

3. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders // N. Engl J. Med 2005.— V.352, N17.— P. 1779–1790.

4. Levine R.L., Wadleigh M., Coombs J., et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis // Cancer Cell 2005.— V.7, N4.— P. 387–397.

5. Zhao R., Xing S., Li Z., et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera // J. Biol Chem. 2005.— V.280, N24.— P. 22788–22792.

6. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analyt. Biochem.— 1987.— V.162.— P. 156–159.

7. Дибков М.В., Гартовська І.Р., Телегеев Г.Д., Малюта С.С. Розробка тест-системи для виявлення мутації V617F гена *jak2* у хворих на хронічні мієлопроліферативні захворювання // Наука та інновації.— 2009.— Т.5, №6.— С. 59–63.

8. Телегеев Г.Д., Дибков М.В., Божко М.В. Демиденко Д.В., Малюта С.С., Третьяк Н.М., Бондар М.В. Моніторинг хронічного мієлолейкозу за допомогою молекулярно-біологічних методів (методичні рекомендації) // Республіканський центр науково-медичної інформації., Київ, 1997, 20 стор.

Резюме

Мутація V617F гена *jak2* є важливим діагностичним критерієм при хронічних мієлопроліферативних захворюваннях. Запропоновано методику для її виявлення за допомогою T-ARMS ПЦР.

Мутація V617F гена *jak2* являється важним діагностичним критерієм при діагностиці хронічних мієлопроліферативних захворювань. Предложена методика ее выявления с помощью T-ARMS ПЦР.

V617F mutation *jak2* gene is an important diagnostic criterion for the diagnostics of chronic myeloproliferative disorders. The method of detection using T-ARMS PCR was proposed.

ЗЕЛЕНЬКИЙ С.Б.¹, БОБЫК В.И., МАНДРЫК С.Я., СИДОРИК Л.Л., ПОГРЕБНОЙ П.В.

¹ ИЕПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 45, e-mail: now15green@yahoo.com

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО, НИЗКОИММУНОГЕННОГО И ВЫСОКОКАТИОННОГО ПЕПТИДА *HVD-2*

Антимикробные пептиды (дефенсины) являются неотъемлемой частью так называемого неадаптивного, врожденного иммунитета. Все они действуют на широкий спектр микроорганизмов, грибов и вирусов, имеющих оболочку. Кроме того, исследования последних лет, показали, что что опухолям

эпителия ротовой полости, вульвы и шейки матки, толстой кишки человека свойственна повышенная экспрессия дефенсинов [1]. Также продемонстрировано наличие дефенсинов в сыворотке крови онкологических больных. Было установлено, что уровень hBD-1 в сыворотке крови больных раком легких можно рассматривать как вспомогательный маркер для диагностирования этого заболевания [1]. Все эти данные требуют более тщательного изучения, и в связи с этим актуальной становится задача детектирования дефенсинов как на уровне экспрессии генов, так и их количественного определения в биологическом материале. Так, для изучения возможной роли дефенсинов в регуляции врожденного и приобретенного иммунитета, их участия в механизмах карцерогенеза перспективными и высокоинформативными является иммунобиологические подходы. Важным инструментом для изучения экспрессии, клеточной локализации поиска белков-партнеров и клеточных мишеней при онкопатологиях являются высокоаффинные, специфические антитела доступ к которым ограничен.

Одной из проблем при получении антител к малым гидрофобным пептидам, с которой сталкиваются исследователи, есть их низкая иммуногенность, которая обуславливается как трехмерной структурой молекулы, так и свойствами самих пептидов. К таким низкомолекулярным пептидам относятся, в частности, дефенсины млекопитающих.

В данной работе рассматривается возможность получения высокоаффинных поликлональных моноспецифических антител, используя метод аутоконъюгации дефенсина hBD-2 с целью увеличения иммуногенности данного пептида, а также адаптация методов очистки антител.

Материалы и методы

Рекомбинантный hBD-2 получали путем наращивания и индукции бактериальной культуры *E. coli* (штамм XL-Gold), трансформированной плазмидной ДНК (pGEX-2T) с клонированным кДНК геном hBD-2. Выделение и очистку hBD-2 проводили как описано в [2], за исключением стадии очистки с использованием ионообменной хроматографии с Mono-SP column. Эта стадия была заменена очисткой с использованием Sep-Pak C₁₈ cartridge с носителем сефадекс (Waters, USA), водными растворами ацетонитрила (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 80%, 100%) с pH, который не превышает 4, а также бидистиллированной водой с pH 3. Подкисление растворов проводили, используя трифторуксусную кислоту (ТФУ). Белковые фракции после протеолиза тромбином подкисляли ТФУ до pH 3 и наносили на Sep-Pak C₁₈. Используя растворы ацетонитрила снимали с носителя фракции содержащие hBD-2 (40% раствор), GST+hBD-2 (50%, 60% растворы), GST (80% раствор). Качество очистки hBD-2 контролировали с помощью SDS-электрофореза в градиенте ПААГ (7–22%) по методу Леммли [5]. *Концентрацию белка* определяли по методу Бредфорд [3].

Аутоконъюгирование hBD-2 проходило в две стадии (с применением диметилацетамида и малиемидного эфира), которые состояли из активации пептидов и непосредственно аутоконъюгирования.

Иммунизацию лабораторных животных (кролики) проводили аутоконъюгированным hBD-2, используя разработанную ранее нами схему [2]. Антисыворотку получали через 7 дней после последней иммунизации. Высаливание иммуноглобулинов из сыворотки проводили насыщенным раствором сульфата аммония до 50% (v/v).

Хроматографическая очистка иммуноглобулинов на колонке с DEAE-Tuorearl. В работе использовали носитель DEAE-Tuorearl-650M фирмы ToyoSoda (Япония). Носитель уравнивали Na-фосфатным буфером, pH 7,2. После высаливания сульфатом аммония осадок иммуноглобулинов собирали центрифугированием (10 000 об/мин, 10–15 минут при +4 °C) и растворяли в минимальном объеме охлажденного раствора PBS pH 7,3. Диализ проводили против бидистиллированной воды в течении 20 минут, потом против охлажденного раствора PBS pH 7,3 в течении 18 часов при +4 °C. После диализа иммуноглобулины наносили на колонку с DEAE-Tuorearl. Колонку 3 промывали объемами раствора PBS буфера, pH 7,3. Белковые фракции, которые не связались с носителем, собирали отдельно для дальнейшей очистки.

Очистка IgG на ProteinG-sepharose. В работе использовали носитель Protein G-Sepharose фирмы Pharmacia (Швеция). Колонку уравнивали буфером PBS, pH 7,3. После нанесения предварительно очищенных на DEAE-Tuorearl иммуноглобулинов на колонку с ProteinG-sepharose, антитела инкубировали с носителем 2–3 часа при комнатной температуре, промывали колонку 10 объемами буфером PBS pH 7,3 для удаления не связавшегося белка и проводили элюцию 0,2 М глицином pH 2,5 с последующей нейтрализацией элюата 1 М раствором Tris-HCl, pH 11,0. Чистоту полученных IgG проверяли методом SDS-электрофореза в 15% ПААГ. Фракции, содержащие максимальное количество белка объединяли и диализовали против буфера PBS, pH 7,3, при +4 °C на протяжении 18 часов. Конечная концентрация IgG составляла в среднем 1,5–1,6 мг/мл.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Титр антител против белка hBD-2 в сыворотке на всех этапах очистки определяли с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с модификациями. Учитывая высокую гидрофобность антигенов, в работе использовали микропланшеты фирмы Nunc (Дания) с маркировкой Maxisorb. Имобилизацию дефенсина проводили на протяжении 18 часов при +4 °C в PBS буфере, pH 7,3. Конечная концентрация антигенов вносимых в каждую лунку составляла 1 мкг/мл. Все последующие операции проводили с использованием буфера PBS pH 7,3 с 0,1% Tween-20 (PBS-T). Антисыворотку инкубировали при комнатной температуре на протяжении двух часов, а полученные антитела в течении часа в тех же условиях.

Иммуноблот-анализ (Western blot analysis). Определение специфичности полученных антител к hBD-2 клеточных лизатах проводили с помощью иммуноблотинга по известной методике [4] с модификациями. В иммуноблоттинге для контроля специфичности антител против очищенного hBD-2 использовали лизат клеток млекопитающих Tіrex с добавлением глутатион-6-трансферазы (GST), химерного белка GST-hBD-2 и hBD-2.

Иммунопреципитация. Для проведения иммунопреципитации использовали Protein A Sepharose фирмы Pharmacia (Швеция). Все процедуры проводили по стандартной методике с небольшими модификациями. Продукты иммунопреципитации после проведения градиентного SDS-электрофореза в ПААГ, визуализировали прокраской геля серебром и параллельно постановкой иммуноблоттинга.

Результаты и обсуждение

Исходя из того, что данный малый гидрофобный пептид обладает слабыми иммуногенными свойствами, было решено повысить иммуногенность hBD-2, используя метод аутоконъюгации с применением диметилацетамида и малиемидного эфира. В результате аутоконъюгирования были получены молекулы пептидов, состоящие из ди-, тетра- и мономеров. Качество конъюгирования hBD-2 и mBD-2 проверяли с помощью градиентного SDS-электрофореза в ПААГ, а для hBD-2 Western blot анализом с использованием полученных ранее моноклональных антител против hBD-2 [6]. Результаты проверки аутоконъюгирования в иммуноблот-анализе с использованием полученных ранее моноклональных антител против hBD-2 представлены на рис. 1, А. При анализе рис. 1, А можно сделать вывод, что в результате аутоконъюгирования образуются тетрамеры дефенсина с молекулярной массой около 16 кДа.

В ходе получения поликлональных антител было выяснено, что данные антитела имели слабую аффинность к человеческому сывороточному альбумину. Для определения возможности возникновения данного “феномена” был проведен компьютерный анализ аминокислотных последовательностей человеческого альбумина и hBD-2, используя программу определения гомологии, предоставленную на веб-сервере LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html). Было найдено три сходные последователь-

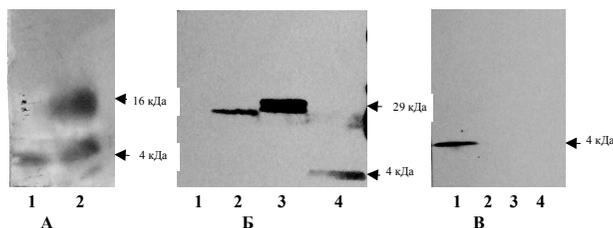


Рис. 1. **А.** Иммуноблоттинг с использованием полученных поликлональных анти-hBD-2 антител. Дорожки: 1 — очищенный белок hBD-2; 2 — аутоконъюгированный белок hBD-2. **Б.** Иммуноблоттинг с использованием полученных поликлональных анти-hBD-2 антител. Блокирование сайтов неспецифической сорбции в растворе сухого молока. Дорожки: 1 — лизат клеток Tirex; 2 — лизат клеток Tirex+GST+HSA (человеческий сывороточный альбумин); 3 — лизат клеток Tirex+GST-hBD-2; 4 — лизат клеток Tirex+hBD-2. **В.** Иммуноблоттинг с использованием полученных поликлональных анти-hBD-2 антител. Блокирование сайтов неспецифической сорбции сывороткой крупного рогатого скота. Дорожки: 1 — лизат клеток Tirex+очищенный белок hBD-2; 2 — лизат клеток Tirex+GST-hBD-2; 3 — лизат клеток Tirex+GST+HSA; 4 — лизат клеток Tirex

ности длиной 11, 6 и 4 аминокислотных остатка с соответствующими совпадениями 63,6%, 66,7% и 100%. Общая последовательность размером 11 аминокислотных остатков вполне может являться антигенной детерминантой, причем эта последовательность находится на С-конце hBD-2. И, возможно, что она в первую очередь подвергается воздействию протеаз при иммунизации лабораторных животных.

Для увеличения аффинности антител против hBD-2 и mBD-2 было необходимо очистить антитела от фракции, распознающей и человеческий сывороточный альбумин и hBD-2 из общего пула поликлональных антител. Для этого синтезировали афинную колонку Bg-CN sepharose 4B с пришитым на нее в качестве лиганда альбумином человека (ICN). Пул антител пропускался через колонку трижды, с промежуточной инкубацией 30 минут. Не связавшаяся с альбумином фракция антител была собрана и проверена на аффинность к hBD-2 и альбумину человека. Полученные антитела не выявили альбумин человека ни в ELISA, ни в Western blot анализе. При проверке в методе ELISA минимальная рабочая концентрация очищенных поликлональных анти-hBD-2 антител была 0,35 мкг/мл (результаты не представлены).

Для выяснения возможности определения нативного hBD-2 в биологических жидкостях с использованием полученных поликлональных антител необходимо было проверить их работу в методе иммунопреципитации. В эксперименте использовались клеточные лизаты, как бактериальных культур, продуцирующих рекомбинантный hBD-2, так и лизаты линии клеток A431, индуцированные EGF, продуцирующие нативный hBD-2. Было продемонстрировано, что очищенные поликлональные анти-hBD-2 антитела специфически узнавали белок hBD-2 в лизатах клеток бактериальных культур, трансформированных вектором с κДНК геном hBD-2, так и лизатах линии клеток A431 (результаты не представлены).

Последним этапом проверки работы полученных поликлональных антител был подбор условий и проведение иммуноблот-анализа. Результаты иммуноблот-анализа представлены на рис. 1, Б и В. При использовании в качестве агента для блокирования неспецифической сорбции раствора сухого молока, очищенные анти-hBD-2 неспецифически узнавали не только белок hBD-2, а также, химерный белок GST-hBD-2 и GST (рис. 1, Б). При использовании в качестве агента для блокирования неспецифической сорбции бычьей сыворотки, очищенные анти-hBD-2 специфически узнавали только белок hBD-2 (рис. 1, В). При проверке в методе иммуноблот-анализа минимальная рабочая концентрация очищенных поликлональных анти-hBD-2 антител была 1,75 мкг/мл. Таким образом, было оптимизировано условия работы очищенных антител в иммуноблот-анализе с использованием в качестве блокирующего агента сыворотку БРС.

Выводы

В работе представлены результаты получения и характеристики поликлональных кроличьих антител против низкомолекулярного, низкоиммуногенного и высококатионного человеческого пептида hBD-2. Разработано метод повышения иммуногенных свойств белка hBD-2 путем аутоконъюгирования.

Продемонстрировано роботу полученных специфических поликлональных антител в твердофазном иммуноферментном анализе, иммунопреципитации и иммуноблот-анализе.

Литература

1. Dynamic alteration of human b-defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin / Wook-Kang Huh, Takashi Oono, Yoshinori Shirafuji [et al.] // *J. Mol. Med.*— 2002.— Vol.80.— P. 678–684.
2. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 / Л.Н. Капустян, Р.Г. Киямова, В.С. Гришкова [и др.] / *Биополимеры и клетка.*— 2006.— Т.2, №22.— С. 117–120.
3. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / *Marian M. Bradford* // *Analytical Biochemistry.*— 1976.— Vol.86.— P. 193–200.
4. Idiopathic dilated cardiomyopathy in the young: Clinical profile and natural history / *Taliercio C.P., Seward J.B., Driscoll D.J.* [et al.] // *JACC.*— 1985.— Vol.6.— P. 1120–1126.
5. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 / *Ulrich K. Laemmli* // *Nature.*— 1970.— 227, №52.— P. 680–685.
6. *P.V. Pogrebnoy et al.* *Experemental Onkology*, March 2003, 25, p. 36–39.

Резюме

В работе продемонстрировано результаты получения специфических поликлональных антител против человеческого β -дефенсина-2. Показано роботу полученных анти-hBD-2 антител в твердофазном иммуноферментном анализе, иммунопреципитации и иммуноблот-анализе.

В роботі продемонстровано результати отримання специфічних поліклональних антитіл проти людського β -дефенсину-2. Показано роботу отриманих анти-hBD-2 антитіл в твердофазному імуноферментному аналізі, імунопреципітації та імуноблот-аналізі.

The results of the purification of high affinity polyclonal antibodies against human β -defensin-2 are represented in the work. Purified anti-hBD-2 antibodies were examined in ELISA, immunoprecipitation as well as in western blot analysis.

¹ЗУЕВА М.И., ²АТРАМЕНТОВА Л.А.

¹ГУ “Институт дерматологии и венерологии АМН Украины” Украина, 61057, Харьков, ул. Чернышевская, 7/9, e-mail: mahaqq@yandex.ru

²Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: wshkoda23@rambler.ru

ПОЛИМОРФИЗМ 1258G/A ГЕНА SPINK-5 ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

Хроническая красная волчанка — заболевание, связанное с аутоиммунными патологиями. Для него характерно поражение кожи и соединительной ткани. О роли генетических факторов в развитии этого заболевания свиде-