; ИФА – иммуноферментный анализ; мк-ИФА – микрокультуральный ИФА; ММ – молекулярная масса; моноАТ – моноклональные антитела; НМ – нитроцеллюлозная мембрана; ОП<sub>450</sub> – оптическая плотность при длине волны 450 нм; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ПЭГ 1000 – ПЭГ со средней ММ 1000; среда LB – среда Луриа–Бертани; ТИД<sub>50</sub> – доза, инфицирующая 50% клеток культуры; ТМБ – 3,3',5,5'-тетрамилбензидин; ЭФ – электрофорез; delNS – делеция гена NS; НАТ – селективная среда с гипоксантином, аминоптеринном и тимидином; Ig – иммуноглобулин; IgG – иммуноглобулин класса G; IL-4 – интерлейкин-4; Inf – интерферон; MOI (Multiplicity Of Infection) – множественность заражения вирусом; IPTG – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; NP – нуклеопротеин вируса гриппа; NS1 – один из неструктурных белков вируса гриппа; PBS – фосфатно-солевой буфер; PBS-БСА – PBS с добавлением БСА; PBS-M – PBS с добавлением обезжиренного молока; PBS-T – PBS с добавлением твина-20; rNS1<sub>124</sub> – рекомбинантный белок, содержащий первые 124 аминокислотных остатка белка NS1 вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934; SDS – додецилсульфат натрия; β-ME – β-меркаптоэтанол.

специфических вирусных мРНК, и является мощным антагонистом интерфероновой системы хозяина. Он может блокировать выработку Inf инфицированными клетками по крайней мере двумя путями: ингибируя активацию транскрипционного регуляторного фактора интерферона 3 (IRF3) и взаимодействуя с клеточным фактором CPSF30 (Cellular cleavage and Polyadenylation Specificity Factor), участвующим в процессинге мРНК. В результате такого взаимодействия образуется комплекс CPSF30/NS1, способствующий накоплению незрелых премРНК в ядре клетки и тормозящий появления в цитоплазме зрелых мРНК, включая Inf-специфические [1, 2].

Белок NS1 вируса гриппа напрямую или опосредованно отвечает за экспрессию ряда цитокинов. Так, инфицирование клеток вирусом гриппа с делецией гена NS приводила к подавлению синтеза мРНК IL-4 и активации синтеза мРНК IL-10 [3].

Вирусы, лишённые гена NS1, характеризуются сниженными репликативными и патогенными свойствами [4].

Между тем остаются совершенно неизученными функции анти-NS1-антител в инфицированном организме. NS1 является неструктурным внутриклеточным белком, и поэтому он менее доступен для АТ, чем белки, входящие в состав вирусной частицы. Тем не менее, АТ к NS1 выявлены в высоких титрах в крови пациентов, инфицированных вирусом А(Н5N1) [5]. В дополнение к этому, сайты, кодирующие последовательности антигенных детерминант белка NS1 подвержены позитивной селекции, что указывает на наличие соответствующего иммунного пресса [6].

В модельных экспериментах показано, что реакция АТ с определенными АК эффекторного домена белка NS1 препятствует взаимодействию NS1 с двунитевой РНК [7] или клеточными компонентами (такими, как CPSF30 и eIF4GI (eukaryotic translation Initiation Factor 4 Gamma I), играющими заметную роль в процессинге мРНК) [8], что приводит к значительному подавлению репликации вирусов гриппа А.

Все вышеизложенное свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения роли в патогенезе гриппа как белка NS1, так и взаимодействующих с ним АТ. Моноклональные антитела могут служить эффективным инструментом для решения этих задач. МоноАТ с успехом применяют для эпитоного картирования белка NS1 и характеристики полиморфизма его структуры, а также для изучения его функций [7, 9–11].

Цель настоящей работы состояла в создании и характеристике панели моноАТ, специфичных к белку NS1 вируса гриппа А.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Вирусы, клетки, моноклональные антитела

Использовали штаммы вируса гриппа дикого типа с полноразмерным немодифицированным геном NS1: A/Puerto Rico/8/1934/Mount Sinai (A/PR/8/1934) (H1N1); A/Beijing/262/1995 (H1N1); A/New Caledonia/20/1999 (H1N1); A/California/07/2009 (H1N1)pdm09; A/Singapore/1/1957 (H2N2); A/Panama/2007/1999 (H3N2); A/Wisconsin/67/2005 (H3N2); A/Brisbane/10/2007 (H3N2); A/Texas/50/2012 (H3N2); A/Hong Kong/1/1968 (H3N2); A/duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2); A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3); A/Hong Kong/1073/99 (H9N2); B/Brisbane/60/2008 (Викторианской эволюционной линии); B/Massachusetts/02/2012 (Ямагатской эволюционной линии). Указанные штаммы были предоставлены Институтом Фрэнсиса Крика (Лондон). Штаммы A/Saint Petersburg/5/2009 (H1N1)pdm и A/Kaliningrad/53/2015 (H1N1)pdm были получены из коллекции музея вирусов ОРЗ ФГБУ «НИИ гриппа».

В данной работе использовали также полученные методом обратной генетики рекомбинантные вирусы A/Puerto Rico/8/1934 delNS1 (A/PR-/8/34 delNS1) (имеющий делецию всей последовательности, кодирующей белок NS1); A/Puerto Rico/8/1934 (с укороченным белком NS1, содержащим только первые 124 АК, и гетерогенной вставкой белка ESAT-6 *Mycobacterium tuberculosis* (A/PR/8<sub>(1-124)</sub>-ESAT)), а также 6:2-реассортант вируса A/Hong Kong/1/1968 (с внутренними генами вируса A/Puerto Rico/8/1934, укороченным белком NS1 и вставкой белка теплового шока (A/НК-PR/8<sub>(1-124)</sub>-HspX)). Перечисленные три штамма являются авторскими разработками и любезно предоставлены лабораторией молекулярной вирусологии и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа».

Культура клеток MDCK (London Line) была получена из коллекции IRR, США (# FR-58), клетки культуры WHO Vero были получены из Европейской коллекции клеточных культур (Великобритания, ECACC, # 88020401).

При анализе свойств новых моноАТ использовали коммерческие моноАТ 1A10 и 1A4A («Биалекса», Москва) и ab181436 (Abcam, Великобритания) к белку NS1 вируса гриппа А. Для оценки репродукции вирусов в культуре клеток использовали типоспецифичные моноАТ к белку NP

вирусов гриппа А (моноАТ 6D11) и вирусов гриппа В (моноАТ 2/3), полученные в ФГБУ «НИИ гриппа».

#### Получение рекомбинантного белка rNS<sub>124</sub> вируса гриппа А/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

Оптимизацию для экспрессии в *E. coli*, синтез и встраивание в вектор pET22b нуклеотидной последовательности, кодирующей рекомбинантный белок rNS<sub>124</sub> (первые 124 АК белка NS1 вируса гриппа А/PR/8/1934) или фрагмент белка GP вируса Эбола, осуществляла компания «Евроген» (Москва). Для получения штамма-продуцента клетки *E. coli* BL21(DE3) Codon plus («Евроген») трансформировали плазмидой pET22b/rNS<sub>124</sub> («Евроген»). Трансформированные бактерии выращивали в среде LB (Becton Dickinson, Франция) с ампициллином («Синтез», Россия) до ОП<sub>600</sub> = 0,6–0,7, после чего индуцировали продукцию рекомбинантного белка добавлением 1 мМ IPTG (Thermo Scientific, Литва). Через 16 ч клетки осаждали и обрабатывали лизирующим буфером, pH 8,5, содержащим 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> («ЛенРеактив», Санкт-Петербург), 500 мМ NaCl («ЛенРеактив»), 8 М мочевины (Sigma, США), 5 мМ имидазол (Sigma) и 1% ингибитора протеаз *E. coli* (Protease Inhibitor Cocktail for His-tagged proteins) (Sigma). Через 20 мин инкубации при комнатной температуре добавляли 0,01% тритона X-114 (Sigma) и лизоцим (Serva, Германия) до концентрации 1 мг/мл.

После инкубации в течение 1 ч смесь центрифугировали 1 ч при 13000 g. Очистку рекомбинантных белков из клеточного лизата проводили с помощью металлоафинной хроматографии на Ni-сорбенте с использованием колонки HisTrap FF Crude, 5 мл (GE Healthcare, Швеция). В качестве стартового служил лизирующий буфер, состав которого приведен выше. Для отмывания от эндотоксинов служил стартовый буфер с добавлением 0,1% тритона X-110 (Sigma). Второй этап отмывки (от тритона X-110) проводили с помощью стартового буфера с добавлением 0,1% твина 20 (Sigma). Третий раствор, которым промывали колонку, представлял собой стартовый буфер с добавлением 10 мМ имидазола (Sigma). Для элюции использовали стартовый буфер, содержащий 500 мМ имидазол. Скорость потока жидкостей через колонку на каждом этапе хроматографического разделения составляла 5 мл/мин. Все работы выполнялись на приборе BioLogic DuoFlow (BioRad Laboratories, Inc, США).

#### Получение моноАТ, специфичных к белку NS1

Мыши линии *BALB/c* (из филиала «Столбовая» ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Московская обл.) были двукратно с интервалом 3 нед иммунизированы рекомбинантным белком rNS<sub>124</sub> вируса гриппа А/Puerto Rico/8/1934. Белок, растворенный в 0,1 М PBS, pH 7,2 («БиолоТ», Санкт-Петербург), вводили животным внутримышечно в дозе 40 мкг/мышь с 500 мкг/мышь адьюванта – гидроксида алюминия (Brenntag, Дания). Через 3 нед после второй иммунизации проводили бустер-иммунизацию белком rNS<sub>124</sub> в дозе 30 мкг/мышь и спустя 3 дня осуществляли гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышинной миеломы линии X63Ag8.653 в присутствии 50%-ного ПЭГ 1000 (Sigma).

Полученные гибридные клетки культивировали на селективной среде НАТ (Sigma). При первичном тестировании клонов использовали традиционный метод непрямого ИФА: анализируемую культуральную жидкость вносили в лунки планшета, сенсibilизированные очищенным белком rNS<sub>124</sub> или лизатом клеток *E. coli* в качестве отрицательного контроля. Гибридные клоны с заданным спектром реагирования подвергали 2–4-кратному реклонированию. Стабильные клоны-продуценты моноАТ использовали для получения асцитов. С этой целью мышам линии *BALB/c*, предварительно праймированным пристаном (0,5 мл/мышь, Sigma), внутрибрюшинно вводили гибридные клетки в количестве 5–10 млн. кл/мышь. Спустя 2–3 нед асцитную жидкость собирали. Надосадочная жидкость, полученная в результате центрифугирования асцитов, служила источником моноАТ, а клетки гибридом, прошедшие пассирование на мышах, подвергали криоконсервированию.

Исследования выполняли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003).

#### Оценка свойств моноАТ в непрямом ИФА

Антигенами (rNS<sub>124</sub> или рекомбинантный белок GP вируса Эбола в качестве отрицательного контроля), разведенными 0,05 М карбонатно-бикарбонатным буфером, pH 9,5 («ЛенРеактив»), до концентрации 1 мкг/мл, сенсibilизировали планшет для ИФА («Медполимер», Санкт-Петербург) при 4 °С в течение 18 ч. После отмывания несвязавшегося антигенного материала 0,01 М PBS, pH 7,2 («БиолоТ»), с добавлением 0,05%-ного

твина-20 (Serva) (PBS-T) в лунки планшета внесли моноАТ в PBS-T в различных разведениях и инкубировали 1 ч при 37 °С. Связавшиеся с антигеном моноАТ детектировали путем добавления к смеси пероксидазного конъюгата АТ к IgG мыши (Sigma), разведенного PBS-T 1:5000, с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37 °С. Пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 0,1 мг/мл ТМБ (Sigma), и 0,02%-ный раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0,1 М ацетат-цитратном буфере (ЗАО «ЛенРеактив»), рН 5,0. Реакцию останавливали добавлением 2 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ЗАО «ЛенРеактив») и ОП измеряли на фотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия) при длине волны 450 нм.

### Определение изотипа моноАТ

Изотип моноАТ анализировали методом ИФА с использованием набора козьих антиизотипических сывороток против Ig мыши и пероксидазного конъюгата кроличьих АТ, взаимодействующих с козьими IgG (Sigma-Aldrich, США). В качестве антигена для сенсibilизации планшетов использовали rNS<sub>124</sub> в концентрации 1 мкг/мл.

### Анализ полученных моноАТ методом вестерн-блоттинга

Для оценки антигенной направленности моноАТ в качестве антигенов в иммуноблоттинге использовали лизат клеток MDCK, зараженных вирусами гриппа А в дозе 0,1–1 ТИД<sub>50</sub>/кл. Через 24 ч клетки лизировали буфером, содержащим 5%-ный β-МЕ (Amresco, США), и лизат кипятили в течение 2 мин. Отрицательным контролем служил лизат аналогично обработанных интактных клеток MDCK. SDS-ЭФ белков из приготовленных проб проводили в редуцирующих условиях по методу Лэммли [12] в 8–20%-ном градиентном полиакриламидном геле (Serva). После проведения ЭФ белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, Германия). Свободные точки на мембране блокировали при 4 °С в течение 18 ч 1,5%-ным БСА (Sigma), разведенным PBS-T (блокирующий раствор PBS-БСА). Инкубацию моноАТ (в концентрации 5–10 мкг/мл, разведенных PBS-БСА) с вирусными антигенами на НМ проводили при 37 °С в течение 2 ч. Затем НМ обрабатывали при 37 °С в течение 2 ч пероксидазным конъюгатом АТ к IgG мыши (Life Technologies, США), разведенным 1:1000 блокирующим буфером. После отмывания НМ пероксидазную реакцию проявляли раствором Immublot solution, содержащим ТМБ (Life Technologies). ММ белков,

с которыми взаимодействовали моноАТ на НМ, определяли по калибровочной кривой с помощью маркеров Kaleidoscope (BioRad).

### Микрокультуральный ИФА для оценки взаимодействия моноАТ с вирусными антигенами в инфицированных клетках

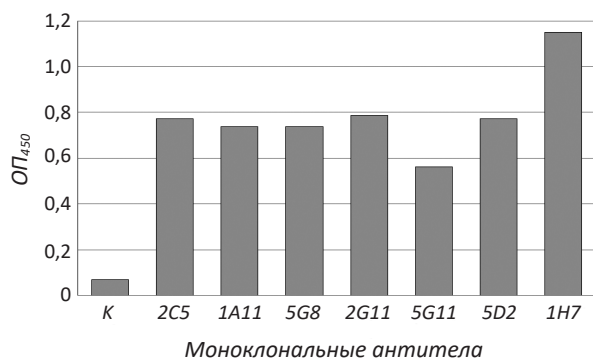
Монослойные культуры клеток MDCK или Vero, выращенные в 96-луночных планшетах для культуральных работ (Thermo Scientific–Nunc, Дания), инфицировали вирусами гриппа при MOI 0,01. Через 24 ч культивирования в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (при 37 °С для вирусов гриппа А или 34 °С для вирусов гриппа В) клетки в лунках фиксировали 80%-ным охлажденным ацетоном («Вектон», Санкт-Петербург) в течение 20 мин. В лунки с фиксированными и отмытыми клетками добавляли моноАТ, разведенные 5%-ным раствором сухого обезжиренного молока («СИ-Проджект», Санкт-Петербург) в PBS (PBS-M), и инкубировали смесь в течение 2 ч при 37 °С. Все использованные моноАТ как к NS1, так и к NP-белкам вируса гриппа А получены в ФГБУ «НИИ гриппа». После отмывания планшетов детекцию связавшихся с вирусом моноАТ проводили путем добавления пероксидазного конъюгата козьих АТ к IgG мыши (Sigma), разведенного PBS-M из расчета 1:5000. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и пероксидазную реакцию проявляли, как указано выше для непрямого ИФА.

### Анализ аминокислотной последовательности белка NS1 вирусов гриппа

Последовательности белка NS1 вирусов гриппа были получены из базы данных GenBank (AAM75163.1; ACF41872.1; AFO65032.1; YP\_009118625.1; ACF54482.1; DQ487336.1; ABW81757.1; ANX37622.1; AIE52530.1; GU052544.1; AGY42287.1; NP\_859034.1; AFH57915.1; KC891763.1). Выравнивание проводили с использованием компонента программы AlignX пакета Vector NTI Advance 11 (Invitrogen Corporation, США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была получена панель из семи моноАТ (2C5, 1A11, 5G8, 2G11, 5G11, 5D2 и 1H7), специфически взаимодействующих в ИФА с рекомбинантным белком rNS<sub>124</sub>. Ни для одного из них не наблюдали перекрестного реагирования с гетерологичным белком (фрагментом белка GP вируса Эбола), полученным в той же системе экспрессии (рис. 1). Все моноАТ принадлежат к одному изотипу иммуноглобулинов – IgG1.



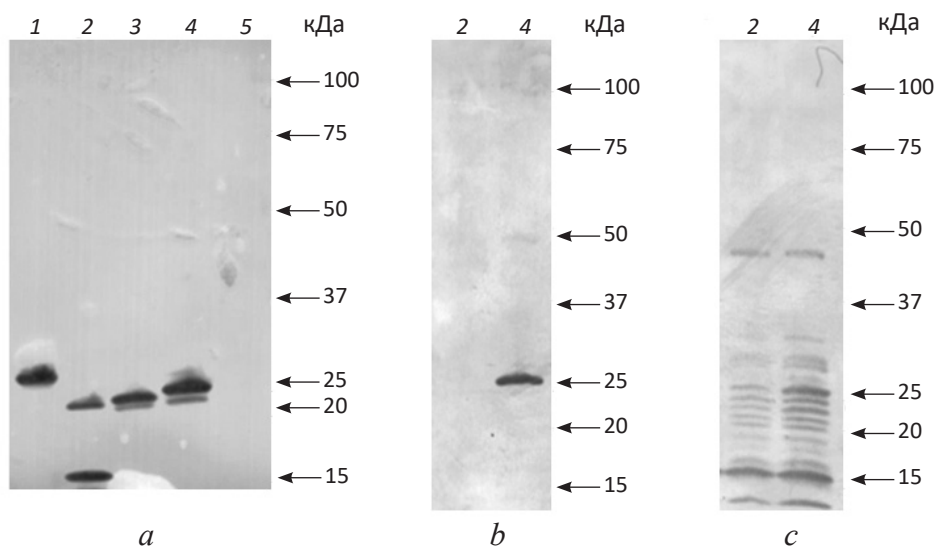
**Рис. 1.** Взаимодействие моноАТ с рекомбинантным белком rNS1<sub>124</sub> в непрямом ИФА; K – среднее значение ОП<sub>450</sub> при взаимодействии моноАТ с гетерологичным рекомбинантным белком (фрагмент белка GP вируса Эбола – отрицательный контроль)

**Fig. 1.** Interaction of MCA with recombinant protein of NS1<sub>124</sub> in indirect ELISA; K, mean value of OD<sub>450</sub> resulting from MCA reaction with heterological recombinant protein (fragment of Ebola virus GP protein, negative control)

Антигенная направленность новых моноАТ была проанализирована методом вестерн-блоттинга с использованием в качестве источника антигенов лизата клеток MDCK, зараженных различными

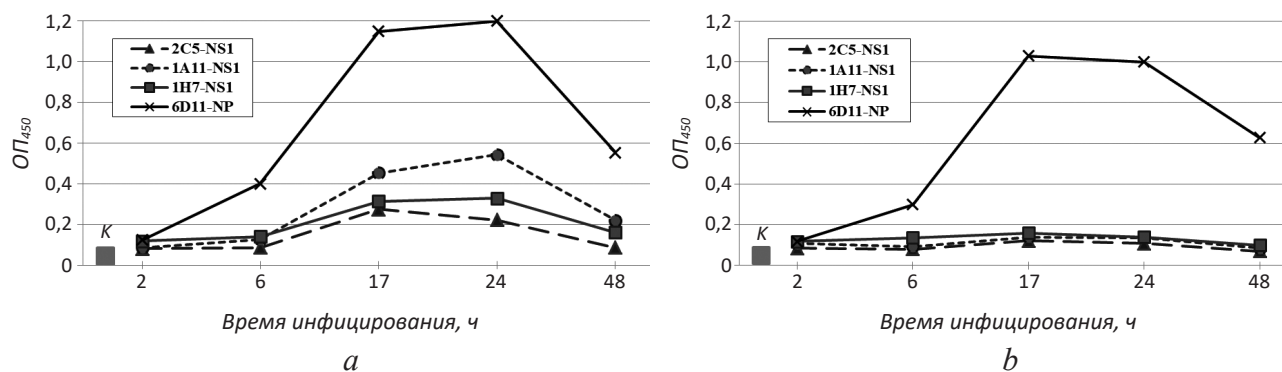
штаммами вируса гриппа А. После ЭФ белков лизата в указанных условиях был проведен иммуноблоттинг, который показал, что все полученные нами моноАТ специфически реагировали на НМ с белком NS1. При этом взаимодействие наблюдали не только в тех случаях, когда в качестве источника антигенов использовали лизаты клеток, инфицированных рекомбинантными вирусами гриппа А с укороченной последовательностью NS1. Все полученные нами моноАТ взаимодействовали также с полноразмерным белком NS1 из клеток, зараженных вирусами дикого типа А(Н1N1) или А(Н3N2). В качестве примера приведен результат, полученный для моноАТ 1H7 (рис. 2а). Для остальных моноАТ картина была аналогичной.

Для сравнения в иммуноблоттинге с теми же антигенами были проанализированы коммерческие моноАТ к NS1. В отличие от наших препаратов моноАТ 1AF10 (“Биалекса”) связывались с полноразмерным белком NS1 (ММ 26,9 кДа) из клеток, зараженных вирусом гриппа А дикого типа, но не с его укороченной формой, содержащей АК 1–124 (ММ 15,9 кДа) (рис. 2б, сравни с дорожками 2 и 4 на рис. 2а). Вероятно, моноАТ 1AF10 специфичны к АК С-концевого домена. Следует отметить,



**Рис. 2.** Сравнение антигенной специфичности моноАТ 1H7, полученного в ФГБУ «НИИ гриппа» (а) и коммерческих моноАТ – 1AF10 («Биалекса») (b) и ab181436 (Abcam) (c) – при их взаимодействии с белком NS1 в инфицированных клетках (по результатам вестерн-блоттинга): 1– антигены вирусов А/НК-PR/8(1-124)-HspX (ожидаемая ММ NS1 с гетерогенной вставкой 30,5 кДа); 2– антигены А/PR/8(1-124)-ESAT (ММ NS1 25,9 кДа и 15,9 кДа со вставкой или с вырезанной гетерогенной вставкой, соответственно); 3 – антигены А/Puerto Rico/8/1934 (дикий тип, ММ NS1 25,9 кДа); 4 – антигены А/Hong Kong/1/1968 (дикий тип, ММ NS1 26,9 кДа); 5 – антигены лизата неинфицированных клеток

**Fig. 2.** Comparison of antigenic specificity of MCA 1H7 obtained in NII Grippa (a) and of commercial MCA 1AF10 (Biolexa) (b) and ab181436 (Abcam) (c) during their interaction with NS1 protein in infected cells (Western-blotting): (1), antigens of A/HK-PR/8(1-124)-HspX viruses (expected NS1 MM with heterogenic insertion of 30.5 kDa); (2), antigens of A/PR/8(1-124)-ESAT (NS1 MM of 25.9 kDa and 15.9 kDa with or without heterogenic insertion, respectively); (3), antigens of A/Puerto Rico/8/1934 (wild type, NS1MM of 25.9 kDa); (4), antigens of A/Hong Kong/1/1968 (wild type, NS1MM of 26.9 kDa); and (5), antigens of uninfected cells lysate



**Рис. 3.** Динамика взаимодействия различных моноАТ с антигенами вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 дикого типа (а) и рекомбинантного штамма A/Puerto Rico/8/1934 delNS (б) в клетках *Vero*, инфицированных вирусом при MOI=0,01 (по данным микрокультурального ИФА). *K* – среднее значение ОП<sub>450</sub> при взаимодействии моноАТ с неинфицированными клетками *Vero* (отрицательный контроль)

**Fig. 3.** Dynamics of interaction of various MCA with antigens of wild type flu virus A/Puerto Rico/8/1934 (a) and recombinant strain of A/Puerto Rico/8/1934 delNS (b) in *Vero* cells infected by the virus with MOI of 0.01 (according to microcultural ELISA). *K* is mean value of OD<sub>450</sub> resulting from interaction of MCA with uninfected *Vero* cells (negative control)

что при использовании моноАТ ab181436 (Abcam) помимо специфичной полосы с ММ около 26 кДа (рис. 2с) на НМ были выявлены множественные полосы, в том числе с ММ 15,9 кДа, в препарате вируса «дикого типа», где такой фрагмент белка NS1 отсутствует (рис. 2с, дорожка 4). Эти результаты свидетельствуют о низкой антигенной специфичности моноАТ ab181436.

Полученные нами моноАТ обладали достаточно высокой чувствительностью для оценки динамики синтеза вирусного белка NS1 в зараженных клетках. С этой целью использовали метод мк-ИФА с инфицированными клетками *Vero* (эпителиальная культура из почки африканской зеленой марышки). В отличие от других линий, происходящих от нормальных клеток млекопитающих (включая клетки почечного эпителия собаки *MDCK*), *Vero* не синтезируют Inf  $\alpha/\beta$  [13]. Только в таких Inf-дефицитных клетках способны полноценно реплицироваться вирусы гриппа А с делетированным белком NS1, который является антагонистом системы Inf I типа.

На рис. 3 представлены результаты выявления белка NS1 методом мк-ИФА на различных стадиях репликативного цикла в клетках *Vero*, зараженных вирусом A/Puerto Rico/8/1934 дикого типа и рекомбинантным штаммом A/Puerto Rico/8/1934 delNS. Детекцию NS1 осуществляли с использованием трех моноАТ к этому белку (2C5, 1A11, 1H7), показавших свою высокую эффективность в данном методе (см. рис. 3а). Об успешной репродукции обоих вирусов свидетельствовал активный синтез NP-белка уже через 6 ч после заражения, выявленный с помощью моноАТ 6D11

к NP-белку вирусов гриппа А. Показателем специфичности анализируемых моноАТ служило отсутствие их взаимодействия с вирусными антигенами в клетках, инфицированных штаммом A/Puerto Rico/8/1934 delNS (см. рис. 3б).

При данных условиях эксперимента (MOI=0,01) синтез белка NS1 в клетках, зараженных вирусом дикого типа, наблюдали не ранее 17 ч после инфицирования (см. рис. 3а). При большей инфекционной дозе (MOI=3) белок NS1 был четко выявлен уже через 6 ч после инфицирования (данные приведены ниже). Показатели ОП<sub>450</sub> в этой временной точке при MOI=3 составили 0,715; 0,214 и 0,281 для моноАТ 1A11, 2C5 и 1H7, соответственно, при контрольном значении (*K*) менее 0,1.

Таким образом, предложенный нами вариант мк-ИФА может быть применен для детекции белка NS1 в клетках, инфицированных вирусами гриппа А, и по чувствительности не уступает способам анализа, предложенным другими авторами. Так, группа канадских исследователей, используя авторские моноАТ и такие методы исследования, как вестерн-блоттинг и иммунофлуоресценция, показала, что при MOI=5 белок NS1 появляется в клетках, инфицированных вирусом A/Puerto Rico/8/1934, не ранее, чем спустя 5–8 ч после инфекции [10].

Структура белка NS1 в достаточной степени вариабельна. Гомология аминокислотной последовательности у вирусов гриппа А, принадлежащих к одному или разным субтипам, может варьировать в пределах 62–100%. При этом N-концевой РНК-связывающий регион более консервативен, чем С-концевой эффекторный [9, 10, 14, 15]. Показано, что структурные особенности белка NS1

влияют на эффективность его взаимодействия с клеточными регуляторными факторами (NF- $\kappa$ B, PI3K, IRF3, CPSF30 и др.) [16–19]. Полиморфизм белка NS1 обуславливает штамм- и субтип-специфические особенности репликативного цикла вирусов, уровень их патогенности и влияния на противовирусный иммунный ответ (блокирование системы Inf и синтез провоспалительных цитокинов). Экспериментальные доказательства этого были получены для вирусов гриппа H5 и H7 птичьего происхождения [17, 20], а также для вируса A(H1N1)pdm09 [16, 21, 22].

МоноАТ служат удобным инструментом анализа антигенной изменчивости белков. В этой связи одной из поставленной нами задач являлась оценка широты спектра взаимодействия полученных моноАТ. Для этого монослойные культуры клеток MDCK были инфицированы (MOI=0,01) различными вирусами гриппа дикого типа с немодифицированным геном NS. Результаты мк-ИФА свидетельствуют о типовой и субтипоспецифической антигенной вариативности белка NS1 вируса гриппа (рис. 4).

Следует отметить, что значения ОП<sub>450</sub> при взаимодействии NS1-специфичных моноАТ с вирусами могут быть низкими в том случае, когда синтез вирусных белков незначителен (при невысоком уровне репродукции вируса, т.е. при низкой инфекционной дозе вируса). Однако в нашем случае количественной мерой репродукции вирусов являлось взаимодействие с типоспецифичными моноАТ 6D11 или моноАТ 2/3, которые реагируют с NP-белком *всех* вирусов типа А или типа В, соответственно. Значения ОП<sub>450</sub> для этих АТ практически одинаковы для всех штаммов, т.е. уровень (количество) других синтезируемых внутриклеточных вирусных белков также сопоставим для всех исследованных штаммов. Соответственно, если ОП<sub>450</sub> для NS1-специфичных моноАТ низкая, то это не свидетельствует однозначно о малом содержании белка NS1, а может являться следствием его структурных особенностей, при которых снижается аффинность его связывания с АТ.

Все моноАТ ожидаемо наиболее эффективно реагировали с белком NS1 вируса A/Puerto Rico/8/1934. При этом характер их взаимодействия с нативным внутриклеточным белком NS1 в инфицированных клетках (метод мк-ИФА) и рекомбинантным белком rNS<sub>124</sub> (метод непрямого ИФА), который использовали при иммунизации мышей в процессе получения моноАТ, не был идентичен. Так, моноАТ 5G8 значительно слабее реагировали с нативным белком по сравнению

с рекомбинантным (сравни рис. 1 и 4а), что может быть следствием конформационных отличий исследованных форм белка.

МоноАТ 2G11, 5D2 и 1H7 проявляли наиболее активное взаимодействие с NS1 вирусов A/Beijing/262/1995 и A/New Caledonia/20/1999 (см. рис. 4b и 4c), также принадлежащих к субтипу A(H1N1) и широко циркулировавших в человеческой популяции до появления в 2009 г. пандемического вируса A(H1N1)pdm. О том, что структура домена, содержащего АК 1–124 белка NS1 вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm изменена по сравнению с более ранними (циркулировавшими в 90-х годах прошлого века) вирусами «сезонного» гриппа A(H1N1), свидетельствует сниженная активность моноАТ 2G11, 5D2 (см. рис. 4b,c и 4d,e,f). При этом некоторые вариации во взаимодействии с моноАТ 1A11, 5G11 и 1H7 указывают на наличие штаммовых различий в структуре антигенных детерминант белка NS1 среди вирусов пандемического гриппа (см. рис 4d, 4e, и 4f).

На фоне общего снижения степени взаимодействия моноАТ с вирусами гриппа субтипа A(H3N2) по сравнению с A/Puerto Rico/8/1934 наблюдались также некоторые штамм-специфичные вариации этой активности (см. рис. 4g, 4h, 4i, 4j). По отношению к вирусу A(H2N2) большинство моноАТ были неактивны. Невысокий уровень взаимодействия обнаружен лишь для моноАТ 1A11 и 5G11 (рис.4k). Интересно, что некоторые моноАТ (1A11, 5G11, 1H7) взаимодействовали с вирусом A(H9N2) так же активно, как и с вирусом A/Puerto Rico/8/1934 (рис. 4n).

Ни одно из полученных моноАТ не реагировало с антигенами вирусов гриппа A(H5N2) и A(H7N3) (см. рис. 4l, 4m). Отсутствие взаимодействия наблюдалось также для вирусов гриппа типа В, принадлежащих как к Ямагатской, так и к Викторианской линиям (см. рис. 4o, 4p). При этом указанные закономерности сохранялись даже при 100-кратном повышении MOI по сравнению с условиями эксперимента, отображенного на рис. 4.

В целом, наблюдаемые различия в эффективности взаимодействия анализируемых моноАТ с вирусами свидетельствуют о значительной типовой, субтиповой и штаммовой структурной гетерогенности фрагмента белка (NS1<sub>1–124</sub>), а также о возможности использования полученных АТ для изучения антигенной изменчивости вирусов гриппа А.

В современной литературе имеется достаточно много информации об определенных АК белка NS1 вирусов гриппа А, которые вовлечены во взаимодействие с клеточными компонентами

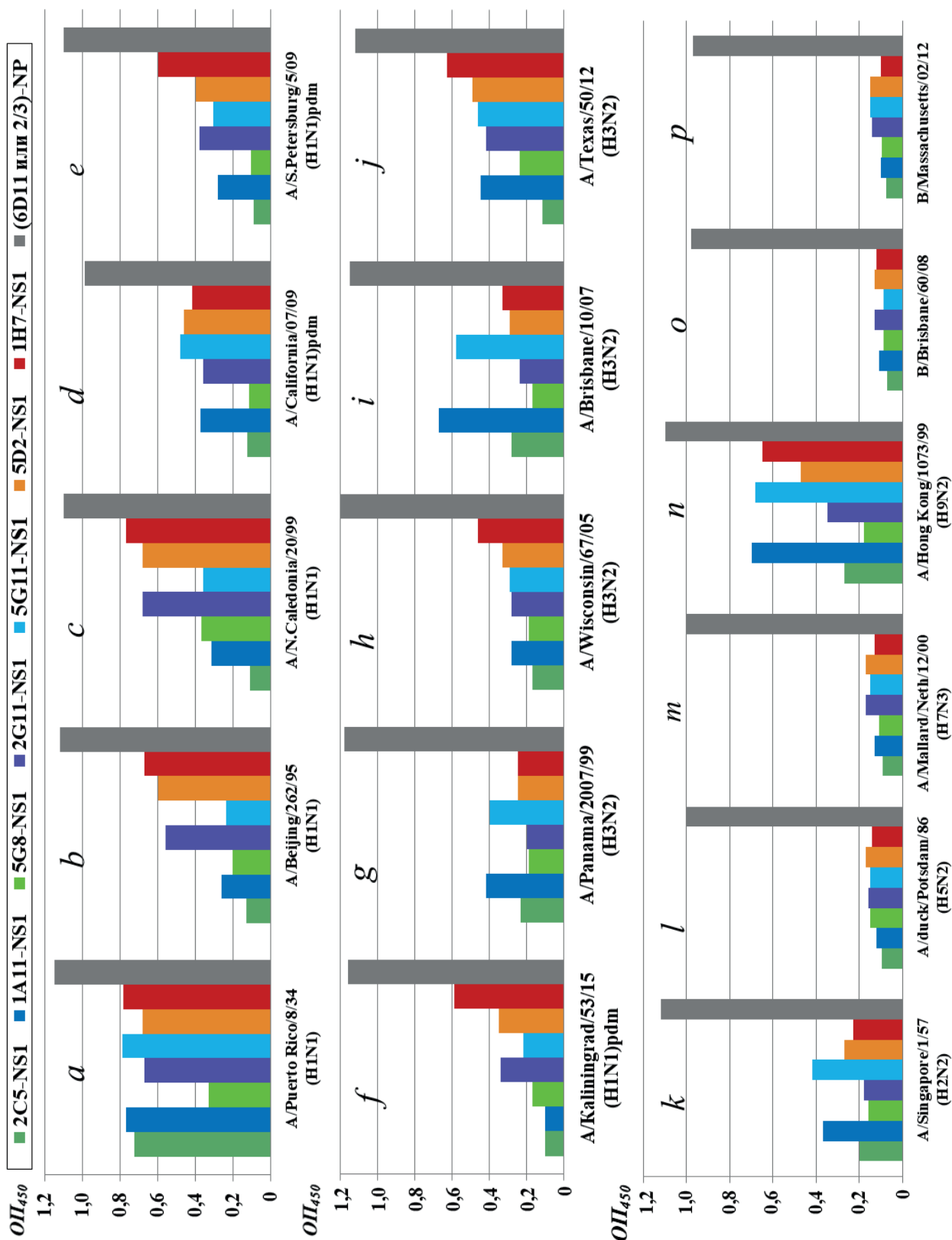


Рис. 4. Взаимодействие моноАТ с антигенами различных вирусов гриппа А дикого типа в инфицированных клетках MDCK через 24 ч после заражения в дозе MOI=0,01 (по данным микрокультурального ИФА). По оси абсцисс – штаммы вируса

Fig. 4. Interaction (according to microcultural ELISA) of MCA with antigens of various A flu wild type viruses in infected MDCK cells 24 h after infection with MOI=0.01. X-axis, virus strains



и ответственны за влияние на Inf-систему организма хозяина [2, 18, 23]. При этом существует крайне мало экспериментально установленных данных, касающихся состава В- или Т-клеточных антигенных детерминант белка NS1 вируса гриппа. Практически отсутствуют исследования, посвященные связи антигенных свойств данного белка с кодирующей его нуклеотидной последовательностью. В своей работе мы попытались сопоставить наблюдаемую нами антигенную изменчивость фрагмента белка (NS1<sub>1-124</sub>), использованного при получении панели моноАТ, с его генетической структурой.

На рис. 5 представлены полученные из базы данных GenBank АК последовательности фрагмента белка NS1<sub>1-124</sub> вирусов гриппа, использованных в нашей работе. Полученная картина свидетельствует о значительной генетической вариативности первичной структуры NS1. При этом в большинстве случаев прослеживается связь между заменами в последовательности белка NS1 исследованных штаммов и антигенными изменениями по сравнению с вирусом A/Puerto Rico/8/1934, показателем которых служило снижение уровня взаимодействия моноАТ с белком NS1 различных вирусов по сравнению с указанным вирусом при мк-ИФА. Так, наибольшей структурной гомологией с белком NS1<sub>1-124</sub> вируса A/Puerto Rico/8/1934 (88–99%) обладает белок вирусов A(H1N1), цир-

кулировавших до пандемии 2009 г., и вируса A(H9N2) (таблица). Только по отношению к этим штаммам активность 3–4 моноАТ не уступала взаимодействию, которое они проявляли в отношении штамма A/Puerto Rico/8/1934. Остальные АТ реагировали с этими вирусами значительно слабее (см. рис. 4). При этом АК последовательность NS1<sub>1-124</sub> вирусов A/Puerto Rico/8/1934 и A/NewCaledonia/20/1999 различается лишь по одной позиции. У вируса A/NewCaledonia/20/1999 в белке NS1 имеется замена отрицательно заряженной глутаминовой кислоты на положительно заряженный лизин (E55K). Можно предположить, что АК в 55-й позиции входит в состав В-клеточного эпитопа и отрицательный заряд в этом положении важен для связи некоторых АТ с антигеном. Замена E55K наблюдается также у всех рассмотренных штаммов вируса A(H3N2). У вируса A(H9N2) в той же 55-й позиции вместо глутаминовой кислоты находится положительно заряженный аргинин (E55R).

Из всех проанализированных вирусов гриппа А наименьшей степенью структурной гомологии (65%) с NS1<sub>1-124</sub> вируса A/Puerto Rico/8/1934 обладают вирусы A(H5N2) и A(H7N3), что коррелирует с отсутствием взаимодействия между ними и всеми исследованными моноАТ (см. рис. 4). У этих вирусов также выявлена замена E55R. Помимо этого, у штаммов A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 и

**Аминокислотная последовательность фрагмента белка NS1<sub>1-124</sub> у различных вирусов гриппа в сравнении со структурой белка NS1 вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934**

**Comparison of aminoacid sequences of NS1<sub>1-124</sub> fragments in various flu viruses with that of A/Puerto Rico/8/1934 virus**

Вирус	Число мутаций	Степень гомологии, %
A/Beijing/262/1995 (H1N1)	15	88
A/New Caledonia/20/1999 (H1N1)	1	99
A/California/07/2009 (H1N1)pdm	24	81
A/Singapore/1/1957 (H2N2)	8	94
A/Panama/2007/1999 (H3N2)	20	84
A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	19	85
A/Brisbane/10/2007 (H3N2)		
A/Texas/50/2012 (H3N2)		
A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2)	44	65
A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3)		
A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	10	92
B/Brisbane/60/2008	105	15
B/Massachusetts/02/2012		

A/PuertoRico/8/34/MountSinai (H1N1)	(1) MDPNTVVSFQVDFLWHVVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRA
A/Beijing/262/1995 (H1N1)	(1) MDSHTVSSFQVDFLWHVVRKQVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLKGRGSLGLNIETATCV
A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1)	(1) MDNPTVSSFQVDFLWHVVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIKTATRA
A/California/07/2009 (H1N1)	(1) MDSNTMSSFQVDFLWHIRKRFADNGLGDAPFLDRLRRDQKSLKGRGNTLGLDIETATLV
A/Singapore/1/1957 (H2N2)	(1) MDNPTVSSFQVDFLWHVVRKQVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLNIETATRV
A/Panama/2007/1999 (H3N2)	(1) MDSNTVSSFQVDFLWHIRKQVVDQELSDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNTLGLDIKAATHV
A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	(1) MDSNTVSSFQVDFLWHIRKQVVDQELSDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNTLGLDIKAATHV
A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	(1) MDSNTVSSFQVDFLWHIRKQVVDQELSDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNTLGLDIKAATHV
A/Texas/50/2012 (H3N2)	(1) MDSNTVSSFQVDFLWHIRKQVVDQELSDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNTLGLDIKAATHV
A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2)	(1) MDSNTITSFQVDCYLVWHIRKLLSMRDMCDAPFLDRLRRDQKSLKGRGSLGLDLRVATME
A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3)	(1) MDNPTITSFQVDCYLVWHIRKLLSMRDMCDAPFLDRLRRDQKSLKGRGSLGLDLRVATME
A/HongKong/1073/99 (H9N2)	(1) MDSNTVSSFQVDFLWHVVRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIKTATRE
B/Brisbane/60/2008	(13) GPGATNATINFEAGILECYERLSWQRALDYPGQDRLNRLKRLKLESRKIKTHNKSEPESEKRM
B/Massachusetts/02/2012	(14) GPGATNATINFEAGILECYERLSWQRALDYPGQDRLNRLKRLKLESRKIKTHNKSEPESEKRM
A/PuertoRico/8/34/MountSinai (H1N1)	(61) GKQIVERILKEESDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSRDWSMLIPKQKVAGPLCIRMD
A/Beijing/262/1995 (H1N1)	(61) GKQIVERILKKEESDEAFKMTMASAFASRYLTDMTIEEMSRDWFMLMPKQKVAGPLCVRMD
A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1)	(61) GKQIVERILKEESDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSRDWSMLIPKQKVAGPLCIRMD
A/California/07/2009 (H1N1)	(61) GKQIVIEWILKEESETLRMTIASVPTSRYLSMTLEEMSRDWFMLMPRQKIIGPLCVRID
A/Singapore/1/1957 (H2N2)	(61) GKQIVERILKEESDEALKMTMASAPASRYLTDMTIEEMSRDWFMLMPKQKVSGPLCIRMD
A/Panama/2007/1999 (H3N2)	(61) GKQIVEKILKEESDEALKMTMASTPASRYITDMTIEELSRNWFMLMPKQKVEGPLCIRMD
A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	(61) GKQIVEKILKEESDEALKMTMSTPASRYITDMTIEELSRNWFMLMPKQKVEGPLCIRMD
A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	(61) GKQIVEKILKEESDEALKMTMSTPASRYITDMTIEELSRNWFMLMPKQKVEGPLCIRMD
A/Texas/50/2012 (H3N2)	(61) GKQIVEKILKEESDEALKMTMSTPASRYITDMTIEELSRNWFMLMPKQKVEGPLCIRMD
A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2)	(61) GKQIVEDILKSEIDENLKIAIASPPAPRYITDMSIEEISREWMLMPPRQKITGGLMVKMD
A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3)	(61) GKQIVEDILKSEIDENLKIAIASPPAPRYITDMSIEEISREWMLMPPRQKITGGLMVKMD
A/HongKong/1073/99 (H9N2)	(61) GRHIVERILEESDEALKMTIASVPASRYLTDMTLEEMSRDWSMLIPKQKVTPGPLCIRMD
B/Brisbane/60/2008	(74) SLEERKAIQVMMKVLLEFNNPSAGIEGFEPYCMKSSSNCTKYNWTDYPSSTPERCLDDI
B/Massachusetts/02/2012	(75) SLEERKAIQVMMKVLLEFNNPSAGIEGFEPYCMKSSSNCTKYNWTDYPSSTPERCLDDI
A/PuertoRico/8/34/MountSinai (H1N1)	(121) QAIM
A/Beijing/262/1995 (H1N1)	(121) QAIM
A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1)	(121) QAIM
A/California/07/2009 (H1N1)	(121) QAIM
A/Singapore/1/1957 (H2N2)	(121) QAIM
A/Panama/2007/1999 (H3N2)	(121) QAIM
A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	(121) QAIM
A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	(121) QAIM
A/Texas/50/2012 (H3N2)	(121) QAIM
A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2)	(121) QAIM
A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3)	(121) QAIM
A/HongKong/1073/99 (H9N2)	(121) QAIM
B/Brisbane/60/2008	(134) EEEF
B/Massachusetts/02/2012	(135) EEEF

**Рис. 5.** Аминокислотная последовательность фрагмента белка NS1<sub>1-124</sub> различных вирусов: цифрами в скобках указан номер первого остатка в строке, поскольку последовательности вирусов гриппа А и В сдвигаются при выравнивании. Серой заливкой помечены аминокислотные остатки, не совпадающие со структурой белка NS1 вируса гриппа А/Puerto Rico/8/1934

**Fig. 5.** Aminoacid sequences of NS1<sub>1-124</sub> fragments in various viruses: since sequences of A and B viruses shift when aligned, figures in brackets show number of the first residue in line. Aminoacid residues that differ from NS1 protein structure of A/Puerto Rico/8/1934 virus are marked gray

A/mallard/Netherlands/12/2000 имеется значимая замена E71S. Известно, что E71 является ключевым АК остатком для стабилизации конформации белка NS1 [15]. Следовательно, изменения конформации белка из-за замены в 71-м положении могут служить причиной ослабления связи антиген-антитело.

Уровень гомологии белка NS1<sub>1-124</sub> у вирусов A/California/07/2009 (H1N1)pdm и A/Puerto Rico/8/1934 составляет 81%, что сопровождается их значительными антигенными различиями, хотя замены в 55-м и 71-м положениях у данного штамма вируса пандемического гриппа отсутствуют.

Сразу же после появления в 2009 г. нового вируса пандемического гриппа были показаны значительные различия антигенных свойств В-клеточных детерминант в составе молекулы его гемагглютинина (HA) и HA вирусов «сезонного» гриппа А(H1N1), циркулировавших ранее. При этом общность аминокислотной последовательности HA между вирусами A/California/07/2009 (H1N1)pdm и A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) составила 79% [24]. Уровень гомологии последовательности белка NS1<sub>1-124</sub> у этих двух вирусов (81%) сопоставим с таковым для HA, который считается наиболее варибельным белком вирусов гриппа. Рост числа различий в генетической структуре белка NS1 вируса пандемического гриппа A/California/07/2009 по сравнению с «сезонным» A/New Caledonia/20/1999 коррелировал со снижением активности по отношению к этому белку у моноАТ 5G8, 2G11, 5D2 и 1H7 (см. рис. 4; и таблицу).

У вирусов гриппа типа В уровень гомологии с фрагментом белка NS1<sub>1-124</sub> A/Puerto Rico/8/1934 чрезвычайно низок (15%), что закономерно отражается на структуре антигенных детерминант и на отсутствии взаимодействия с моноАТ к вирусу гриппа А.

Полученные данные свидетельствуют о том, что неструктурный белок NS1 вирусов гриппа обладает выраженной генетической и антигенной изменчивостью.

Панель полученных моноАТ позволяет выявить не только тип- и субтипоспецифические, но также и штамм-специфические различия у широкого круга циркулирующих в природе вирусов гриппа. Высокоаффинные NS1-специфичные моноАТ могут быть использованы для детекции вирусов гриппа А на ранних стадиях заболевания в клинических материалах, например, в эпителиальных клетках из назальных соскобов, с использованием методов флуоресценции и мк-ИФА в культурах клеток, инфицированных вирусосодержащим материалом.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Щелканов М. Ю., Попов А. Ф., Симакова А. И. и др. Патогенез гриппа: механизмы модуляции белками возбудителя. *Журн. Инфектологии*, 2015, 7(2), 31–46. doi: 10.22625/2072-6732-2015-7-2-31-46.
2. Krug R.M. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Curr. Opin. Virol.*, 2015, 12, 1–6. doi: 10.1016/j.coviro.2015.01.007
3. Плотникова М.А., Васин А.В., Клотченко С.А. и др. Сравнение паттерна экспрессии мРНК цитокинов в эпителиальных клетках А-549, инфицированных вирусами гриппа А/H1N1pdm09, А/H3N2 и А/H5N1. *Цитокины и воспаление*, 2013, 1, 57–65. <http://www.cytokines.ru/2013/1/Art9.php>
4. Romanova J., Krenn B.M., Wolschek M., et al. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine. *PLoS One*, 2009, 4(6), e5984. doi:10.1371/journal.pone.0005984
5. Khurana S., Suguitan A.L., Rivera Y., et al. Antigenic fingerprinting of H5N1 avian influenza using convalescent sera and monoclonal antibodies reveals potential vaccine and diagnostic targets. *PLoS Med.*, 2009, 6(4), e1000049. doi: 10.1371/journal.pmed.1000049
6. Arunachalam R. Detection of site-specific positive Darwinian selection on pandemic influenza A/H1N1 virus genome: integrative approaches. *Genetica*, 2013, 141(4–6), 143–155. doi: 10.1007/s10709-013-9713-x
7. Wu J., Mok C.K., Chow V.T., et al. Biochemical and structural characterization of the interface mediating interaction between the influenza A virus non-structural protein-1 and a monoclonal antibody. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 33382. doi: 10.1038/srep33382
8. Yodsheewan R., Maneewatch S., Srimanote P., et al. Human monoclonal ScFv specific to NS1 protein inhibits replication of influenza viruses across types and subtypes. *Antiviral Res.*, 2013, 100(1), 226–237. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.07.019
9. Tan Z., Akerstrom S., Wee B.Y., et al. A new panel of NS1 antibodies for easy detection and titration of influenza A virus. *J. Med. Virol.*, 2010, 82(3), 467–475. doi: 10.1002/jmv.21709
10. Rahim M.N., Selman M., Sauder P.J., et al. Generation and characterization of a new panel of broadly reactive anti-NS1 mAbs for detection of influenza A virus. *J. Gen. Virol.*, 2013, 94(3), 593–605. doi: 10.1099/vir.0.046649-0
11. Sun J., Wang X., Wen X., et al. Identification of a highly conserved epitope on avian influenza virus non-structural protein 1 using a peptide microarray. *PLoS One*, 2016, 11(3), e0149868. doi:10.1371/journal.pone.0149868
12. Laemmi U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 1970, 227 (5259), 680–685. PMID: 5432063

13. Desmyter J., Melnick J.L., Rawls W.E. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of african green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.*, 1968, 2(10), 955–961. PMID: 4302013
14. Ludwig S., Schultz U., Mandler J., et al. Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology*, 1991, 183, 566–577. PMID: 1830182
15. Carrillo B., Choi J.M., Bornholdt Z.A., et al. The influenza A virus protein NS1 displays structural polymorphism. *J. Virol.*, 2014, 88(8), 4113–4122. doi: 10.1128/JVI.03692-13
16. Kuo R.L., Zhao C., Malur M., Krug R.M. Influenza A virus strains that circulate in humans differ in the ability of their NS1 proteins to block the activation of IRF3 and interferon-beta transcription. *Virology*, 2010, 408, 146–158. doi: 10.1016/j.virol.2010.09.012
17. Spesock A., Malur M., Hossain M.J., et al. The virulence of 1997 H5N1 influenza viruses in the mouse model is increased by correcting a defect in their NS1 proteins. *J. Virol.*, 2011, 85, 7048–7058. doi: 10.1128/JVI.00417-11
18. Ayllon J., Hale B.G., Garcia-Sastre A. Strain-specific contribution of NS1-activated phosphoinositide 3-kinase signaling to influenza A virus replication and virulence. *J. Virol.*, 2012, 86, 5366–5370. doi: 10.1128/JVI.06722-11
19. Hartmann B.M., Thakar J., Albrecht R.A., et al. Dendritic cell response signatures distinguish 1918, pandemic, and seasonal H1N1 influenza viruses. *J. Virol.*, 2015, 89(20), 10190–10205. doi: 10.1128/JVI.01523-15
20. Ma W., Brenner D., Wang Z., et al. The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV. *J. Virol.*, 2010, 84, 2122–2133. doi: 10.1128/JVI.01668-09
21. Hale B.G., Steel J., Medina R.A., et al. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.*, 2010, 84(14), 6909–6922. doi: 10.1128/JVI.00081-10
22. Menachery V.D., Einfeld A.J., Schäfer A., et al. Pathogenic influenza viruses and coronaviruses utilize similar and contrasting approaches to control interferon-stimulated gene responses. *MBio.*, 2014, 5(3), e01174-14. doi: 10.1128/mBio.01174-14
23. Ozawa M., Basnet S., Burley L.M., et al. Impact of amino acid mutations in PB2, PB1-F2, and NS1 on the replication and pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses. *J. Virol.*, 2011, 85(9), 4596–4601. doi: 10.1128/JVI.00029-11
24. Rodríguez-Alvarez M., Velasco-Velasco A.M., Alvarez-Anell N.J., et al. Identification of seasonal vaccine hemagglutinin subtype 1 (H1) epitopes in Mexican isolates of the new influenza A(H1N1) 2009 virus. *Arch. Med. Res.*, 2009, 40(8), 687–692. doi: 10.1016/j.arcmed.2009.12.002

## Obtaining and Characteristics of Monoclonal Antibody Panel Specific to NS1 Protein of A Flu Virus

V.Z. KRIVITSKAYA\*, E.V. SOROKIN, T.R. TSAREVA, M.V. SERGEEVA, R.A. KADYROVA, E.A. ROMANOVSKAYA–ROMAN’KO, A.A. SHALDZHYAN, S.V. PETROV, N.I. KONOVALOVA, and P.A. PETROVA

*The Research Institute of Influenza, Ministry of Health of Russian Federation (NII Grippa), 197376, St.-Petersburg Russia*

*e-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru\**

Received February 02, 2017

Accepted April 12, 2017

**Abstract**—A panel of 7 new monoclonal antibodies that specifically interact in indirect ELISA with the fragment of the NS1<sub>1-124</sub> protein of the A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) virus and also with the full-size native NS1 protein in cells contaminated by A type flu viruses of various subtypes (A(H1N1), A(H1N1) pdm09, A(H2N2), A(H3N2) and A(H9N2)) has been obtained. A sensitive variant of microcultural ELISA with the use of the obtained MCA was suggested that can be helpful for the detection of the NS1 protein in infected cells and for the analysis of its antigenic variability. The results of the microcultural ELISA testify to type- and subtype-specific antigenic variability of the flu virus.

**Key words:** NS1 antigenic and genetic variability, NS1 protein, flu virus, microcultural ELISA, monoclonal antibodies.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-5-61-72