

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1990

Volume 36 issue 2

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

И. П. Гонтарь, Г. Ф. Сычева, О. И. Емельянова

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ГРАНУЛИРОВАННОГО Г-АКТИНА С МАГНИТНЫМИ СВОЙСТВАМИ В КЛИНИКЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Филиал Института ревматологии АМН СССР, Волгоград

Актин — один из основных сократительных белков — выделен из мышечной и немышечных тканей. Количество его варьирует от 13—15 % в мышцах до 5—15 % от общего количества белка в немышечных тканях. В клетках он присутствует в виде мономера (Г-актин) и полимера (Ф-актин) [9].

Интерес к актину связан с его участием не только в процессах сокращения и поддержания цитоскелета, но и с его ролью в регуляции обменных процессов в клетках как белка-координатора [1]. По мнению А. А. Давыдова [2], актин выступает в качестве аутоантигена при некоторых ревматических заболеваниях. Учитывая его универсальность, распространенность и роль в регуляции обменных процессов в клетке, необходимо контролировать уровень антител к актину, особенно у больных с аутоиммунными нарушениями.

В настоящее время все большее использование в биохимии, иммунологии находят препараты иммобилизованных биополимеров. Иммобилизация позволяет создать стабильные формы, устойчивые к физико-химическим воздействиям, имеющие длительный срок хранения, регенерация которых предоставляет возможность их неоднократного применения. Создание гранулированных препаратов с магнитными свойствами упрощает постановку реакций и является основанием для создания автоматизированных систем диагностики [8].

В связи с этим целью нашей работы было создание иммобилизованного гранулированного препарата Г-актина с магнитными свойствами и изучение возможных областей его применения.

Задачи настоящего исследования: получение очищенного нативного Г-актина с последующей его иммобилизацией; использование такой формы антигена при иммунизации животных и получении чистых антител; оценка возможности использования иммобилизованного Г-актина для контроля за уровнем специфических иммуноглобулинов в сыворотках экспериментальных животных и больных ревматизмом.

Методика

Актин выделяли по Штраубу из сердечной и скелетной мышц трупа практически здорового человека, погибшего в результате несчастного случая, не позднее 8—10 ч после смерти. Очистку актина проводили реакцией полимеризации — деполимеризации в растворах с разной ионной силой. Принцип очистки заключался в том, что инактивированный актин, не способный к полимеризации, и примесные белки, отличающиеся по константе седиментации, при ультрацентрифугировании (100 000—140 000 g) остаются в надосадочной жидкости, в то время как нативный актин — в осадке. Полимеризацию проводили в 0,02 М KCl, деполимеризация происходила при полном удалении KCl диализом [4]. Цикл повторяли дважды. Концентрацию белка в препаратах определяли по методу Лоури [3]. Контроль чистоты препаратов актина проводили методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [10].

Препараты актина концентрировали при помощи ультра-

фльтрационной системы «Sartorius» до оптимальной концентрации. Очищенный и сконцентрированный Г-актин включали в пространственную решетку полиакриламидного геля методом эмульсионного гранулирования [5].

Иммобилизованный гранулированный Г-актин с магнитными свойствами получали в потоке газообразного азота под давлением 3 атм с включением гидрофильных частиц Fe_2O_3 , размеры кристаллов 0,5—5 мкм. Гранулы отмывали от катализатора, инициатора полимеризации и эмульгатора охлажденным ацетоном и трижды забуференным физиологическим раствором с 0,05 % твина-20. Для снятия неспецифической сорбции гранулы обрабатывали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина.

Активные антисыворотки получали иммунизацией кроликов породы шиншилла массой 2,5—3,0 кг иммобилизованным препаратом Г-актина подкожно по 0,2 мл препарата. Иммунизация состояла из 4 введений с интервалом 4 дня, через 2 нед цикл повторяли. Суммарно за период иммунизации вводили 7 мг Г-актина.

Реакцию преципитации проводили по Оухтерлони в модификации А. И. Гусева и В. С. Цветкова [6].

Выделение чистых антиактиновых антител из иммунных сывороток осуществляли иммуносорбционным методом с использованием в качестве специфического носителя иммобилизованного гранулированного Г-актина. Уровень специфических антител в сыворотках больных ревматизмом и экспериментальных животных определяли методом непрямой иммунофлуоресценции с коммерческими люминесцирующими препаратами против глобулинов человека и кролика производства ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи с рабочим титром 1:16—1:32, серии № 256 и 777 [7].

Результаты и обсуждение

Препараты выделенного актина при электрофорезе были представлены 4—5 зонами миграции с относительными мол. массами 24—120 кД, основная зона миграции 42 кД. Концентрация белка в препаратах актина штраубовского типа составляла 4—7 мг/мл. После 2 циклов полимеризации — деполимеризации выход очищенного актина уменьшался в 2—3 раза, его электрофореграмма показала наличие одной гомогенной фракции с относительной мол. массой 42 кД. Очистка актина путем обратимой полимеризации — деполимеризации позволяет получить Г-актин высокой чистоты (см. рисунок на вклейке).

Для получения функционально активного иммобилизованного препарата Г-актина необходима оптимальная концентрация белка 5—7 мг/мл. Это достигалось использованием полупроницаемых фильтров (SM-132) с созданием вакуумного разрежения.

В результате эмульсионной полимеризации был получен иммобилизованный препарат правильной сферической формы с размерами гранул 10—100 мкм, который был использован для иммунизации животных. Ранее ее проводили с адьювантом Фрейнда. Применение иммобилизованного Г-актина для этой цели позволило отказаться от использования коммерческого адьюванта, поскольку ПААГ обладал подобным свойством.

Преципитационный титр кроличьих иммунных сывороток был в пределах 1:8—1:16.

Этим же препаратом заполняли хроматографическую колонку размером 15×65 мм. Через антигенный сорбент пропускали 2,0 мл иммунной кроличьей сыворотки, с помощью перистальтического насоса рециркулировали ее через носитель в течение 2 ч при скорости элюции 30 мл/ч. Диссоциацию комплекса антиген — антитело проводили 3 М раствором роданида калия. Полученный препарат концентрировали до исходного объема и проводили диализ до полного удаления ионов роданида. Их наличие проверяли качественной реакцией с раствором хлорного железа. После сорбции в сы-

К ст. И. П. Гонтарь и соавт.



Электрофореграммы актина сердечной мышцы человека.

a — актин, выделенный по Штраубу; *b* — актин после очистки обратимой полимеризацией — деполимеризацией. Количество белка 100 мкг на гель. Окраска амидо черным 10 Б.

a *b*

К ст К. А. Бакунец и соавт.

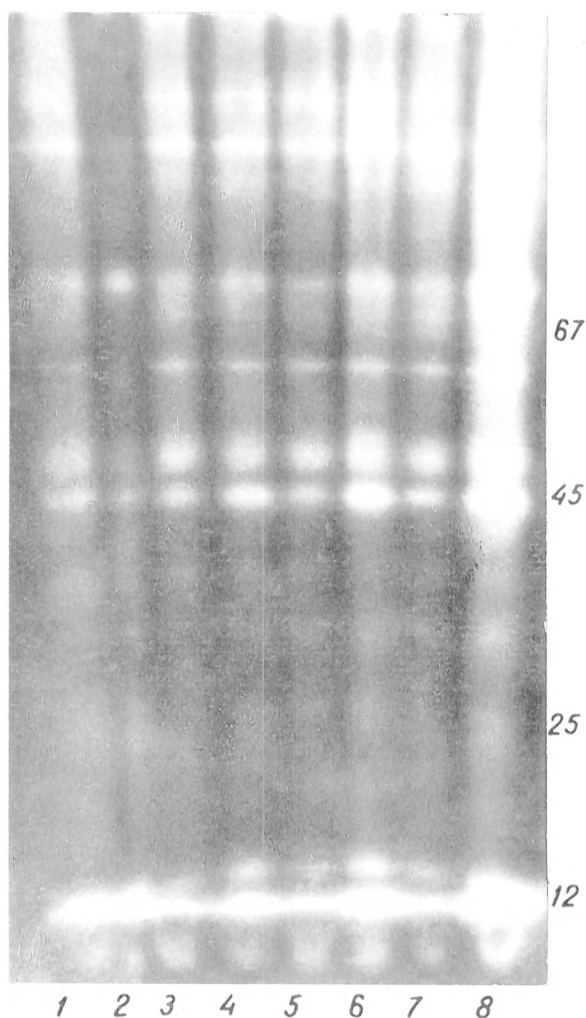


Рис. 2. Кинетика эндогенного фосфорилирования белков мембранной фракции в присутствии и в отсутствие деРНК. Авторадиография электрофореграмм 10 % ПАГ. 1, 3, 5, 7 — в отсутствие деРНК, 2, 4, 6, 8 — в присутствии деРНК; инкубация 5, 10, 20, 30 мин соответственно.

воротке отсутствовали специфические антиактивные антитела. Преципитационный титр выделенных чистых иммуноглобулинов был 1:8—1:16. При этом 1 г сорбента адсорбировал 2 мг специфических антител, которые могут быть использованы для получения специфических диагностических препаратов, а также иммуносорбентов для получения методом аффинной хроматографии Г-актина.

10 % взвесь гранул использовали в непрямом иммунофлюоресцентном методе. Выявление уровня специфической флюоресценции осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа, снабженного фотометрической приставкой ФМЭЛ-1А. К насадке подключали источник тока УПБВ-1, цифровой вольтметр Ш-4300. Работу проводили при напряжении 1800 В, использовали светофильтры возбуждающего света СЗС 24-4, СС 15-4, интерференционный светофильтр фотометрической насадки ($\lambda_{\text{мкс}} = 525 \text{ нм}$). Увеличение объектива 90, окуляра — 5.

Предметное стекло с фиксированными на нем гранулами устанавливали на столике микроскопа и находили их в поле зрения объектива. Выбранный зонд (0,5) фотометрической насадки совмещали с фотометрируемым участком гранулы и при максимально закрытой полевой диафрагме снимали цифровое значение люминесценции гранул на вольтметре. Высчитывали среднее значение свечения 6 гранул, а также среднее значение флюоресценции фона. Разница свечения гранул и фона выражается в относительных единицах флюоресценции (в МВ) и характеризует свечение препарата.

Положительной считают люминесценцию гранул, достоверно отличающуюся от интенсивности специфической флюоресценции контрольных препаратов. Достоверность различия определяли по критерию Стьюдента с вероятностью 0,95.

Специфическое свечение гранул, содержащих Г-актин, совмещенных с нормальной кроличьей сывороткой, составляло 5 МВ, при совмещении гранул с антиактивной иммунной сывороткой флюоресценция была равна 42 МВ.

В нашей работе было также определено наличие антител к иммобилизованному гранулированному Г-актину с магнитными свойствами в сыворотках здоровых лиц и больных ревматизмом с минимальной степенью активности ревматического процесса (см. таблицу).

Как видно из таблицы, интенсивность специфической флюоресценции гранул с Г-актином при совмещении их с сыворотками больных ревматизмом с минимальной степенью активности ревматического процесса статистически достоверно отличается от люминесценции гранул, обработанных сыворотками лиц контрольной группы ($p < 0,01$).

Таким образом, методом эмульсионной полимеризации удалось получить иммобилизованный гранулированный Г-актин с магнитными свой-

вами, который может быть применен для получения специфических иммунных кроличьих антисывороток, проведения иммуносорбционного выделения чистых антител, определения уровня специфических антител иммунофлюоресцентным методом в сыворотках как экспериментальных животных, так и больных ревматическими заболеваниями и здоровых лиц. Такие препараты могут быть использованы в иммуноферментном и радиоиммунном методах исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быкова О. И., Алексеев В. В., Голосеев Ю. А. // Лаб. дело. — 1984. — № 9. — С. 562—564.
2. Гусев А. И., Цветков В. С. // Там же. — 1961. — № 2. — С. 43—45.
3. Давыдов А. А. Клинико-диагностическое значение иммунологических реакций к миофибрилярным белкам миокарда при ревматизме: Дис. ... д-ра мед. наук. — Волгоград, 1983.
4. Поглазов Б. Ф. // Изв. АН СССР. — 1983. — № 5. — С. 667—677.
5. Пушкарь В. Г., Ефременко В. И., Климов И. М. и др. // Журн. микробиол. — 1985. — № 12. — С. 30—35.
6. Скоупс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ. — М., 1985.
7. Хайтлина С. Ю. // Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков / Под ред. Г. Р. Иванникова. — Л., 1978. — С. 122—141.
8. Avrameas S., Guesdon J. Pat. 4241176, USA, 1980.
9. Groshel-Stewart U. // Int. Rev. Cytol. — 1980. — Vol. 65. — P. 193—195.
10. Ultrogel, Nagnogel, and Triacril. Practical Guide for Use in Affinity Chromatography and Related Techniques. — 1983.
11. Weber K., Osborn M. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244, N 6. — P. 4406—4412.

Поступила 13.06.89

USE OF G-ACTIN IMMOBILIZED IN GRANULES EXHIBITING MAGNETIC PROPERTIES IN CLINICS AND EXPERIMENTS

I. P. Gontar, G. F. Sycheva, O. I. Emel'yanova

Branch of the Institute of Rheumatology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Volgograd.

G-actin was isolated from human myocardium, purified by means of repeated polymerization-depolymerization and immobilized in polyacrylamide gel by the procedure of "emulsion granulation". The granules acquired magnetic properties after addition of iron protoxide hydrophilic particles into the polymerizing mixture. Immobilized G-actin in granules with magnetic properties was used for production of specific antisera, for isolation of pure antibodies by means of an immunosorption procedure, for estimation of specific antibodies in blood sera of patients with rheumatism, of healthy persons and of experimental animals using immunofluorescent, immunoenzymatic and radioimmune procedures.

Антиактивные антитела у больных ревматизмом и здоровых лиц

Обследованные	Число опытов	Интенсивность флюоресценции, МВ ($M \pm m$)	% положительных результатов
Здоровые лица	10	$8,5 \pm 0,49$	0
Больные ревматизмом	32	$15,78 \pm 1,38$	40,6