

Можно заключить, что для повышения эффективности отбора в селекции, направленной на получение несущих ген *Vf* сортов яблони, целесообразно сочетать классический фитопатологический подход с использованием молекулярных маркеров. Это позволит значительно ускорить процесс селекции за счет идентификации ценных генов на первых стадиях роста растений и при этом получить более точные результаты относительно содержания гена *Vf* в генотипе селекционного материала, поскольку анализ будет проводиться непосредственно на уровне ДНК, а не на уровне подверженного влиянию среды фенотипа.

Немаловажно также то, что использование молекулярных маркеров позволяет вовремя избавиться от селекционного брака и таким образом сократить площади посевов и расходы, связанные с уходом за деревьями, не представляющими селекционной ценности.

Литература

1. Развитие растениеводства // Государственная программа возрождения и развития села на 2005-2010 гг. Интернет-адрес: <http://www.president.gov.by/press30965.html>.
2. Бондарь Л.В. Расовый состав возбудителя парши яблони в Белоруссии и селекция яблони на иммунитет к парше // Бондарь Л.В. Селекция яблони в СССР. – Орел, 1981. – С. 89-94.
3. Козловская З.А. Совершенствование сортимента яблони в Беларуси. – Мн., 2003. – 168 с.
4. Gessler C., Patocchi A., Sansavini S., Tartarini S., Gianfranceschi L. *Venturia inaequalis* Resistance in Apple // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2006. – Vol. 25. – Pp. 473-503.
5. Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., Gessler C. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple // Plant Breed. – 1999. – Vol. 118. – Pp. 183-186.
6. Afunian M.R., Goodwin P.H., Hunter D.M. Linkage of *Vfa4* in *Malus × domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* // Plant Pathology. – 2004. – Vol. 53. – Pp. 461-467.
7. Vějl P., Skupinová S., Blažek J., Sedlák P., Bardová M., Drahošová H., Blažková H., Milec Z. PCR markers of apple resistance to scab (*Venturia inaequalis* СКЕ.) controlled by *Vf* gene in Czech apple breeding // Plant Soil Environ. – 2003. – Vol. 49. №9. – Pp. 427-432.

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ЧАСТИ РЕЦЕПТОРА CXCR2 ЧЕЛОВЕКА

И. В. Дмитриева

ВВЕДЕНИЕ

Функционирование иммунной системы направлено на защиту орга-

низма от попадания во внутреннюю среду чужеродных объектов. Координированная работа всех органов иммунной системы и ее клеток возможна благодаря механизмам межклеточной коммуникации, среди которых важное место занимает передача сигнала посредством хемоаттрактантов.

Хемотактические цитокины и рецепторы к ним являются промежуточными звеньями в сложной цепи иммунологических реакций. Передавая сигнал из очага воспаления, они обеспечивают своевременное противодействие чужеродным агентам, проникающим во внутреннюю среду организма [1]. Одним из важнейших хемокинов человека является IL-8. При воздействии на нейтрофилы интерлейкин-8 вызывает хемотактическое перемещение нейтрофилов, диapedез, повышение концентрации кальция в цитоплазме и высвобождение продуктов окислительного взрыва посредством экзоцитоза. IL-8 взаимодействует с двумя рецепторами, экспрессированными на поверхности нейтрофилов и некоторых других клеток: CXCR1 и CXCR2 [2]. CXCR2 прочно связывается со всеми CXС-хемокинами, содержащими ELR-мотив (глутамат-лейцин-аргинин) [3].

В Лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии ГУ «РНПЦ гематологии и трансфузиологии» была впервые обнаружена растворимая форма CXCR2. Свойства рCXCR2, а также его физиологическая роль, исследованы мало. Целью настоящей работы было получение поликлональных антител к растворимой форме CXCR2.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовался очищенный препарат растворимого CXС-рецептора 2 типа человеческих клеток рCXCR2, а также синтетический пептид 25–33, идентичный соответствующей аминокислотной последовательности экстраклеточного участка рецептора CXCR2. В ходе данной работы была приготовлена серия белковых конъюгатов с пептидом 25–33, а именно: 3 конъюгата миоглобин-пептид, 1 конъюгат бычьего сывороточного альбумина (БСА) с пептидом и 1 конъюгат на основе синтетического полилизина (соединение со средней молекулярной массой 150 кДа). В качестве кросс-линкера использовали иминотиолан и сульфoMBS. Предварительные иммунизации кролика проводились конъюгатом БСА-пептид, который в данной работе использовался в качестве положительного контроля при проведении иммуноферментного анализа с конъюгатами.

Конъюгаты на основе БСА и миоглобина были проверены методом белкового электрофореза. Со всеми конъюгатами был также проведен прямой иммуноферментный анализ.

Через 7 суток после иммунизации образец крови кролика отобрали

для анализа [4]. Сыворотка получена осаждением форменных элементов центрифугированием. Далее была проведена очистка поликлональных антител методом иммуноаффинной сорбции с использованием 4В-сефарозы, конъюгированной с пептидом 25–33. После проведения иммуноаффинной сорбции была определена концентрация поликлональных антител с помощью иммуноферментного анализа. Далее антитела использовались для постановки иммуноферментного анализа (ИФА) в двух вариантах: прямой конкурентный и «сэндвич»-иммуноферментный анализ. При проведении конкурентного ИФА определялась зависимость оптической плотности пробы от содержания пептида 25–33 при фиксированной концентрации меченого биотином пептида.

«Сэндвич»-ИФА был проведен с использованием моноклональных 3/7А анти-СХСР2 антител, специфичных к N-концевому участку растворимой формы СХСР2, в качестве твердой фазы, а кроличьи поликлональные антитела использовались в качестве жидкофазных [5].

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Целью работы являлось получение поликлональных антител к С-концевой части пептида 25–33, а также проведение иммуноферментного анализа, с помощью которого можно определять концентрацию растворимой формы рецептора в образцах с неизвестным его содержанием.

В разных условиях провели несколько опытов по приготовлению конъюгатов белок-пептид. Успешность реакции конъюгации была проверена в ходе прямого ИФА и белкового электрофореза. Результаты этих опытов показали, что наиболее удачно прошла реакция конъюгации пептида 25–33 с БСА. Наихудший результат показал конъюгат на основе миоглобина. Для получения поликлональных антител к пептиду 25–33 использовали кролика. Для получения поликлональных антител к пептиду 25–33 кролика реиммунизировали конъюгатом полилизин-пептид, поскольку для предварительных иммунизаций использовали конъюгат БСА-пептид. Для получения более высокого титра антител, специфических к гаптену, желательно использовать разные белки-носители. Полилизин, конъюгированным с пептидом 25–33, иммунизировали кролика. Через неделю после иммунизации была отобрана проба крови иммунизированного животного и из нее получена сыворотка.

В ходе прямого ИФА был проведен качественный анализ сыворотки на наличие специфичных к пептиду поликлональных антител. Из сыворотки иммуноаффинной сорбцией были выделены поликлональные антитела к пептиду, их концентрация в растворе была определена в ходе прямого ИФА. Концентрация выделенных поликлональных антител в растворе после их очистки составила 173,4 мкг/мл. Конкурентный иммуноферментный анализ подтвердил специфичность полученных антител к пептиду 25–33.

Далее был проведен «сэндвич»- иммуноферментный анализ.

На основании данных «сэндвич»- ИФА построен график, изображенный на рисунке 1. Как видно по рисунку 1, с помощью данного «сэндвич» – ИФА можно определить концентрацию растворимого CXCR2 в пределах 30-100 нг/мл.

ВЫВОДЫ

В ходе выполнения данной работы была приготовлена серия конъюгатов пептида 25–33 с белками-носителями. В результате проведенного анализа полученных конъюгатов для иммунизации кролика был выбран конъюгат на основе полилизина. Через семь дней после иммунизации была получена сыворотка кролика, из которой методом иммуноаффинной сорбции были выделены поликлональные антитела в концентрации 173,4 мкг/мл. Удалось успешно провести с выделенными из сыворотки поликлональными антителами иммуноферментный анализ двух типов: конкурентный и «сэндвич» – ИФА. Конкурентный иммуноферментный анализ подтвердил специфичность полученных антител к пептиду 25–33. С помощью «сэндвич» – иммуноферментного анализа можно определить концентрацию растворимого CXCR2 в пределах 15 – 100 мкг/мл.

Литература

1. Wells T.C., Power C.A., Proudfoot A.I. Definition, function and pathophysiological significance of chemokine receptors // Trends in Pharmacological Sciences. – 1998. – Vol. 19. – P. 376-380.
2. Lee G., Horuk R., Rice G.C. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors // The Journal of Biological Chemistry. – 1992. – Vol. 267. № 23. – P. 16283-16287.
3. Murphy P.M. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis // Cytokine and Growth Factors. – 1996. – Vol. 7. № 1 – P. 47-64.
4. Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Дж. Антитела. Методы // Под ред. Д. Кэтти. – М.: Мир, 1991. – Т.1. – 287 с.
5. Hsieh S.-C., Wu T.-H., Tsai C.-Y. Abnormal *in vitro* CXCR2 modulation and defective cationic ion transporter expression on polymorphonuclear neutrophils responsible for hyporesponsiveness to IL-8 stimulation in patients with active systemic lupus erythematosus // Rheumatology. – 2008. – № 47 – P. 150-157.

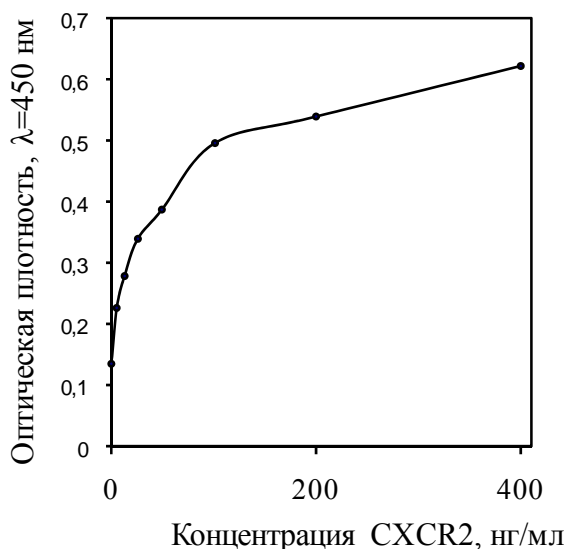


Рис. 1. Кривая титрования sCXCR2 в «сэндвич»-ИФА