

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 57.083.3:577.(112.6+217.535)

©Коллектив авторов

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОСПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ИЗОФОРМЫ 2 ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 1А (eEF1A2)

Е.Ф. Колесанова^{1}, Т.Е. Фарафонова¹, Е.Ю. Алёшина^{1*},
Н.В. Пындык¹, М.В. Веремьева², А.В. Новосильная², М.И. Коваленко²,
В.Ф. Шалак², Б.С. Негруцкий²*

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
“Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича” Российской академии медицинских наук,
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, тел. 8-499-246-33-75,
факс 8-499-245-08-57, эл. почта: EKolesanova@yandex.ru

²Государственная ключевая лаборатория молекулярной и клеточной биологии,
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143, г. Киев,
ул. Академика Заболотного, 150; тел.: 38 044 5264397; факс 38 044 5260759;
e-mail: negrutskaa@imbg.org.ua.

С помощью анализа аминокислотных последовательностей изоформ 1 и 2 эукариотического фактора элонгации трансляции 1А (eEF1A) были выбраны два фрагмента изоформы 2 в качестве линейных антигенных детерминант для получения моноспецифичных антипептидных антител против этого белка. Синтезированные пептиды, соответствующие выбранным фрагментам, конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином и использовали для иммунизации мышей. Против конъюгата фрагмента 330-343 изоформы 2 eEF1A с бычьим сывороточным альбумином были получены антитела, специфически распознающие эту изоформу в нативном и частично денатурированном состоянии, но не взаимодействующие с изоформой 1 eEF1A. Показано, что эти моноспецифичные анти-eEF1A2 антитела могут применяться для выявления eEF1A2 как путём иммуноферментного сорбционного анализа, так и иммуноблоттинга.

Ключевые слова: фактор элонгации трансляции 1А, антипептидные антитела, синтез пептидов, иммуноферментный сорбционный анализ, иммуноблоттинг.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Эукариотический фактор элонгации трансляции 1А (еEF1А) отвечает за доставку аминоксил-тРНК в А сайт рибосомы и вносит существенный вклад в обеспечение корректного кодон-антикодонного взаимодействия [1]. В соответствии с концепцией каналирования еEF1А может принимать участие и в передаче деацилированной на рибосоме тРНК назад к аминоксил-тРНК синтетазе для повторного аминоксилирования [2, 3]. Кроме того, еEF1А выполняет целый ряд функций, не связанных с белковым синтезом, например, взаимодействует с F-актином [4] и тубулином [5], а также формирует комплекс с кальмодулином, что может иметь значение для процессов фосфорилирования, катализируемых Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой киназой [6]. Показано, что еEF1А играет роль, пока ещё точно не выясненную, в процессах внутриклеточного протеолиза и апоптоза, а также обладает шапероноподобными свойствами [7, 8].

Существуют две изоформы еEF1А, кодируемые разными генами. Сходство аминокислотных последовательностей этих белков составляет 97%, идентичность – 93%. Экспрессия изоформ еEF1А в организме является тканеспецифичной и происходит по принципу “или-или” [7]. В подавляющем большинстве тканей экспрессируется еEF1А1, и только в миоцитах поперечнополосатых мышц и в нейронах наблюдается экспрессия еEF1А2, хотя в пренатальном периоде в миоцитах и нейронах также наблюдается экспрессия изоформы 1 [9, 10]. Недавно было обнаружено, что изоформа 2 может появляться и в других тканях организма, однако такое её необычное появление практически всегда связано с онкогенезом [11-13], а в некоторых случаях онкогенная роль еEF1А2 была прямо показана [14, 15]. В связи с этим особый интерес представляет разработка высокоспецифичных средств детекции изоформы 2 в опухолевых тканях для оценки прогностической значимости надэкспрессии этого белка в опухолях различной локализации. Эта задача является нетривиальной из-за большого сходства двух изоформ и консервативности аминокислотных последовательностей еEF1А среди разных видов животных, даже эволюционно удалённых (см. <http://www.uniprot.org/uniprot/>). В литературе упоминалось применение моноспецифичных антипептидных антител против изоформ 1 и 2 еEF1А мышей для иммуногистохимического анализа указанных белков, однако авторами в качестве гаптенов были использованы фрагменты изоформ, захватывающие, помимо различающихся, и консервативные области белков; подробные характеристики антител не были приведены [16]. Коммерчески доступные препараты антител, в том числе и моноклональных, не обладают селективностью в отношении той или иной изоформы еEF1А. В данной работе описано получение препарата моноспецифичных антипептидных антител против изоформы 2 фактора элонгации трансляции 1А (рис. 1). В работе приводятся характеристики этого препарата, включая его использование для селективного выявления еEF1А2 методами иммуноферментного сорбционного анализа (ИФСА) и иммуноблоттинга.

МЕТОДИКА.

Анализ аминокислотных последовательностей белков. Аминокислотные последовательности изоформ 1 и 2 человека, кролика и мыши извлекали из базы знаний UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>; идентификационные номера: EF1A1_HUMAN – P68104, EF1A2_HUMAN – Q05639, EF1A1_RABBIT – P68105, EF1A2_RABBIT – Q71V39, EF1A1_MOUSE – P10126, EF1A2_MOUSE – P62631) и выравнивали с помощью программы CLUSTAL W [17].

		10	20	30	40	50	60	70
Hum	EF1A.2	HGKEKTHIMI	VVIGHVDSGK	STTTGHLIYK	CGGIDKRTIE	KFEKEAAEHG	KGSEKYZAWVL	DKLKAERER G
Rab	EF1A.2	HGKEKTHIMI	VVIGHVDSGK	STTTGHLIYK	CGGIDKRTIE	KFEKEAAEHG	KGSEKYZAWVL	DKLKAERER G
Mur	EF1A.2	HGKEKTHIMI	VVIGHVDSGK	STTTGHLIYK	CGGIDKRTIE	KFEKEAAEHG	KGSEKYZAWVL	DKLKAERER G
Hum	EF1A.1	HGKEKTHIMI	VVIGHVDSGK	STTTGHLIYK	CGGIDKRTIE	KFEKEAAEHG	KGSEKYZAWVL	DKLKAERER G
Rab	EF1A.1	HGKEKTHIMI	VVIGHVDSGK	STTTGHLIYK	CGGIDKRTIE	KFEKEAAEHG	KGSEKYZAWVL	DKLKAERER G
Mur	EF1A.1	HGKEKTHIMI	VVIGHVDSGK	STTTGHLIYK	CGGIDKRTIE	KFEKEAAEHG	KGSEKYZAWVL	DKLKAERER G
		80	90	100	110	120	130	140
Hum	EF1A.2	ITIDISLWKE	ETTKYYITII	DAPGHRDFIK	NHITGT SQAD	CAVLIVRAGV	GEFEAGISKV	GQTREHALLA
Rab	EF1A.2	ITIDISLWKE	ETTKYYITII	DAPGHRDFIK	NHITGT SQAD	CAVLIVRAGV	GEFEAGISKV	GQTREHALLA
Mur	EF1A.2	ITIDISLWKE	ETTKYYITII	DAPGHRDFIK	NHITGT SQAD	CAVLIVRAGV	GEFEAGISKV	GQTREHALLA
Hum	EF1A.1	ITIDISLWKE	ETSKYYVTII	DAPGHRDFIK	NHITGT SQAD	CAVLIVRAGV	GEFEAGISKV	GQTREHALLA
Rab	EF1A.1	ITIDISLWKE	ETSKYYVTII	DAPGHRDFIK	NHITGT SQAD	CAVLIVRAGV	GEFEAGISKV	GQTREHALLA
Mur	EF1A.1	ITIDISLWKE	ETSKYYVTII	DAPGHRDFIK	NHITGT SQAD	CAVLIVRAGV	GEFEAGISKV	GQTREHALLA
		150	160	170	180	190	200	210
Hum	EF1A.2	YTLGVKQLIV	GVNKHDSSTEP	AYSEKRYDEI	VKEVSAIYIKK	IGYNPATVPE	VPISGWHGDN	HLEPSPMHPW
Rab	EF1A.2	YTLGVKQLIV	GVNKHDSSTEP	AYSEKRYDEI	VKEVSAIYIKK	IGYNPATVPE	VPISGWHGDN	HLEPSPMHPW
Mur	EF1A.2	YTLGVKQLIV	GVNKHDSSTEP	AYSEKRYDEI	VKEVSAIYIKK	IGYNPATVPE	VPISGWHGDN	HLEPSPMHPW
Hum	EF1A.1	YTLGVKQLIV	GVNKHDSSTEP	PYSQKRYEBI	VKEVSTIYIKK	IGYNPDTVAF	VPISGWHGDN	HLEPSPMHPW
Rab	EF1A.1	YTLGVKQLIV	GVNKHDSSTEP	PYSQKRYEBI	VKEVSTIYIKK	IGYNPDTVAF	VPISGWHGDN	HLEPSPMHPW
Mur	EF1A.1	YTLGVKQLIV	GVNKHDSSTEP	PYSQKRYEBI	VKEVSTIYIKK	IGYNPDTVAF	VPISGWHGDN	HLEPSPMHPW
		220	230	240	250	260	270	280
Hum	EF1A.2	EKGWKVERKE	GNASGVSLLE	ALDTILPPTTR	PTDKPLRLPL	QDVYKIGGIG	TVPVGRVETG	ILRP GHV VTF
Rab	EF1A.2	EKGWKVERKE	GNASGVSLLE	ALDTILPPTTR	PTDKPLRLPL	QDVYKIGGIG	TVPVGRVETG	ILRP GHV VTF
Mur	EF1A.2	EKGWKVERKE	GNASGVSLLE	ALDTILPPTTR	PTDKPLRLPL	QDVYKIGGIG	TVPVGRVETG	ILRP GHV VTF
Hum	EF1A.1	EKGWKVTRKD	GNASGTTTLE	ALDCILPPTTR	PTDKPLRLPL	QDVYKIGGIG	TVPVGRVETG	VLKP GHV VTF
Rab	EF1A.1	EKGWKVTRKD	GNASGTTTLE	ALDCILPPTTR	PTDKPLRLPL	QDVYKIGGIG	TVPVGRVETG	VLKP GHV VTF
Mur	EF1A.1	EKGWKVTRKD	GNASGTTTLE	ALDCILPPTTR	PTDKPLRLPL	QDVYKIGGIG	TVPVGRVETG	VLKP GHV VTF
		290	300	310	320	330	340	350
Hum	EF1A.2	APVNIITTEVK	SVEHGHEALS	EALPGDNVGF	NVKNVSVKDI	RRGNVCGDSK	SDPPQERRAQF	TSQVIILNHP
Rab	EF1A.2	APVNIITTEVK	SVEHGHEALS	EALPGDNVGF	NVKNVSVKDI	RRGNVCGDSK	SDPPQERRAQF	TSQVIILNHP
Mur	EF1A.2	APVNIITTEVK	SVEHGHEALS	EALPGDNVGF	NVKNVSVKDI	RRGNVCGDSK	SDPPQERRAQF	TSQVIILNHP
Hum	EF1A.1	APVNIITTEVK	SVEHGHEALS	EALPGDNVGF	NVKNVSVKDV	RRGNVCGDSK	NDPPHERAGF	TAQVIILNHP
Rab	EF1A.1	APVNIITTEVK	SVEHGHEALS	EALPGDNVGF	NVKNVSVKDV	RRGNVCGDSK	NDPPHERAGF	TAQVIILNHP
Mur	EF1A.1	APVNIITTEVK	SVEHGHEALS	EALPGDNVGF	NVKNVSVKDV	RRGNVCGDSK	NDPPHERAGF	TAQVIILNHP
		360	370	380	390	400	410	420
Hum	EF1A.2	GQISAGYSPV	IDCHTAHILAC	KFABLKEKID	RRSGKKLEDN	PKSLKSGDAA	IVDHVP GKPH	CVESFSQYPP
Rab	EF1A.2	GQISAGYSPV	IDCHTAHILAC	KFABLKEKID	RRSGKKLEDN	PKSLKSGDAA	IVDHVP GKPH	CVESFSQYPP
Mur	EF1A.2	GQISAGYSPV	IDCHTAHILAC	KFABLKEKID	RRSGKKLEDN	PKSLKSGDAA	IVDHVP GKPH	CVESFSQYPP
Hum	EF1A.1	GQISAGYAPV	LDCHTAHILAC	KFABLKEKID	RRSGKKLEDG	PKELKSGDAA	IVDHVP GKPH	CVESFSQYPP
Rab	EF1A.1	GQISAGYAPV	LDCHTAHILAC	KFABLKEKID	RRSGKKLEDG	PKELKSGDAA	IVDHVP GKPH	CVESFSQYPP
Mur	EF1A.1	GQISAGYAPV	LDCHTAHILAC	KFABLKEKID	RRSGKKLEDG	PKELKSGDAA	IVDHVP GKPH	CVESFSQYPP
		430	440	450	460			
Hum	EF1A.2	LGRFAVEDHR	QTVAVGVIKK	VEKKS GGA GK	VTKSAQKAQK	AGK		
Rab	EF1A.2	LGRFAVEDHR	QTVAVGVIKK	VEKKS GGA GK	VTKSAQKAQK	AGK		
Mur	EF1A.2	LGRFAVEDHR	QTVAVGVIKK	VEKKS GGA GK	VTKSAQKAQK	AGK		
Hum	EF1A.1	LGRFAVEDHR	QTVAVGVIKK	VDKKBAGA GK	VTKSAQKAQK	A_K		
Rab	EF1A.1	LGRFAVEDHR	QTVAVGVIKK	VDKKBAGA GK	VTKSAQKAQK	A_K		
Mur	EF1A.1	LGRFAVEDHR	QTVAVGVIKK	VDKKBAGA GK	VTKSAQKAQK	A_K		

Рисунок 1.

Сравнение аминокислотных последовательностей изоформ 1 и 2 eEF1A человека, кролика и мыши. Позиции аминокислотных остатков, различающихся в изоформах 1 и 2 eEF1A, выделены серым цветом. Аминокислотный остаток изоформы 2 eEF1A мыши, отличный от аминокислотного остатка изоформ 2 eEF1A кролика и человека в этой позиции, отмечен белым шрифтом на чёрном фоне.

АНТИТЕЛА ПРОТИВ ИЗОФОРМЫ 2 ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 1А

Синтез пептидов. Пептиды синтезировали твёрдофазным методом на полистирол-дивинилбензольном полимере, модифицированном 4-(2',4'-диметоксифенил-аминометил)-феноксиметильными группами (Rink amide), с ёмкостью 0,55 ммоль активных групп/г полимера ("Applied Biosystems", США) исходя из начальной загрузки смолы в количестве, соответствовавшем 20 мкмольм активных групп, или 29,4 мг. Использовали 9-флуоренилметоксикарбонил(Fmoc)-защищённые по α-аминогруппе L-аминокислоты со следующими защитами боковых функциональных групп: Asp (D), Glu (E) – *трет*-бутоксид; Gln (Q), Asn (N) и Cys (C) – тритильной; Arg (R) – 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонильной; Lys (K) – *трет*-бутилоксикарбонильной, Ser (S) и Thr (T) – *трет*-бутильной (все – "Applied Biosystems"). Синтез проводили на автоматическом синтезаторе 433A фирмы "Applied Biosystems" в среде N,N-диметилформамида (ос.ч., "Спектр-хим", Россия). Fmoc-защиту с α-аминогруппы удаляли обработкой 20%-ным раствором 4-метилпиперидина ("Acros Organics", Бельгия) [18]. Fmoc-аминокислоты активировали гексафторфосфатом 1-[(1-(циано-2-этокси-2-оксоэтилиден-аминоокси)-диметиламино-морфолинометил)метанаминия (COMU; "Bachem", Швейцария) (1 экв.) в присутствии 2,4,6-коллидина (2 экв.) ("Acros Organics") в N,N-диметилформамиде [19]. В реакциях присоединения использовали 5-кратный избыток Fmoc-аминокислот. Пептиды ацетилювали по α-аминогруппе на носителе и снимали со смолы вместе с удалением защит с боковых функциональных групп обработкой смесью трифторуксусная кислота (ТФУ) : 3,6-диокса-1,8-октандитиол : три-изопропилсилан : анизол : вода 183:5:2:5:5 (об./об.) в течение 2 ч [18]. Пептиды осаждали смесью метил-трет-бутиловый эфир : гексан 1:2 (об./об.) и высушивали над КОН.

Очистку пептидов проводили ВЭЖХ на обращённой фазе (колонок ZORBAX SB-C18 9,4×250 мм, хроматографическая станция "Agilent 1100", США) в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 70% за 40 мин в 0,1%-ном водном растворе ТФУ при скорости элюции 4 мл/мин и регистрации абсорбции элюата при 214 нм. Полученные препараты пептидов упаривали и лиофилизировали. Степень чистоты пептидов определяли аналитической ВЭЖХ (колонок ZORBAX SB-C18 4,6×2150 мм, градиент концентрации ацетонитрила в 0,1%-ном водном растворе ТФУ 0-50% за 25 мин, скорость элюции 1 мл/мин) и времяпролётной масс-спектрометрией с матрично активируемой лазерной десорбцией-ионизацией (MALDI-TOF масс-спектрометрия; масс-спектрометр MICROFLEX, "Bruker Daltonics", Германия; матрица – α-циано-4-гидроксикоричная кислота, регистрация положительно заряженных ионов в диапазоне 500-2000 Да).

Конъюгацию пептидов с бычьим сывороточным альбумином (БСА) проводили с использованием: пептид №1 – N-гидроксисукцинимидного эфира 3-малеимидобензойной кислоты ("Sigma-Aldrich", США), пептид №2 – глутарового альдегида ("Sigma-Aldrich") [20] (номера пептидов – см. таблицу).

Таблица.

№ п/п	Структура синтезированного пептида	Мол. масса
№1	Ac-VERKEGNASGVSLC-CONH ₂	1490,7
№2	Ac-KSDPPQEAAQFTSQ-CONH ₂	1574,7

Антисыворотку, содержащую антипептидные антитела, получали иммунизацией белых беспородных мышей-самцов в возрасте от 12 до 18 недель. Мышам вводили внутривенно 4 раза с интервалом в 2 недели по 20 мкг конъюгата БСА-пептид в 100 мкл смеси 1:1 (об./об.) адъюванта Фрейнда ("Calbiochem", Швейцария) и фосфатно-солевого буфера, pH 7,2 (ФСБ) в виде однородной эмульсии. Первые две инъекции проводили с использованием полного адъюванта Фрейнда, последующие две – неполного адъюванта Фрейнда. Через неделю после последней инъекции проводили забор крови после декапитации. Каждым конъюгатом иммунизировали группу из 5 животных. Контрольной группе (5 мышей) вводили вместо раствора конъюгата пептида с БСА смесь ФСБ с адъювантом Фрейнда по той же схеме, что и опытным животным. Сыворотку крови разделяли на аликвоты и хранили при -20°C.

Определение титра антител против изоформ 1 и 2 eEF1A в сыворотках крови иммунизированных мышей проводили методом иммуноферментного сорбционного анализа (ИФСА) с использованием в качестве антигенов соответствующих очищенных белков в нативном и частично денатурированном (после прогревания 15 мин при 70°C) состоянии. В качестве антигенов использовали препараты eEF1A1, eEF1A2 и лизаты тканей кролика, поскольку eEF1A1 и eEF1A2 кролика полностью идентичны по первичной структуре соответствующим белкам человека (рис. 1). Гомогенные препараты eEF1A1 и eEF1A2 [21, 22] сорбировали на поверхность лунок иммунологического планшета высокой сорбционной ёмкости ("Costar", США) из раствора в 0,05 М Na-карбонат-бикарбонатном буфере, pH 8,5 в количестве 1 мкг белка на лунку планшета. Далее проводили ИФСА, как описано ранее [23].

Лизаты тканей печени и мышц кролика получали из образцов тканей здоровых животных после эвтаназии. Образцы тканей растирали в жидком азоте в керамической ступке. Затем добавляли лизирующий буфер (10 mM калий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% (по объёму) глицерин, 1% (масса/объём) Nonidet P-40, 1 mM дитиотреит, 0,1 mM фенилметилсульфонилфторид) в количестве 1 мл на 1 мг ткани и инкубировали 30 мин во льду. Лизат центрифугировали 30 мин при 14000 g, 4°C. В полученный супернатант добавляли буфер Лэммли для образцов в 4-кратной концентрации (4×) (250 mM трис-HCl буфер, pH 6,8, 8% (масса/объём) додецилсульфат натрия (ДДС-Na), 40% (по объёму) глицерин, 200 mM дитиотреит, 0,05% (масса/объём) бромфеноловый синий) в количестве 1 объём 4× буфера Лэммли на 3 объёма супернатанта. Образцы инкубировали на кипящей водяной бане 2 мин и хранили при -20°C до использования.

Диск-электрофорез конъюгатов пептидов с БСА и лизатов тканей в 10%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na проводили по методу Лэммли [24].

Локализацию изоформ eEF1A в пластине ПААГ методом иммуноблоттинга проводили, как описано ранее [25]. В качестве препаратов специфичных антител против eEF1A использовали разведённую в 100 раз блокирующим буфером (5%-ный раствор БСА (масса/объём) в 50 mM трис-HCl буфере, pH 7,6, содержащем 0,15 M NaCl и 0,1% (масса/объём) Твин-20) сыворотку крови иммунной мыши, содержащую антипептидные антитела против eEF1A2, либо препарат моноклональных антител, узнающих обе изоформы eEF1A ("Upstate", США). Связавшиеся с изоформами eEF1A антитела проявляли конъюгатом антител кролика против

АНТИТЕЛА ПРОТИВ ИЗОФОРМЫ 2 ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 1А

иммуноглобулинов G мыши с пероксидазой хрена ("Sigma", США, рабочее разведение 1:5000) с использованием хемилюминесцентного косубстрата пероксидазы ("Pierce", США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Участки изоформы 2 фактора элонгации трансляции 1А, использованные в качестве линейных В-эпитопов для получения моноспецифичных антипептидных антител, выбирали путём сопоставления аминокислотных последовательностей изоформ 1 и 2 eEF1A человека и мыши (рис. 1). Были выбраны 2 участка, каждый из которых содержал четыре а.о., различающихся в двух изоформах фактора элонгации 1А: 216-228 VERKEGNASGVSL (участок № 1) и 330-343 KSDPPQEAAQFTSQ (участок № 2). Участки содержали более 50% гидрофильных аминокислотных остатков, что указывало на высокую вероятность локализации их на поверхности молекулы белка. Один из а.о. в каждом из участков (Glu217 в участке № 1 и Gln335 в участке № 2) в изоформе 1 заменены на заметно отличающиеся по химической структуре и свойствам остатки Thr217 и Met335, соответственно. Участок 330-343 содержал также единственный различающийся в аминокислотных последовательностях eEF1A2 человека и мыши остаток (у мыши – Ala331, у человека – Ser331). Для получения антител против этих участков были синтезированы ацетилированные по N-концевой α-аминогруппе и амидированные по C-концевой карбоксильной группе пептиды (таблица). Поскольку присутствовавший в участке 216-228 остаток Lys219 располагался почти в середине участка и мог быть важен для взаимодействия с антителами, ε-аминогруппу этого а.о. нежелательно было использовать для присоединения пептида к белку-носителю. В пептид №1 был добавлен с C-конца дополнительный остаток Cys (выделен жирным шрифтом), SH-группа которого обеспечила конъюгацию пептида с белком-носителем.

Полученные препараты пептидов имели степень чистоты не менее 90% по данным аналитической ВЭЖХ и MALDI-TOF масс-спектрометрии (рис. 2).

По данным диск-электрофореза в ПААГ с ДДС-Na, молекулярные массы полученных пептид-белковых конъюгатов превышали молекулярную массу БСА в среднем на 10-15 кДа, что свидетельствовало о присоединении нескольких остатков пептида к молекуле белка-носителя.

При иммунизации мышей конъюгатом пептида №1 с БСА не удалось добиться иммунного ответа с эффективным формированием антител против eEF1A2 (в сыворотке крови одной мыши из пяти титр антител против eEF1A2 составлял 1:250, остальные особи не развили иммунного ответа с образованием антибелковых антител), причём эти антитела со сравнимой эффективностью взаимодействовали с изоформой 1 eEF1A (титр антител против eEF1A1 1:100).

При иммунизации мышей конъюгатом пептида №2 с БСА 3 мыши из 5 развили иммунный ответ с образованием специфичных антител против eEF1A2 (рис. 3А). Титры анти-eEF1A2 антител составляли, соответственно 1:1250, 1:6250 и 1:250. Эти антитела обладали специфичностью только к изоформе 2 eEF1A, не связывая изоформу 1. В дальнейшей работе использовали антисыворотку, полученную от мыши №2, как имеющую наиболее высокий титр антител против eEF1A2. Величина титра антител в этой антисыворотке против частично денатурированного eEF1A2 (рис. 3Б) практически совпадала с величиной титра антител против нативного eEF1A2, что свидетельствовало о возможности использовать полученный препарат антител не только для селективного определения изоформы 2 eEF1A с помощью ИФСА, но и для выявления этого белка методом иммуноблоттинга.

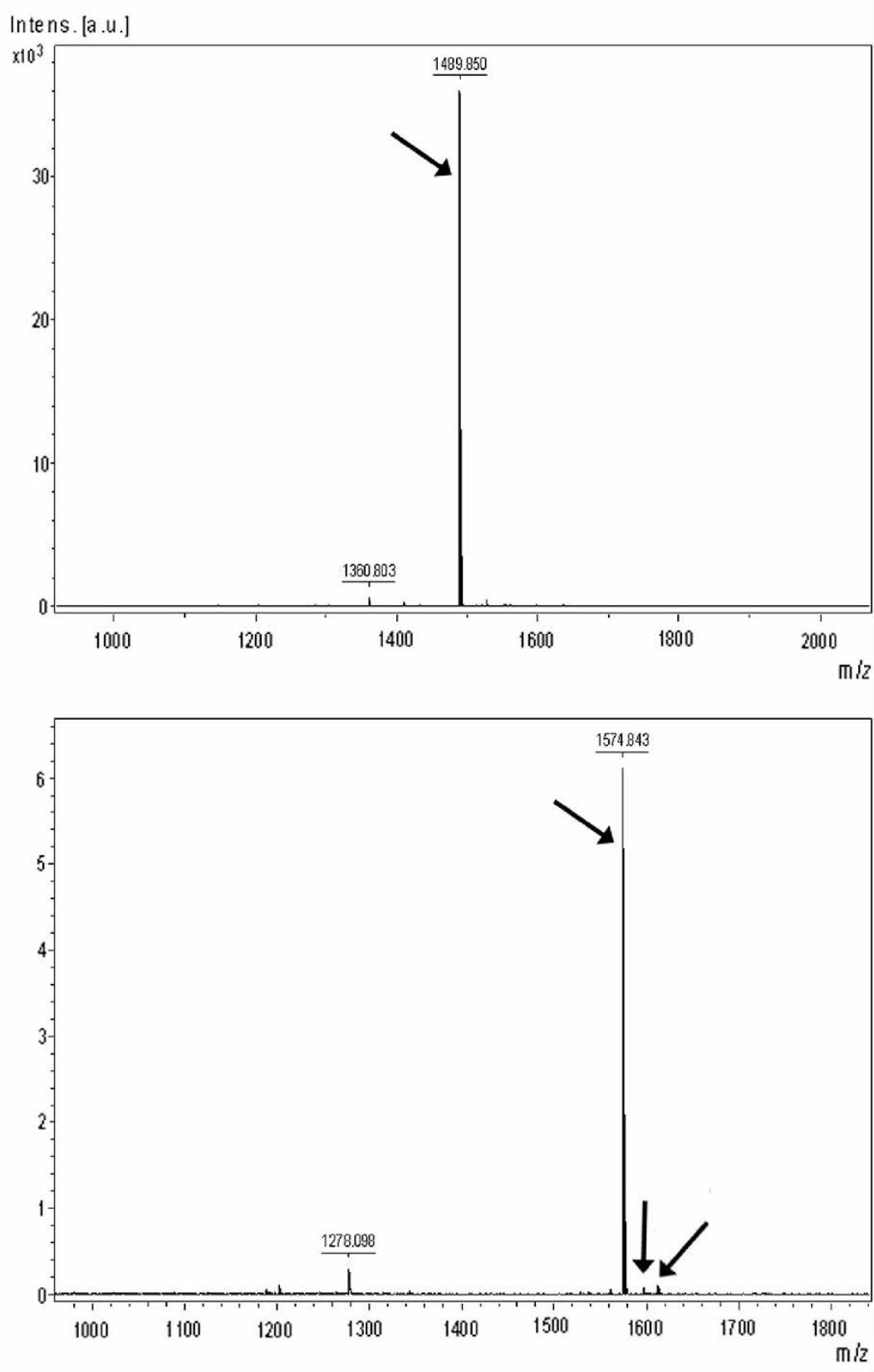


Рисунок 2.

MALDI-TOF масс-спектры пептидов №1 (А) и №2 (Б). Стрелками обозначены сигналы молекулярных ионов целевых пептидов и их солей с ионами Na^+ и K^+ .

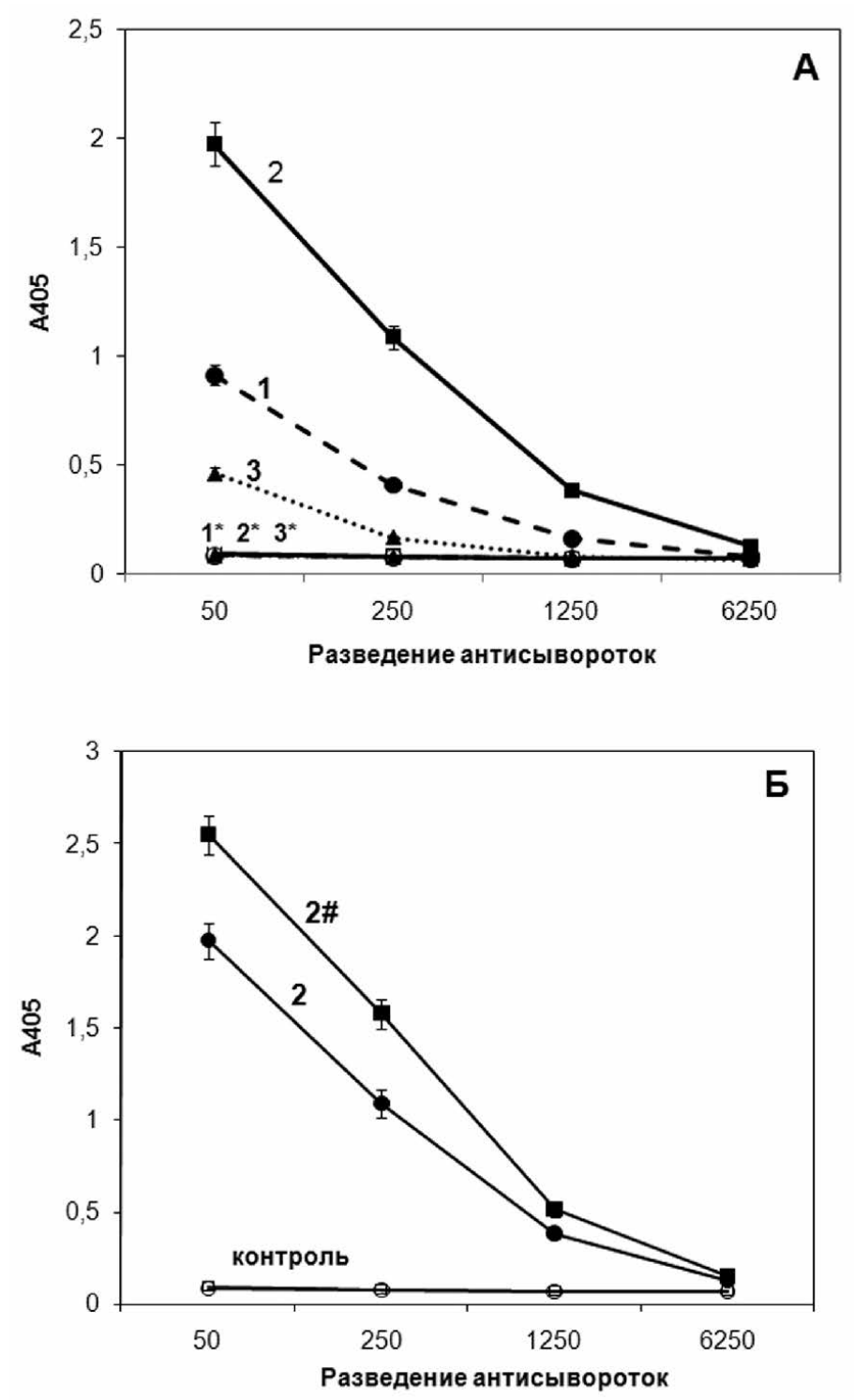


Рисунок 3.

Определение титров антител против изоформ 1 и 2 eEF1A кролика в сыворотках крови мышей, иммунизированных конъюгатом пептида №2 с БСА, методом ИФСА.

А - определение титров антител, специфичных к нативным белкам изоформ eEF1A.

Показаны результаты только для сывороток крови мышей, содержащих анти-eEF1A2 антитела. 1-3 - номера животных, символом * отмечены кривые титрования анти-eEF1A1-специфичных антител. **Б** - сравнение титров антител против изоформы 2 eEF1A в нативном и частично денатурированном (#) состояниях в сыворотке крови мыши №2.

На рисунке 4 приведены результаты выявления изоформ 1 и 2 eEF1A соответствующими препаратами антител методом иммуноблоттинга в лизатах тканей после электрофореза в ПААГ с ДДС-Na. Эксперименты проводили с использованием лизата мышечной ткани, содержащего изоформу eEF1A2, и лизата ткани печени как источника eEF1A1. Из рисунка видно, что антитела из сыворотки крови мыши, иммунизированной конъюгатом фрагмента eEF1A2 330-343, выявляли на иммуноблоте только изоформу eEF1A2 (рис. 4А), присутствующую в лизате ткани мышц, тогда как коммерческий препарат антител против eEF1A выявлял обе изоформы (рис. 4Б).

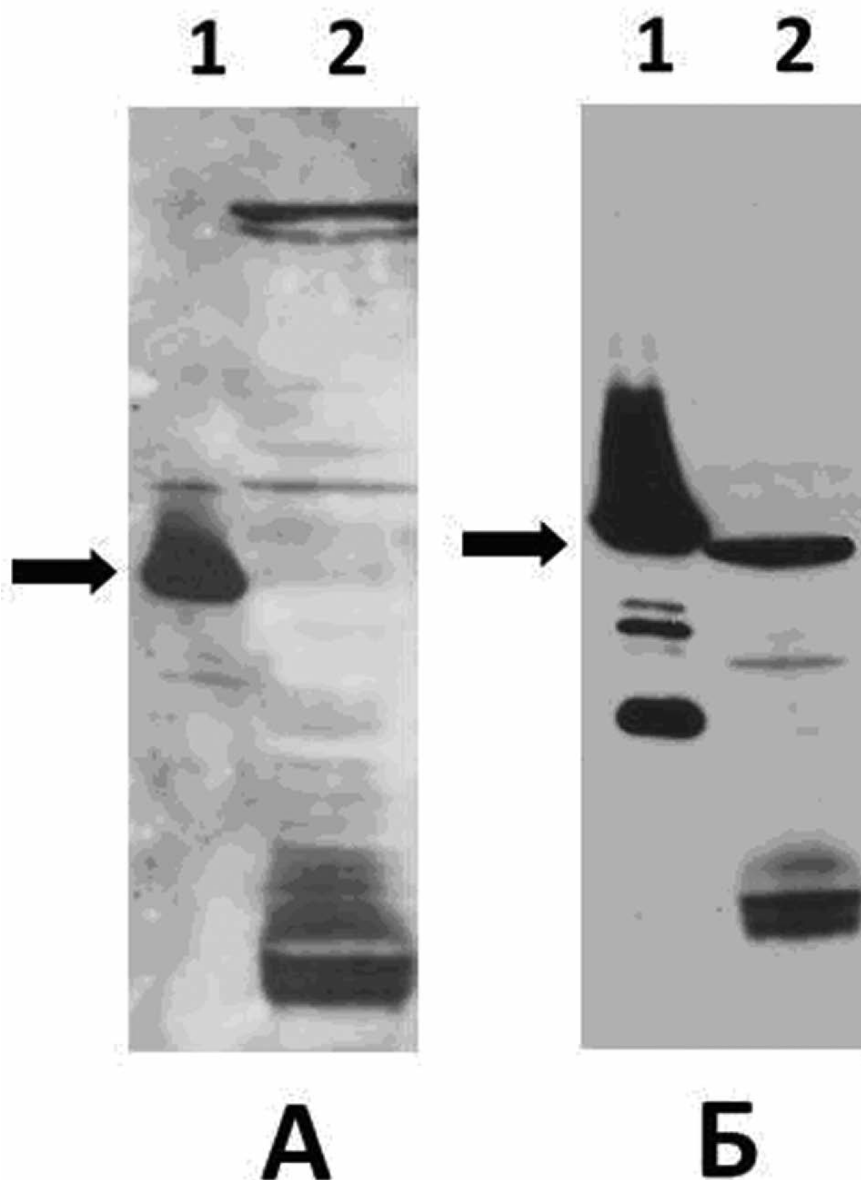


Рисунок 4.

Выявление изоформ 1 и 2 eEF1A в лизатах тканей мышц и печени кролика методом иммуноблоттинга после электрофореза в ПААГ. **А** - иммуноблоттинг с использованием сыворотки крови мыши №2, содержащей анти-eEF1A2 антитела; **Б** - иммуноблоттинг с использованием моноклональных антител против eEF1A ("Upstate", США).

1 - лизат мышечной ткани; 2 - лизат ткани печени. Стрелки показывают локализацию в геле и на мембране полосы, соответствующей изоформе 1 или 2 eEF1A.

АНТИТЕЛА ПРОТИВ ИЗОФОРМЫ 2 ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 1А

При выборе обоих фрагментов eEF1A2, использованных для получения моноспецифичных антител, учитывали присутствие в них существенных различий в первичной структуре по сравнению с eEF1A1. Выбранные способы конъюгации с БСА обеспечивали удалённость различающихся а.о. от сайта конъюгации. Неудача в получении моноспецифичных для eEF1A2 антител против фрагмента 216-229, возможно, обусловлена различием в конформации данного участка в исходном белке и в составе конъюгата с БСА с экспонированием на поверхности молекулы конъюгата консервативных а.о. Об этом косвенно свидетельствует взаимодействие полученных против фрагмента 216-229 антител с обеими изоформами eEF1A. Напротив, фрагмент eEF1A2 330-343 в составе конъюгата с БСА, по-видимому, имел конформацию, близкую к таковой в молекуле белка, с доступными для взаимодействия с антителами а.о., различными в изоформах 1 и 2 eEF1A. Наличие а.о. в позиции 331, различающегося в первичных структурах eEF1A2 человека/кролика и мыши, также могло способствовать развитию эффективного иммунного ответа у мышей на этот фрагмент eEF1A2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, фрагмент 330-343 изоформы eEF1A2, имеющий 4 различия в позициях а.о. в первичной структуре по сравнению с таким же фрагментом изоформы eEF1A1, может служить гаптеном для получения антител, селективно распознающих eEF1A2. Полученный против конъюгата этого фрагмента с БСА препарат антител пригоден для селективного выявления изоформы eEF1A2 методом ИФСА и иммуноблоттинга, причём в последнем случае – в составе сложной смеси белков. Данные моноспецифичные антитела могут быть в дальнейшем использованы для селективного выявления изоформы eEF1A2 человека в образцах тканей опухолей.

Авторы выражают благодарность ст.н.с. ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского к.х.н. А.А. Мишину за помощь в подготовке рисунков и в.н.с. ФГБУ “ИБМХ” РАМН к.б.н. А.Ю. Лупатову за плодотворное обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Negrutskii B.S., El'skaya A.V.* (1998) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **60**, 47-78.
2. *Negrutskii B.S., Stapulionis R., Deutscher M.P.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 964-968.
3. *Petrushenko Z.M., Budkevich T.V., Shalak V.F., Negrutskii B.S., El'skaya A.V.* (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4811-4818.
4. *Doyle A., Crosby S.R., Burton D.R., Lilley F., Murphy M.F.* (2011) *J. Struct. Biol.*, **176**, 370-378.
5. *Gillardon F.* (2009) *Neuroscience*, **163**, 533-539.
6. *Kanibolotsky D.S., Novosyl'na O.V., Abbott C.M., Negrutskii B.S., El'skaya A.V.* (2008) *BMC Struct. Biol.*, **8**, 4.
7. *Mateyak M.K., Kinzy T.G.* (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 21209-21213.
8. *Lukash T.O., Turkivska H.V., Negrutskii B.S., El'skaya A.V.* (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 1341-1347.
9. *Kahns S., Lund A., Kristensen P., Knudsen C.R., Clark B.F., Cavallius J., Merrick W.C.* (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1884-1890.

10. *Khalyfa A., Carlson B.M., Dedkov E.I., Wang E.* (2003) *Restor. Neurol. Neurosci.* **21**, 47-53.
11. *Abbott C.M., Newbery H.J., Squires C.E., Brownstein D., Griffiths L.A., Soares D.C.* (2009) *Biochem. Soc. Transact.*, **37**, 1293-1297.
12. *Cao H., Zhu Q., Huang J., Li B., Zhang S., Yao W., Zhang Y.* (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **380**, 11-16.
13. *Tomlinson V.A., Newbery H.J., Wray N.R., Jackson J., Larionov A., Miller W.R., Dixon J.M., Abbott C.M.* (2005) *BMC Cancer* **5**, 113.
14. *Li Z., Qi C.F., Shin D.M., Zingone A., Newbery H.J., Kovalchuk A.L., Abbott C.M., Morse H.C.* 3rd. (2010) *PLoS One*, **5**(5), e10755.
15. *Anand N., Murthy S., Amann G., Wernick M., Porter L.A., Cukier I.H., Collins C., Gray J.W., Diebold J., Demetrick D.J., Lee J.M.* (2002) *Nat. Genet.*, **31**, 301-305.
16. *Newbery H.J., Loh D.H., O'Donoghue J.E., Tomlinson V.A.L., Chau Y-Y., Boyd J.A., Bergmann J.H., Braunstein D., Abbott C.M.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 28951-28959.
17. *Thompson J.D., Higgins D.G.* (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
18. *Алешина Е.Ю., Пындык Н.В., Мойса А.А., Санжаков М.А., Харыбин О.Н., Николаев Е.Н., Колесанова Е.Ф.* (2008). *Биомед. химия*, **54**(2), 154-166.
19. *El-Faham A., Albericio F.* (2010) *J. Peptide Sci.*, **16**, 6-9.
20. *Van Regenmortel M.H., Muller S.* (1999) *Synthetic peptides as antigens.* Amsterdam: Elsevier.
21. *Шалак В.Ф., Будкевич Т.В., Негруцкий Б.С., Ельская А.В.* (1997) *Укр. биохим. ж.*, **69**, 104-109.
22. *Yaremchuk A., Shalak V.F., Novosylna O.V., Negrutskii B.S., Crepin T., El'skaya A.V., Tukalo M.* (2012) *Acta Crystallogr. Section F*, **68**, 295-297.
23. *Кузьмина Т.И., Оленина Л.В., Санжаков М.А., Фарафонова Т.Е., Абрамихина Т.В., Дюбюиссон Ж., Соболев Б.Н., Колесанова Е.Ф.* (2009) *Биомед. химия*, **55**, 32-40.
24. *Laemmli U.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
25. *Veremieva M., Khoruzhenko A., Zaicev S., Negrutskii B., El'skaya A.* (2011) *Eur. J. Clin. Invest.*, **41**, 269-276.

Поступила: 10. 10. 2012.

PREPARATION OF MONOSPECIFIC ANTIBODIES AGAINST ISOFORM 2
OF TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1A (eEF1A2)

*E.F. Kolesanova¹, T.E. Farafonova¹, E.Yu. Aleshina¹, N.V. Pyndyk¹, M.V. Veremieva²,
O.V. Novosylina², M.I. Kovalenko², V.F. Shalak², B.S. Negrutskii²*

¹Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya ul., 10, Moscow 119121, Russia

²State Key Laboratory of Molecular and Cell Biology, Institute of Molecular Biology and
Genetics of the National Academy of Sciences, Kiev, Ukraine, Acad. Zabolotnogo ul., 150,
Kiev, 03143 Ukraine

Amino acid sequences of eukaryotic translation elongation factor isoform 1 (eEF1A1) and 2 (eEF1A2) were compared and two peptide fragments of eEF1A2 were chosen as linear antigenic determinants for generation of monospecific anti-peptide antibodies. Selected peptides were synthesized, conjugated to bovine serum albumin (BSA) and used for mice immunizations. Antibodies, produced against the eEF1A2 fragment 330-343 conjugated to BSA, specifically recognized this isoform in the native and partially denatured states but did not interact with the eEF1A1 isoform. It was shown that these monospecific anti-eEF1A2 antibodies could be employed for eEF1A2 detection both by enzyme-linked immunosorbent assay and by immunoblotting.

Key words: translation elongation factor 1A, anti-peptide antibodies, peptide synthesis, enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting.