

УДК 577.123

А.А.Перова (4 курс, каф. ФХОМ), В.М.Седова, к.б.н., доц. каф. ФХБК

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИТЕЛ К ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЕ II ИЗ ЯДЕР ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА

Использование иммунологических методов находит самое широкое применение в клеточной биологии. Антитела против РНК-полимераз используются для локализации мест транскрипции генов класса I, II, III в интерфазном хроматине или на индивидуальных хромосомах. Кроме того, иммунологические методы находят применение в ранней диагностике заболеваний. Выявлено присутствие аутоантител против всех 3 форм РНК-полимераз в сыворотке пациентов, страдающих такими системными заболеваниями, как красная волчанка, рассеянный склероз и другие. Количественный анализ методом ELISA присутствия у пациентов аутоантител к РНК-полимеразам I, II, III на разных стадиях заболевания может применяться для ранней диагностики этих недугов. Поэтому освоение методов, которые позволяют охарактеризовать антитела к различным формам эукариотических РНК-полимераз, является актуальной задачей.

Ранее группой сотрудников лаборатории биохимических основ репродукции клетки были получены и охарактеризованы антитела к РНК-полимеразам I и III. Задачей данного исследования является характеристика антител к РНК-полимеразе II из ядер плаценты человека.

Объектом исследования являются антитела (иммуноглобулины, Ig), полученные в результате иммунизации кролика препаратом высоко очищенной РНК-полимеразы II из ядер плаценты человека. Иммунизация состояла из трех этапов: собственно иммунизации и 2 реиммунизаций. После каждой иммунизации сыворотку крови кролика собирали, нагревали до 40°C и осаждали 30 % сульфатом аммония. Осадок центрифугировали в течение 20 минут при 4000×g и растворяли в буфере PBS (0,01 М фосфатный буфер, pH 7,1 и 0,15 М NaCl).

Далее Ig очищали на колонке с иммобилизованным белком А (поверхностный белок из *Staphylococcus aureus*) методом афинной хроматографии. Иммобилизованный белок А, ковалентно присоединенный к матрице (сефароза) и обладающий высоким сродством к Ig G, удерживает их во время прохождения через колонку, в то время как другие белки раствора выходят из колонки. Промывка колонки от несвязавшегося материала осуществляется до полного исчезновения поглощения в элюате.

Элюцию с колонки связавшихся Ig G осуществляли 0,1М глициновым буфером, pH 3,15. Концентрацию белка в собранных фракциях определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Фракции, имевшие максимальное поглощение, объединяли, нейтрализовали 0,5М NaOH до pH 7,2...7,4 и диализовали против PBS в течении ночи.

В результате расчета концентрации белка по значениям оптической плотности, выявлено, что количество Ig G в сыворотке кролика после первой иммунизации составляло 1,2 мг/мл, после 1-ой и 2-ой реиммунизаций - 2,8 мг/мл и 3,2мг/мл, соответственно.

Далее проводили твердофазный иммуносорбентный анализ (ELISA). Результаты анализа показали, что антитела после первой иммунизации в концентрации 1 мкг/мл дали слабый положительный ответ. Фракции антител, полученные после второй иммунизации, отличались существенным ростом иммунологического титра. Антитела, полученные после третьей иммунизации, показали еще более выраженный иммунный ответ, который был в 1.6 раза интенсивнее предыдущего. По результатам ELISA была построена

диаграмма. Следует отметить, что антитела последней иммунизации давали выраженный иммунологический ответ даже при концентрации РНК-полимеразы II не 1Е, а 0.5Е .

Так как после третьей иммунизации был наиболее выраженный иммунный ответ, антитела третьей иммунизации далее были исследованы методом иммунодот. Брали РНК-полимеразу II в концентрациях 0.1Е, 0.2Е, 0.4Е, 0.6Е, 0.8Е и 1Е , наносили на бумагу NyBond с extra, инкубировали с раствором IgG кролика в концентрациях 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,25 мкг/мл. К дотам добавляли антитела против кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:1000. Комплекс антиген-антитело визуализировали хемиллюминисцентным методом: 0,8 % люминол, 0,07% кумаровая кислота и 0,3 % H_2O_2 .

Метод иммунодота выявил, что антитела против РНК-полимеразы II в концентрации 0,25 мкг/мл способны открыть РНК-полимеразу II в минимальной концентрации 0,1Е.

В результате проведенной работы были выделены и очищены многоступенчатым методом антитела с достаточно высокой специфичностью к РНК-полимеразе II. Результаты твердофазного анализа ELISA могут использоваться для наработки антител, необходимых при исследовании механизма транскрипции.