

**МЕТОД СЕЛЕКЦИИ ГИБРИДОМ,  
СЕКРЕТИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА  
К ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЕ,  
ОСНОВАННЫЙ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ  
ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

*Получена линия гибридом Т<sub>3</sub>, секретирующая моноклональные антитела к тирозил-тРНК синтетазе (КФ 6.1.1.1) из печени быка, с использованием метода селекции гибридом, основанного на определении ферментативной активности. Методом иммуноблотинга показано, что антигенная детерминанта для этих антител сохраняется в денатурирующих условиях.*

**Введение.** Моноклональные антитела (МАТ) являются перспективным инструментом для исследования структурно-функциональной организации аминоксил-тРНК синтетаз. С помощью МАТ к триптофанил-тРНК синтетазе из поджелудочной железы крупного рогатого скота было обнаружено, что триптофанил-тРНК синтетазы эукариот, прокариот и архебактерий имеют общую антигенную детерминанту линейного типа, т. е. консервативную последовательность аминокислот [1]. Более того, оказалось, что эта последовательность расположена на N-конце и не входит в состав активного центра, причем последующие исследования показали, что несущественная для ферментативной активности N-концевая область молекулы триптофанил-тРНК синтетазы, где локализуется консервативная антигенная детерминанта, необходима для компартиментализации триптофанил-тРНК синтетазы в клетках за счет глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [2]. Иммунохимическое окрашивание ультратонких срезов клеток высших эукариот с помощью моноклональных антител, конъюгированных с коллоидным золотом, выявило триптофанил-тРНК синтетазу не только в различных цитоплазматических компонентах, но также и в диффузном хроматине [3].

Цель настоящей работы заключалась в получении МАТ к тирозил-тРНК синтетазе из печени быка для выяснения консервативности определенных элементов структуры тирозил-тРНК синтетазы, для локализации синтетазы в клетках и т. д.

Успешное получение гибридом, секретирующих МАТ к триптофанил-тРНК синтетазе, было обусловлено тем обстоятельством, что крайне высокое содержание триптофанил-тРНК синтетазы в поджелудочной железе быка (2—3 % растворимых белков [4]) позволило избежать трудности в получении достаточных количеств фермента высокой степени чистоты. Это дало возможность проводить тестирование гибридом, используя метод прямого связывания антиген — антитело, т. е. вести скрининг по антигенной специфичности. Однако в ряде случаев крайне затруднительно получить гомогенный препарат фермента в необходимых количествах с целью последующего получения гибридом, секретирующих МАТ к выбранному ферменту. При наличии в препарате антигена примесей нельзя проводить селекцию гибридом по определению прямого связывания антиген — антитело. Обычно селекцию в таких случаях осуществляют на основе дискриминирующего анализа, используя надлежащие отрицательные контроли, которые выявляют все ненужные компоненты, оставляя желаемый антиген.

В настоящей работе мы предлагаем метод селекции гибридом, секретирующих МАТ к ферменту, основанный на определении энзиматической активности выбранного антигена. Этот метод, очевидно, не требует высокой чистоты фермента как при иммунизации, так и при последующем скрининге. Мы апробировали этот метод при отборе гибридом, секретирующих антитела к тирозил-тРНК синтетазе из печени быка.

**Материалы и методы.** Тирозил-тРНК синтетазу из печени быка получали, как описано ранее [5], с некоторыми модификациями. После экстракции печени в буфере и удаления клеточных осколков центрифугированием при 3000 об/мин в течение 1 ч супернатант подвергали осаждению pH 5,1—6,0 [6] вместо фракционирования сульфатом аммония. Активность фермента определяли в реакции аминоацилирования тРНК<sup>Tyr</sup> и АТР [<sup>32</sup>P] пирофосфатного (PP<sub>i</sub>) обмена [5].

Получение МАТ. Мышей линии *BALB/c* иммунизировали 50 мкг нативной тирозил-тРНК синтетазы 60 %-ной чистоты в полном адьюванте Фрейнда («Flow Laboratory», Англия) внутрибрюшинно. Через месяц мышей иммунизировали повторно по 100 мкг фермента без адьюванта в буфере, содержащем 0,05 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl (PBS). Месяц спустя иммунизацию повторяли аналогичным образом. Спленциты отбирали на 4-й день после последней иммунизации и гибридизовали их с миеломными клетками мышей линии *P<sub>3</sub>/Ag8.653* [7]. Культуральные среды первичных гибридных популяций проверяли на содержание специфических иммуноглобулинов с использованием теста ELISA [8]. Далее культуральные среды положительных клонов тестировали следующим образом. Нитроцеллюлозные фильтры BA85 («Schleicher and Schull», ФРГ), представляющие собой квадратные кусочки размером 5×5 мм, предварительно нумеровали, отмывали дистиллированной водой и инкубировали в течение 12—36 ч при 4 °С в растворе кроличьих поликлональных антител к постоянной части легких цепей иммуноглобулинов мыши (anti-C<sub>L</sub>) (0,2 мг/мл) в PBS, а затем в течение 1 ч инкубировали в том же буфере с 1 %-ным бычьим сывороточным альбумином (PBS-A) для блокирования оставшихся адсорбционных мест. Далее фильтры инкубировали в 100 мкл культуральной среды тестируемых гибридных популяций в течение 1 ч при встряхивании; затем — в растворе антигена (нативная тирозил-тРНК синтетаза, 0,2 мг/мл) в PBS-буфере в течение 1 ч при встряхивании, отмывали 4 раза по 100 мкл PBS-A. Связанную с нитроцеллюлозными фильтрами ферментативную активность тирозил-тРНК синтетазы определяли как в реакции аминоацилирования тРНК<sup>Tyr</sup>, так и в реакции АТР [<sup>32</sup>P]PP<sub>i</sub> обмена.

Отобранные по этому критерию клетки клонировали методом предельного разделения. Гибридомы пассировали на мышах линии *BALB/c* в форме асцитной опухоли. МАТ выделяли из асцитной жидкости хроматографией на колонке с ДЕАЕ-Тоуорегл (2×15 см), уравновешенной 0,01 М Na-фосфатным буфером, pH 7,9, в градиенте Na-фосфатного буфера (0,01—0,125 М, pH 7,9).

Электрофорез тирозил-тРНК синтетазы, очищенной и в экстракте из печени быка, после стадии 2 проводили в градиентном (7—22 %) полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии DS-Na [9].

Иммуноблоттинг проводили, как описано ранее [10].

**Результаты и обсуждение.** Схема предлагаемого метода, суть которого в конечном итоге сводится к определению энзиматической активности фермента в комплексе с МАТ, фиксированным на твердой фазе, представлена на рис. 1.

Этот метод мы апробировали при получении гибридом, секретирующих МАТ к тирозил-тРНК синтетазе из печени быка.

Первичный скрининг с помощью ELISA и использованием неочищенного фермента выявил восемь положительных клонов в тестируемых гибридомных популяциях. Культуральная среда этих восьми клонов была подвергнута последующему тестированию предлагаемым нами методом. В таблице представлены результаты по определению ферментативной активности комплекса E-МАТ-anti-C<sub>L</sub> по данным реакции АТР [<sup>32</sup>P]PP<sub>i</sub> обмена и аминоацилирования тРНК<sup>Tyr</sup>. Из таблицы видно, что только гибридома Т<sub>3</sub> действительно секретирует МАТ к тирозил-тРНК синтетазе. В качестве положительного контроля в данной системе мы использовали фермент, иммобилизованный на нитроцеллюлозе. Отсутствие ферментативной активности в комплексах фермента с МАТ, секретируемых гибридомами Т<sub>1</sub>, Т<sub>2</sub>, Т<sub>4</sub>—Т<sub>8</sub>, может объясняться двумя причинами. Во-первых, гибридомы секретируют антитела не к тирозил-тРНК синтетазе. Во-вторых, секретируемые антитела ингибируют ферментативную активность синтетазы. Для разрешения этой альтернативы мы провели следующий эксперимент. Поскольку фиксированная на нитроцеллюлозной мембране тирозил-тРНК синтетаза сохраняет свою ак-

тивность, мы рассмотрели влияние культуральных сред исследуемых гибридом на ферментативную активность синтетазы, фиксированной на твердой фазе. Оказалось, что ни одна из тестируемых культуральных сред, включая культуральную среду клона Т<sub>3</sub>, не оказывала влияния на активность фермента (данные не приведены). Таким образом, Т<sub>3</sub> — единственный из всех тестируемых клонов, который секретирует МАТ к тирозил-тРНК синтетазе.

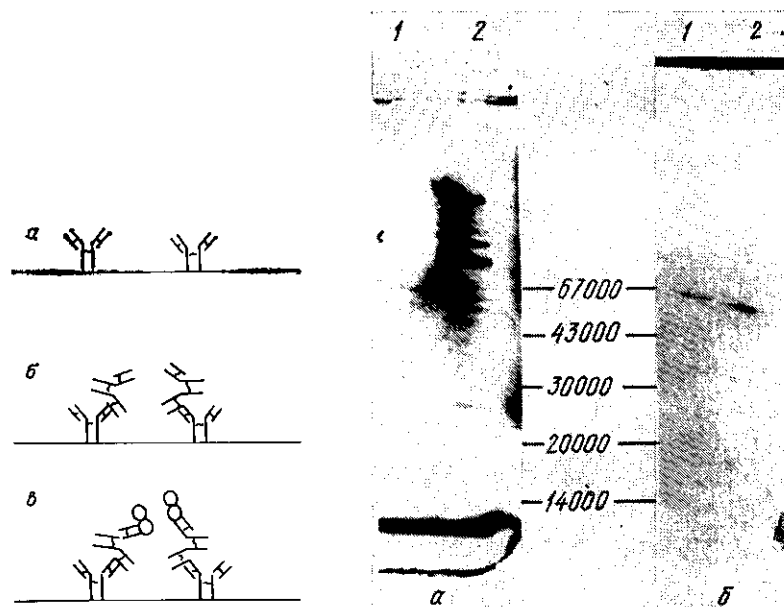


Рис. 1. Схема метода селекции: *a* — иммобилизация anti-CL на нитроцеллюлозных фильтрах; *б* — специфическое связывание МАТ с anti-CL; *в* — связывание антигена с МАТ

Fig. 1. Scheme of screening: *a* — immobilization of anti-CL with membrane; *б* — binding of Mabs with anti-CL; *в* — specific binding of antigen with Mabs

Рис. 2. Иммунореактивность МАТ Т<sub>3</sub> с тирозил-тРНК синтетазой из печени быка: *a* — гель окрашен раствором кумасси G-250 (стрелками обозначены положения белков-маркеров; цифры рядом — их молекулярные массы); *б* — фермент-связанная иммунологическая окраска (1 — очищенная тирозил-тРНК синтетаза (0,1 мкг); 2 — фермент после ДЕАЕ-Тойоpearl (2 мкг))

Fig. 2. Immunoreactivity of Mabs T<sub>3</sub> with tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver: *a* — staining with Coomassie G-250 (arrows indicate positions of protein markers with their molecular weights in kDa); *б* — enzyme-linked immunological staining (1 — purified tyrosyl-tRNA synthetase (0.1 μg); 2 — enzyme after DEAE-Toyopearl (2 μg))

Анализируя методом иммуноблотинга способность МАТ Т<sub>3</sub> взаимодействовать с очищенным препаратом фермента, нами выявлена способность антигенной детерминанты сохраняться при денатурации тирозил-тРНК синтетазы (рис. 2): видно, что при окраске кумасси G-250 (*a*, дорожка 1) полоса тирозил-тРНК синтетазы совпадает по подвижности с полосой, выявляемой по связанной с пероксидазой иммунологической окраске (*б*, дорожка 1). Эти данные указывают на линейность структуры обнаруженной антигенной детерминанты. Из множества растворимых белков гомогената ткани печени быка, полученных после хроматографии на ДЕАЕ-Тойоpearl, окрашиваемых кумасси (*a*, дорожка 2), только один, электрофоретическая подвижность которого совпадает с подвижностью полипептидной цепи тирозил-тРНК синтетазы, взаимодействует с полученным антителом (рис. 2, *б*, дорожка 2). Такое избирательное взаимодействие МАТ Т<sub>3</sub> с полипептидной цепью с молекулярной массой 59 000 свидетельствует об отсутствии антигенной детерминанты данной структуры на других растворимых белках клеток печени

быка, т. е. об уникальности ее для тирозил-тРНК синтетазы. Результаты этого эксперимента, с одной стороны, подтверждают специфичность МАТ полученной линии гибридом, а с другой — позволяют использовать метод иммуноблотинга с проявлением МАТ Т<sub>3</sub> для исследования эволюционной консервативности тирозил-тРНК синтетаз.

*Скрининг гибридом путем определения ферментативной активности тирозил-тРНК синтетазы, специфически связанной с МАТ на нитроцеллюлозных фильтрах*

*Screening of hybridomas by the determination of enzyme activity tyrosyl-tRNA synthetase specific binding with monoclonal antibody on the nitrocellulose filter*

Проба на нитроцеллюлозном фильтре			Активность тирозил-тРНК синтетазы в реакциях	
Anti-CL, 0,2 мг/мл	Культуральная среда, 100 мкл	Антиген, 0,2 мг/мл	Аминоацелированная тРНК <sup>Туг</sup> , имп/мин	АТР [ <sup>32</sup> P]РР <sub>i</sub> обмена, имп/мин
+	—	+	320	700
+	Т <sub>1</sub>	+	400	900
+	Т <sub>2</sub>	+	430	800
+	Т <sub>3</sub>	+	3100	12000
+	Т <sub>4</sub>	+	330	1100
+	Т <sub>5</sub>	+	350	750
+	Т <sub>6</sub>	+	430	900
+	Т <sub>7</sub>	+	320	720
+	Т <sub>8</sub>	+	350	800
—	—	+	3500	13000

Предложенный метод селекции гибридом не требует высокой чистоты фермента, что особенно важно в случае сложной структурной организации аминокислот-тРНК синтетаз у высших эукариот. Получение МАТ к тирозил-тРНК синтетазе открывает новые возможности установления связи ее структуры и функции.

Авторы выражают глубокую признательность Л. Л. Киселеву и Г. Х. Мацуке за постоянное внимание и ценные советы.

#### A METHOD FOR SELECTION OF HYBRIDOMAS, SECRETING MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST TYROSYL-tRNA SYNTHETASE, BASED ON MONITORING OF THE ENZYMATIC ACTIVITY

*T. A. Ribkinska, O. A. Vartanyan, V. V. Filonenko,  
L. L. Sidorik, A. I. Kornelyuk, S. F. Bersten*

*Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev,  
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow*

#### Summary

A new method for screening populations of hybrid cells secreting monoclonal antibodies (Mabs) against aminoacyl-tRNA synthetases (ARS) is developed as based on monitoring of the enzymatic activity of ARSes. The main advantage of this procedure stems from the fact that it permits using non-homogeneous ARS preparations both for immunization and for screening. While applying this procedure, hybridoma cell line T<sub>3</sub> secreting Mabs against bovine tyrosyl-tRNA synthetase has been produced and characterized.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Molecular and cellular studies of tryptophanyl-tRNA synthetase using monoclonal antibodies. Evaluation of common antigenic determinant in eukaryotic, prokaryotic and archaeobacterial enzyme which maps outside the catalytic/S. F. Bersten,*

- T. A. Zargarova, O. O. Favorova et al. // *Eur. J. Biochem.*— 1989.— 184, N 3.— P. 575—581.
2. *Bovine* tryptophanyl-tRNA synthetases and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase form a complex / V. V. Filonenko, S. F. Beresten, B. I. Rubikaite, L. L. Kisselev // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1989.— 161, N 2.— P. 481—488.
  3. Иммуноэлектронно-микроскопическое определение локализации триптофанил-тРНК-синтетазы в клетках бактерий и высших эукариот / В. И. Попенко, Н. Е. Черни, С. Ф. Берестень и др. // *Молекуляр. биология.*— 1989.— 23, № 6.— С. 1669—1681.
  4. *Tryptophanyl-tRNA* synthetase in a major soluble protein species in bovin pancreas / M. L. Sallafranque, M. Garret, J.-P. Benedetto et al // *Biochim. et biophys. acta.*— 1986.— 882, N 2.— P. 192—199.
  5. Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК синтетаза печени быка. Выделение и физико-химические свойства // *Молекуляр. биология.*— 1988.— 22, № 1.— С. 176—186.
  6. Ковалентные производные аминоксил-тРНК синтетаз с субстратами / Г. К. Ковалева, Т. И. Меркулова, М. К. Нурбеков, Э. Г. Холмуратов // *Там же.*— 1984.— 18, № 5.— С. 1412—1418.
  7. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines / Y. F. Kearney, A. Radbruch, B. Liesegang, K. Rajewsky // *J. Immunol.*— 1979.— 123, N 4.— P. 1548—1550.
  8. Engvall E., Perlman P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); quantitative assay for immunoglobulin G // *Immunochemistry.*— 1971.— 8, N 6.— P. 871—879.
  9. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*— 1970.— 227, N 5259.— P. 680—685.
  10. Триптофанил-тРНК синтетазы эукариот, прокариот и архебактерий имеют общую антигенную детерминанту / Т. А. Заргарова, С. Ф. Берестень, О. О. Фаворова, Л. Л. Киселев // *Докл. АН СССР.*— 1985.— 285, № 6.— С. 1484—1486.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 17.08.89