

©Коллектив авторов

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫХ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА

К.В. Барина^{1,3}, А.К. Мельникова², Е.В. Шмальгаузен¹, В.И. Муронец^{1,2}*

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.40; эл. почта: vimuronets@belozersky.msu.ru

²Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

³Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва

Предложена совокупность приемов для быстрого и простого получения поликлональных антител к целевому антигену – альфа-синуклеину. Для очистки специфических поликлональных антител кролика против рекомбинантного альфа-синуклеина человека, наработанных в результате подкожной иммунизации с полным адьювантом Фрейнда, были использованы два метода. Показано, что очистка на CNBr-активированной сефарозе с иммобилизованным альфа-синуклеином приводит к получению препарата антител, содержащего в качестве примеси обогащенный гистидиновыми остатками гликопротеин крови кролика (histidine-rich glycoprotein). Двухстадийная очистка специфических антител на сефарозе с иммобилизованным белком G, а затем на колонке с иммобилизованным альфа-синуклеином позволяет избавиться от примесного белка и получить гомогенный препарат антител. Полученные антитела узнают различные конформации альфа-синуклеина и могут быть использованы для всех видов иммунного анализа, включая иммуноцитохимический.

Ключевые слова: поликлональные антитела; альфа-синуклеин; адьювант; иммунизация

DOI: 10.18097/PBMC20186403276

ВВЕДЕНИЕ

Использование коммерчески доступных поликлональных и моноклональных антител облегчает проведение экспериментальных исследований, но имеет определенные ограничения. Основное ограничение заключается в том, что, как для иммунизации животных, так и для последующей иммуноаффинной очистки антител, как правило, используют не полноразмерные белки-антигены, а синтетические пептиды, гомологичные определенным участкам аминокислотной последовательности целевого белка. Особенно часто такие пептиды используют при индивидуальном заказе антител к определенному белку. С одной стороны, для таких антител заранее известно, с какими эпитопами белка-антигена они будут взаимодействовать. Но с другой стороны, часто именно этот тип антител даёт перекрёстную реакцию с белками, обладающими сходными эпитопами, а также не позволяет отличить друг от друга изоформы исследуемого белка. Например, поликлональные антитела к альфа-синуклеину фирмы “Cell Signaling Technology” (США) получают путём иммунизации животных синтетическим пептидом, соответствующим С-концевому фрагменту альфа-синуклеина человека, затем проводят двухступенчатую очистку сначала на иммобилизованном белке А, а потом на иммобилизованном пептиде. Однако даже после такой очистки антитела, во-первых, дают перекрёстную реакцию с альфа- и бета-изоформами альфа-синуклеина, и, во-вторых, выявляют в экстрактах тканей не только альфа-синуклеин, но и ещё неизвестный белок с молекулярной

массой около 28 кДа (<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/a-synuclein-antibody/2642>). Естественно, такие антитела при проведении иммуноцитохимического окрашивания и в других экспериментах будут давать неверные результаты, хотя производители предлагают использовать их именно для этих целей [1-3]. Моноклональные антитела, полученные путём иммунизации животных синтетическими фрагментами альфа-синуклеина, также не обладают высокой специфичностью. Из 4-х типов коммерчески доступных антител к альфа-синуклеину только моноклональные антитела, полученные иммунизацией животных рекомбинантным полноразмерным альфа-синуклеином человека, обладают способностью отличать альфа- и бета-формы альфа-синуклеина [4]. Именно по этим причинам для наиболее популярных у исследователей белков предлагается целый спектр различных типов антител, как моно-, так и поликлональных, которые отличаются по методам иммунизации и способам очистки и, естественно, по цене. Однако даже в этом случае из-за неполноты или искажения информации, предоставляемой фирмой-производителем, возможна неправильная интерпретация результатов. К сожалению, при индивидуальном заказе антител используются самые простые способы их получения с применением пептидных фрагментов, что и приводит к появлению множества артефактов при их использовании. Кроме того, при индивидуальном заказе время его выполнения составляет не менее месяца без учёта сроков доставки, что сравнимо с доступным практически в любой лаборатории получением поликлональных антител к нужному

белку с использованием полноразмерных белков как для иммунизации, так и для иммуноаффинной хроматографии. Следует также отметить, что для иммунизации животных предпочтительно использовать ненативные формы белков, поскольку в противном случае можно получить антитела, не пригодные для проведения иммуноблоттинга [5]. Это обстоятельство существенно упрощает работу с рекомбинантными белками, поскольку нет необходимости выделять их в нативной конформации.

Описанные в данной статье приёмы позволяют достаточно быстро получить необходимое количество антител к целевому белку (в данном случае – к альфа-синуклеину), обладающих высокой специфичностью, свободных от примесных белков и пригодных для всех видов иммунного анализа, включая иммуноцитохимический.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: козлиные антитела против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (“Имтек”, Россия); диаминобензидина гидрохлорид, глицин, Tween 20, *o*-фенилендиамин, сефароза 4В, сефароза с иммобилизованным белком G, CNBr, NaCl, дигидрофосфат калия, полный адъювант Фрейнда (“Sigma”, США); сульфат никеля (II) гексагидрат (“Aldrich”, США); Tris (трис(гидроксиэтил)аминометана), додецилсульфат натрия и фосфатно-солевой буфер в таблетках (“Amresco”, США). В качестве компонентов клеточной среды использовали DMEM без глутамина с глюкозой 4,5 г/л (“ПанЭко”, Россия), эмбриональную бычью сыворотку (“HyClone”, США), GlutaMAX (“Thermo Fisher”, США)

Выделение рекомбинантного альфа-синуклеина человека

Рекомбинантный альфа-синуклеин человека с гистиридиновым тэгом и без него выделяли из бактериальных клеток *E. coli* штамма BL21(DE3) за счёт кислотного осаждения примесных белков с последующим высаливанием сухим сульфатом аммония. На завершающей стадии препарат альфа-синуклеина очищали на колонке с тиол-сефарозой, как описано в работе [6]. Вкратце, pH исходного клеточного экстракта доводили до 2,8 добавлением 9% HCl, от белковых агрегатов избавлялись с помощью центрифугирования (15000 g, 5 мин, 4°C). Далее pH супернатанта быстро доводили до 7,5 добавлением 1 М раствора калий-фосфата, pH 11. Полученный препарат альфа-синуклеина высаливали сухим сульфатом аммония до 40%-го насыщения. Примесь мутантного альфа-синуклеина с заменой тирозинового остатка на цистеиновый в 136 позиции удаляли на колонке с тиол-сефарозой [6].

Иммунизация кролика

Для иммунизации предварительно обессоленный диализом раствор чистого препарата альфа-синуклеина

с гистиридиновым тэгом (0,9 мг в 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ: 10 mM дигидрофосфат калия, 127 mM NaCl, 2,7 mM KCl pH 7,4)) смешивали с 1 мл полного адъюванта Фрейнда. Полученную эмульсию вводили кролику подкожно по 0,2 мл в 8 точек вдоль позвоночника. Через 3 недели после иммунизации у кролика отбирали 10 мл крови из краевой вены уха. После отделения форменных элементов крови пробу центрифугировали в течение 15 мин при 1500 g, после чего супернатант, содержащий поликлональные антитела, высаливали сухим сульфатом аммония до 60%-ного насыщения и оставляли суспензию при 4°C. Все эксперименты проводились с обязательным соблюдением правил “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях”, Strasbourg (1986).

Очистка антисыворотки против альфа-синуклеина на активированной CNBr-сефарозе

На первом этапе получали иммуносорбент с ковалентно пришитым альфа-синуклеином без гистиринового тэга. Активацию сефарозы 4В и иммобилизацию альфа-синуклеина проводили, как описано в [7]. Степень активации носителя составила 3%, а на 1 мл активированной сефарозы было иммобилизовано 0,4 мг белка.

На втором этапе с помощью полученного носителя из антисыворотки были очищены поликлональные антитела к альфа-синуклеину. Для этого предварительно обессоленную диализом сыворотку (1 мг/мл) в 10 mM калий-фосфатном буфере, pH 7,0 наносили на колонку (0,9×2 см), уравновешенную этим же буфером. Для повышения эффективности очистки фракцию, не связавшуюся с носителем, наносили на колонку повторно. После промывания колонки указанным буфером связавшиеся с носителем поликлональные антитела элюировали буфером, содержащим 50 mM глицин и 0,15 M NaCl, pH 2,0, после чего pH элюата быстро доводили до нейтральных значений добавлением сухого Tris. Концентрацию антител определяли спектрофотометрически при 280 нм ($A_{280}^{0,1\%} = 1,5$). Фракции, содержавшие антитела, объединяли и концентрировали на микроцентрифужных фильтрах Ultracel YM-10 (“Millipore”, США) до концентрации 1 мг/мл. Фракции хранили при 4°C после добавления азид натрия до конечной концентрации 0,01%. Специфичность полученных поликлональных антител проверяли с помощью точечного и стандартного иммуноблоттинга.

Очистка антисыворотки против альфа-синуклеина на колонке с белком G, а затем на колонке с активированной CNBr-сефарозой

На колонку с белком G (0,9×1,5 см), предварительно уравновешенную 10 mM калий-фосфатным буфером, pH 7,0, наносили обессоленную диализом антисыворотку в этом же буфере в концентрации 1 мг/мл (суммарное количество белка составило 20 мг). После промывания колонки указанным буфером связавшуюся фракцию иммуноглобулинов элюировали

50 мМ глицином, рН 2,7, после чего быстро доводили рН элюата до 7–7,5 добавлением сухого Tris. Фракцию иммуноглобулинов, очищенную на сефарозе с белком G (суммарно 9 мг белка), разбавляли до 1 мг/мл 10 мМ калий-фосфатным буфером, рН 7,0 и наносили на колонку с активированной CNBr-сефарозой (0,9×2 см) с иммобилизованным альфа-синуклеином без гистидинового тэга, предварительно уравновешенную этим же буфером. Для повышения эффективности связывания фракцию, не связавшуюся с носителем, наносили на колонку повторно. Связавшиеся с альфа-синуклеином антитела элюировали буфером, содержащим 50 мМ глицин, 0,15 М NaCl, рН 2,0, доводили рН до нейтральных значений добавлением 1 М калий-фосфатного буфера, рН 11. Антитела концентрировали на микроцентрифужных фильтрах Ultracel YM-10 (“Millipore”) до 1 мг/мл и хранили при 4°C после добавления азида натрия до конечной концентрации 0,01%. Специфичность очищенных поликлональных антител проверяли с помощью точечного и стандартного иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг

После ДСН-электрофореза по методу Лэммли [8] в 16% разделяющем геле белки с геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Sigma”) в буфере для переноса (25 мМ Tris-HCl, 192 мМ глицин, 20%-ный этанол, рН 8,3) (100 мА, 50 мин). После переноса мембрану блокировали 5%-ным раствором сухого обезжиренного молока в ФСБ, содержащим 0,05% Tween-20 (ФСБТ) (10 мМ КН₂РО₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,05% Tween-20) в течение 30 мин при постоянном перемешивании. После блокировки и удаления избытка молока мембрану помещали в раствор первичных антител (1 мкг/мл) в ФСБТ с 1%-ным молоком на 1 ч при 20°C и постоянном перемешивании. Тщательно отмыв мембрану от первичных антител, её помещали в раствор вторичных антител (1 мкг/мл), конъюгированных с пероксидазой хрена, в ФСБТ с 1%-ным молоком. Инкубацию осуществляли при 20°C и постоянном перемешивании в течение 1 ч. После инкубации со вторичными антителами мембрану промывали ФСБТ и проявляли в растворе, содержащем 3 мг гидрохлорида диаминобензидина, 30 мг хлорида никеля и 10 мкл 30%-ной перекиси водорода в 10 мл 0,1 М Tris-HCl, рН 7,6.

Точечный иммуноблоттинг

Тестируемые антигены в количестве 1 мкг наносили на нитроцеллюлозную мембрану и высушивали. Затем мембрану обрабатывали антителами аналогично процедуре, описанной в разделе “иммуноблоттинг”.

Иммуноцитохимия

Клетки нейроblastомы человека линии SHSY-5Y пассаживали в 24-луночные планшеты (“Eppendorf”, Германия) в количестве 15×10⁴ клеток/луночка на стерилизованные покровные стёкла диаметром 12 мм, в среде без антибиотиков (DMEM с содержанием

10% эмбриональной бычьей сыворотки (по объёму) (“HyClone”) и разведённым в 100 раз GlutaMAX (“Invitrogen”, США)). На следующий день после прикрепления клеток к покровному стеклу клетки нейроblastомы трансфицировали вектором pVax, содержащим ген альфа-синуклеина дикого типа, с использованием липофектамина 2000 (“Invitrogen”), в соответствии с инструкциями производителя. Ген альфа-синуклеина амплифицировали из плазмиды pET33b(+), получение которой описано в [6], после чего ген вставляли в плазмиду pVax (“Thermo Fisher”). Наличие вставки было подтверждено с помощью секвенирования. Для контроля успешного прохождения трансфекции параллельно с трансфекцией вектором, содержащим ген альфа-синуклеина, проводили трансфекцию вектором, содержащим ген EGFP. Наличие трансфекции проверяли при помощи исследования клеток под флуоресцентным микроскопом. Кроме того, трансфицированные культуры также были окрашены коммерчески доступными моноклональными антителами к альфа-синуклеину (#2644, “Cell Signaling Technology”) в качестве контроля. Эффективность трансфекции составила 25% (% клеток, окрашенных антителами к альфа-синуклеину от общего числа клеток, подсчитанного по количеству ядер, окрашенных DAPI).

Через 3 дня после трансфекции клетки промывали ледяным ФСБ, фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (масса/объём) на ФСБ, рН 7,4, в течение 20 мин и пермеабелизировали добавлением 0,25%-ного раствора Triton X-100 (по объёму) в ФСБ в течение 10 мин. Затем покровные стекла обрабатывали блокирующим раствором (1%-ный БСА (масса/объём) в ФСБ) в течение 30 мин. После этого стёкла с клетками инкубировали с первичными поликлональными антителами против альфа-синуклеина, полученными в лаборатории, в концентрации 45 мкг/мл в блокирующем буфере при 25°C в течение 1 ч. Клетки трижды промывали ФСБ, после чего пробы инкубировали с вторичными антителами в блокирующем буфере (Alexa 488-конъюгированные антикроличьи антитела, разведение 1: 1000, “Abcam”, США) в течение 1 ч при 25°C. Ядра контр-окрашивали DAPI (“Sigma”) (1 мкг/мл, 10 мин). Покровные стекла заключали в водорастворимую среду для заключения (“Sigma”), изучали и фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 M (“Carl Zeiss”, Германия), оснащённого иммерсионным объективом Plan-Apochromat 63x/1,40 и охлаждаемой CCD-камерой, ORCAII-ERG2 (“Hamamatsu Photonics”, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для иммунизации кролика мы использовали гомогенные препараты рекомбинантного альфа-синуклеина дикого типа, содержащего гистидиновый тэг. Одинаково успешно можно использовать рекомбинантный альфа-синуклеин, очищенный с помощью хроматографии на колонке с Ni-NTA-сефарозой за счёт присутствия гистидинового тэга или традиционными методами,

описанными нами ранее [6]. Иммунизацию кроликов проводили подкожно альфа-синуклеином с гистидиновым тэгом, смешанным с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1. Адьювант использовали не только для усиления иммунного ответа, но и для частичного разворачивания молекулы альфа-синуклеина с целью получения антител не только на поверхностные эпитопы, но и на экранированные участки полипептидной цепи.

Очистку антител из полученной через 3 недели после иммунизации антисыворотки проводили на колонке с сефарозой 4В, содержащей ковалентно иммобилизованный альфа-синуклеин. Связывание альфа-синуклеина с сефарозой проводили при "средней" степени активации носителя (30 мг бромциана на 1 г влажной сефарозы), что позволяет иммобилизовать значительное количество белка (0,35-0,45 мг на 1 мл носителя) без существенного изменения его конформации [9]. Результаты очистки антител приведены на рисунке 1. Как следует из приведенных данных, основным белком антисыворотки крови кролика является альбумин (дорожки 1 и 2), а фракция антител против альфа-синуклеина, полученных с помощью данного метода очистки, содержит два типа полипептидных цепей – с молекулярными массами 50 и 85 кДа (дорожка 3).

Присутствие в выделенной фракции специфических антител к альфа-синуклеину было доказано с помощью точечного (рис. 2) и стандартного

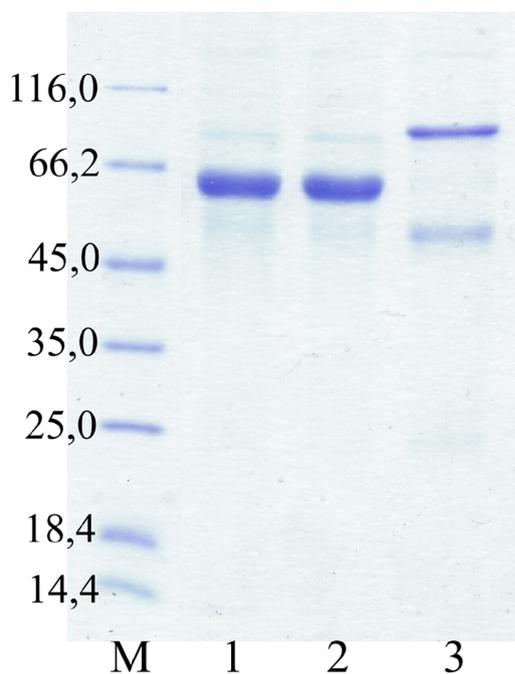


Рисунок 1. Анализ фракций, полученных в процессе очистки антител кролика против рекомбинантного альфа-синуклеина человека на CNBr-сефарозе с иммобилизованным альфа-синуклеином методом ДСН-электрофореза. М - белки-маркеры (116-14,4 кДа); 1 - антисыворотка до нанесения на колонку с альфа-синуклеином; 2 - фракция, не связавшаяся с носителем; 3 - фракция антител после элюции буфером с рН 2,0.

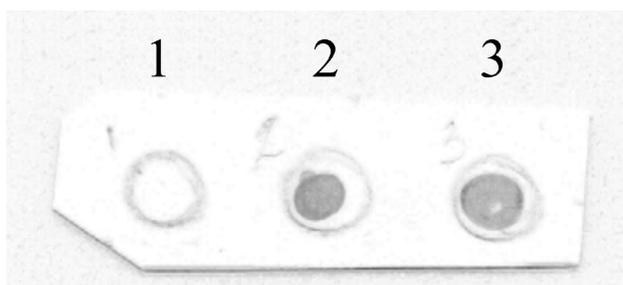


Рисунок 2. Точечный иммуноблоттинг антител против альфа-синуклеина. Окрашивание белков антителами, очищенными на CNBr-сефарозе с иммобилизованным альфа-синуклеином. 1 - раствор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (отрицательный контроль), 2 - альфа-синуклеин с гистидиновым тэгом, 3 - альфа-синуклеин без тэга. В каждой капле, нанесённой на мембрану, содержался 1 мкг исследуемого белка.

иммуноблоттинга (результаты не приведены). Следует отметить, что в полученном препарате антител методом электрофореза в денатурирующих условиях было выявлено присутствие только тяжелых цепей иммуноглобулинов класса G с молекулярной массой около 50 кДа. Отсутствие выраженной полосы, соответствующей лёгким цепям иммуноглобулинов класса G с молекулярной массой около 25 кДа, связано с тем, что для легких цепей поликлональных антител характерна значительная вариабельность, приводящая к диффузному распределению этих полипептидных цепей при электрофорезе [10]. Однако присутствие в препарате как тяжёлых, так и лёгких цепей иммуноглобулинов класса G, было подтверждено с помощью масс-спектрометрического анализа.

К сожалению, как можно увидеть на электрофореграмме (рис. 1, дорожка 3), помимо тяжёлой цепи специфических к альфа-синуклеину антител, обнаруживается ещё одна посторонняя полоса молекулярной массой примерно 85 кДа. Полоса была вырезана из геля и проанализирована масс-спектрометрически. Оказалось, что данная полоса соответствует обогащенному гистидиновыми остатками гликопротеину крови кролика (histidine-rich glycoprotein). Известно, что этот белок участвует в иммунном ответе и взаимодействует с различными участками антител [11, 12]. Следовательно, можно ожидать, что обогащённый гистидиновыми остатками гликопротеин может появляться в крови иммунизируемых животных и соочищаться с антителами при проведении иммуноаффинной хроматографии на иммобилизованных антигенах. Однако нельзя было исключить возможность взаимодействия гликопротеина непосредственно с альфа-синуклеином. Для разделения гликопротеина и антител сначала выделяли фракцию иммуноглобулинов на колонке с сефарозой, содержащей иммобилизованный белок G, а затем на сефарозе с иммобилизованным альфа-синуклеином из фракции иммуноглобулинов выделяли специфические к альфа-синуклеину антитела. Такая двойная очистка позволила получить антитела к альфа-синуклеину без каких-либо примесных белков. Возможность взаимодействия гликопротеина непосредственно

с альфа-синуклеином была проверена дополнительно. Для этого после отделения иммуноглобулинов фракцию сыворотки крови, содержащую гликопротеин, снова пропускали через носительс иммобилизованным альфа-синуклеином. В этом случае никакие белки, в том числе и исследуемый гликопротеин, не связывались с носителем (данные не приведены). Таким образом, было доказано, что гликопротеин, обогащённый гистидиновыми остатками, взаимодействует только с иммуноглобулинами, конкурируя при этом с белком G за связывание с антителами (рис. 3).

Специфичность очищенных антител проверяли с помощью стандартного иммуноблоттинга (рис. 4).

Антитела также были использованы для проведения иммуоцитохимического анализа клеток нейробластомы человека линии SHSY-5Y, трансфицированных вектором pVax, содержащим ген альфа-синуклеина дикого типа (рис. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Как следует из приведённых данных, с помощью полученных антител можно успешно идентифицировать клетки нейробластомы, в которых экспрессируется альфа-синуклеин.

Таким образом, использование совокупности описанных в нашей работе приёмов позволяет достаточно быстро и просто получить поликлональные антитела к целевому белку, пригодные для всех типов их применения –



Рисунок 4. Иммуноблоттинг с использованием очищенных антител против альфа-синуклеина. Окрашивание антителами, очищенными с помощью белка G и последующей очисткой на CNBr-сефарозе с иммобилизованным альфа-синуклеином. На каждую дорожку наносили 1 мкг белка. М - очищенный препарат альфа-синуклеина (окраска Ponceau S до добавления антител), 1 - клеточный экстракт, 2 - препарат рекомбинантного альфа-синуклеина дикого типа.

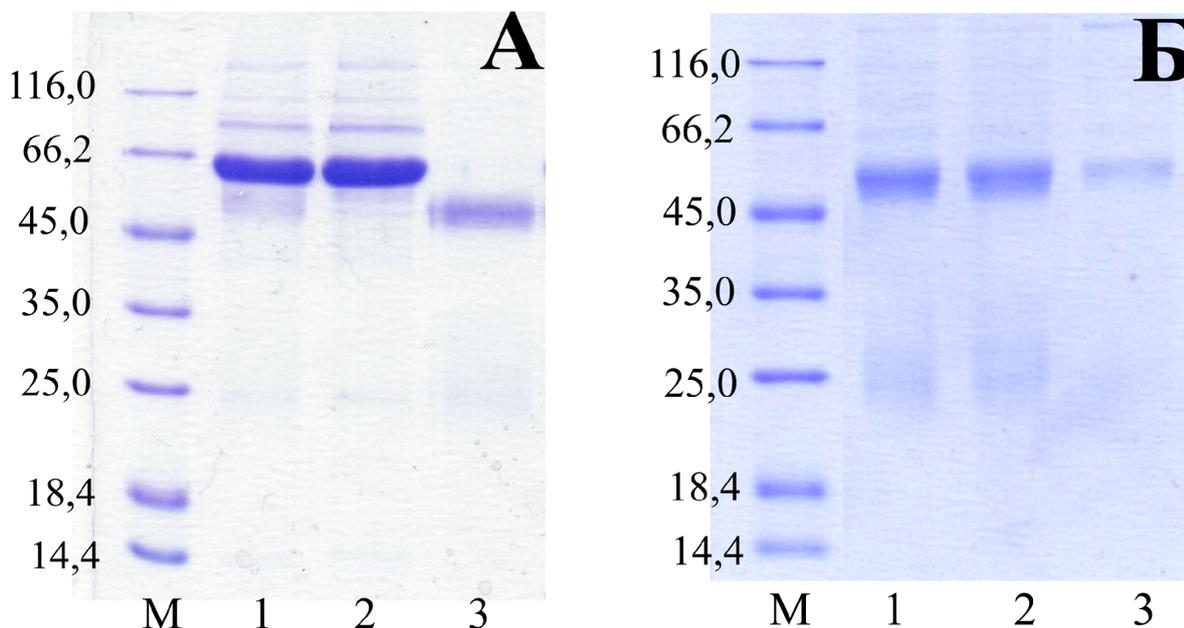


Рисунок 3. Анализ фракций, полученных в процессе очистки антител против альфа-синуклеина на сефарозе, связанной с белком G (А), а затем на CNBr-сефарозе с иммобилизованным альфа-синуклеином (Б). А) М - белки-маркеры (116-14,4 кДа); 1 - антисыворотка до нанесения на колонку с белком G; 2 - фракция, не связавшаяся с носителем; 3 - образец сефарозы 4В с иммобилизованным белком G и связавшимися иммуноглобулинами. Б) М - белки-маркеры (116-14,4 кДа); 1 - фракция после элюции иммуноглобулинов, связавшихся с белком G, буфером с pH 2,7; 2 - фракция, не связавшаяся с CNBr-сефарозой с иммобилизованным альфа-синуклеином; 3 - фракция после элюции антител, связавшихся с иммобилизованным альфа-синуклеином, буфером с pH 2,0.

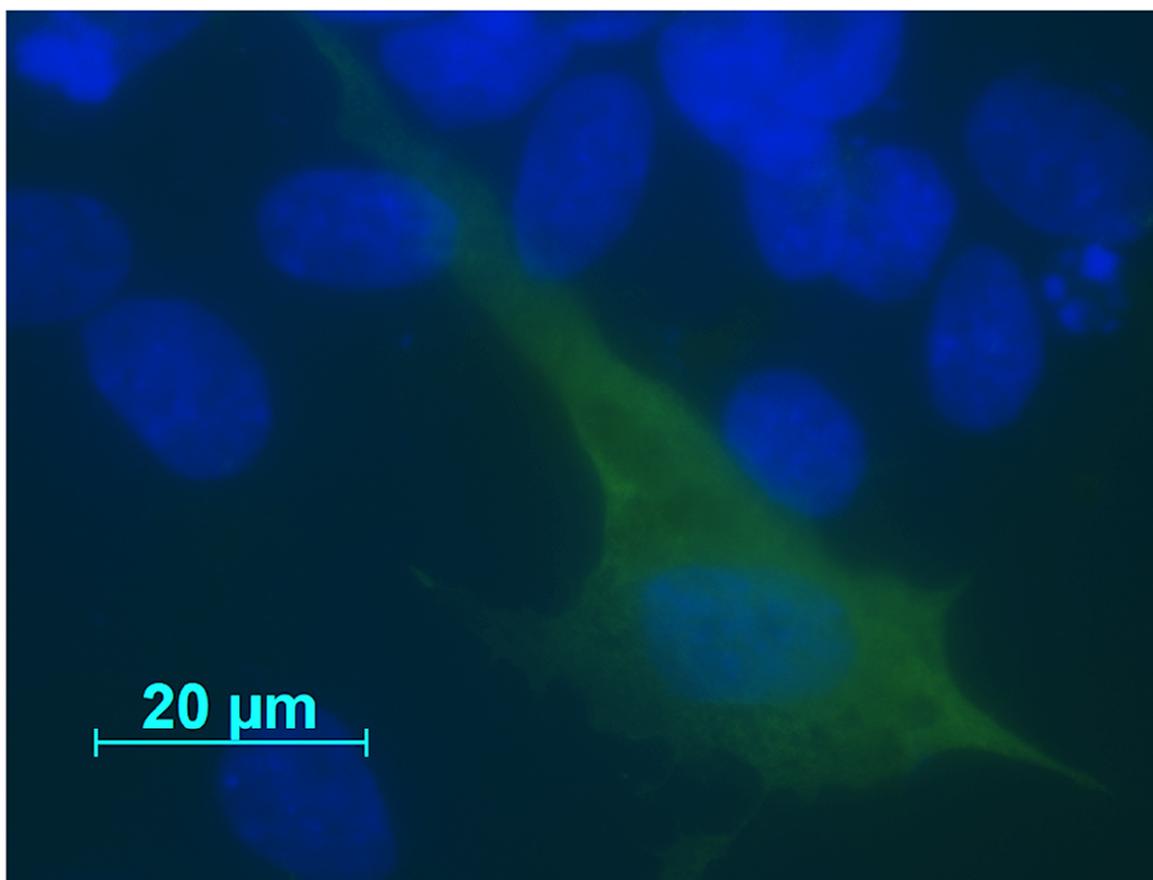


Рисунок 5. Иммуноцитохимический анализ клеток нейробластомы человека линии SHSY-5Y, экспрессирующих альфа-синуклеин. Для окрашивания использовали первичные поликлональные антитела кролика против альфа-синуклеина человека и вторичные антитела, конъюгированные с AlexaFluor488 (зелёное окрашивание). Ядра окрашены DAPI (синий).

от иммуноблоттинга до иммуноцитохимического анализа. При этом полученные антитела лишены ряда недостатков, прежде всего, наличия перекрёстных реакций с другими белками, характерных для коммерчески доступных антител.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была поддержана грантом РФФИ № 16-14-10027.

ЛИТЕРАТУРА

- Xiong Y., Neifert S., Karuppagounder S.S., Stankowski J.N., Lee B.D., Grima J.C., Chen G., Ko H.S., Lee Y., Swing D., Tessarollo L., Dawson T.M., Dawson V.L. (2017) *Eneuro*, **4**(2), ENEURO.0004-17.2017. DOI: 10.1523/ENEURO.0004-17.2017.
- Navarro-Yepes J., Anandhan A., Bradley E., Bohovych I., Yarabe B., de Jong A., Ovaa H., Zhou Y., Khalimonchuk O., Quintanilla-Vega B., Franco R. (2016) *Mol. Neurobiol.*, **53**(8), 5229-5251. DOI: 10.1007/s12035-015-9414-9.
- Beatman E.L., Massey A., Shives K.D., Burrack K.S., Chamanian M., Morrison T.E., Beckham J.D. (2016) *J. Virol.*, **90**(6), 2767-2782. DOI: 10.1128/JVI.02949-15.
- Giasson B.I., Jakes R., Goedert M., Duda J.E., Leight S., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2000) *J. Neurosci. Res.*, **59**(4), 528-533.
- Barinova K.V., Khomyakova E.V., Kuravsky M.L., Schmalhausen E.V., Muronetz V.I. (2017) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **482**(4), 1265-1270.
- Barinova K.V., Kuravsky M.L., Arutyunyan A.M., Serebryakova M.V., Schmalhausen E.V., Muronetz V.I. (2017) *Int. J. Biol. Macromol.*, **96**, 35-43.
- Kuravsky M.L., Schmalhausen E.V., Pozdnyakova N.V., Muronetz V.I. (2012) *Anal. Biochem.*, **426**(1), 47-53.
- Laemmli U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
- Muronetz V.I., Korpela T. (2003) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, **790**, 53-66.
- Goto H., Inagaki M. (2007) *Nat. Protoc.*, **2**, 2574-2581.
- Gorgani N.N., Parish C.R., Easterbrook Smith S.B., Altin J.G. (1997) *Biochemistry*, **36**(22), 6653-6662.
- Poon I.K., Patel K.K., Davis D.S., Parish C.R., Hulett M.D. (2011) *Blood*, **117**(7), 2093-2101.

Поступила: 17. 02. 2018.
Принята к печати: 11. 05. 2018.

**A RATIONAL APPROACH TO OBTAINING HIGH-SPECIFIC POLYCLONAL ANTIBODIES
AGAINST RECOMBINANT ALPHA-SYNUCLEIN**

K.V. Barinova^{1,3}, A.K. Melnikova², E.V. Schmalhausen¹, V.I. Muronetz^{1,2}

¹Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
1 bld. 40 Leninskie Gory, Moscow 119234 Russia; e-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru

²Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine, Moscow, Russia

The approach for the quick and efficient production of polyclonal antibodies to the target antigen alpha-synuclein has been proposed. Two methods have been employed to purify specific rabbit polyclonal antibodies against recombinant human alpha-synuclein, produced by subcutaneous immunization with complete Freund's adjuvant. It was shown that purification on CNBr-activated Sepharose with immobilized alpha-synuclein resulted in antibody preparation with rabbit serum histidine-rich glycoprotein as a contaminant. Two-stage antibody purification procedure first on Sepharose with immobilized protein G, and then on alpha-synuclein immobilized column helps to avoid contamination and to obtain homogenous antibody preparation. Antibodies recognize different conformations of alpha-synuclein and can be used in a variety of immunochemical approaches, including immunocytochemistry.

Key words: polyclonal antibodies; alpha-synuclein; adjuvant; immunization