

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ РЕЦЕПТОРА ИЛ-8 ВТОРОГО ТИПА

Ю. В. Гуменникова

Нейтрофильные лейкоциты периферической крови играют центральную роль в антибактериальной защите организма человека [3]. Функциональная активность нейтрофилов связана с их способностью к миграции из кровотока в ткани, где они участвуют в воспалительной реакции и осуществляют фагоцитарные антибактериальные функции. Основным хемоаттрактантом для нейтрофилов является интерлейкин-8 (ИЛ-8) [4, 5]. Свое действие ИЛ-8 оказывает через два типа мембранных рецепторов (CXCL8), которые запускают каскад внутриклеточных реакций, приводящих к хемотаксису и активации нейтрофилов. Фактор некроза опухоли- α и бактериальный липополисахарид, подавляют экспрессию рецепторов ИЛ-8 на нейтрофилах и снижают их способность отвечать на ИЛ-8 и другие α -хемокины [1]. Основным механизмом регуляции экспрессии рецепторов ИЛ-8 является ограниченный протеолиз с участием клеточно-связанной металлопротеазы [2]. Мы предполагаем, что при ограниченном протеолизе внеклеточного N-концевого домена CXCR2 образуется растворимая форма рецептора, представляющая собой его N-концевой пептид. Разработка высокочувствительного иммуноферментного метода определения растворимой формы рецептора CXCR2 позволит исследовать содержание пептида в биологической жидкости при различных патологических состояниях человека, а ранняя диагностика будет способствовать своевременному лечению.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтетические пептиды RII 1–21, соответствующий 1–21 а.к. в составе N-концевой последовательности CXCR2 и RII 6–48, соответствующий 6–48 а.к. были синтезированы в Филиале Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, РАН, Пущино-на-Оке, РФ.

Мышиные моноклональные антитела (МКА) 37А, 311Е, 37С получали из асцитной жидкости очисткой на колонке Белок А – сефароза 4В. Меченые пептиды были получены методом биотинилирования с помощью N-гидроксисукцинимид биотина («Pierce»). Стандартная процедура конкурентного ИФА включала следующие стадии: моноклональные антитела сорбировали в 0,1М Na-карбонатном буфере рН 9,6 в концентрации 10 мкг/мл в течение суток при 4°C; отмывали плату 3 раза 0,04М Трис-

HCl, 0,15M NaCl pH 7,4, содержащим 0,05 % Твин20 (буфер А); неспецифические участки связывания забивали буфером А с добавлением бычьего сывороточного альбумина (БСА) до 1 % в течение 40мин; меченный и холодный антиген разводили в буфере А с добавлением БСА до 0,5 % (буфер Б); инкубировали 40 мин при 25°C; отмывали 3 раза буфером А; конъюгат стрептавидин-пероксидазы разводили 1:6000 в буфере Б, вносили и инкубировали при комнатной температуре 40 мин; отмывали 3 раза буфером А; инкубировали 10–20 мин с субстратным буфером.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание метода твердофазного ИФА для определения концентраций пептидов РП мы начали с поиска пары антител, которые распознавали бы разные эпитопы на молекуле антигена. Подбор пары антител осуществляли с помощью конкурентного ИФА, оценивая способность немеченого антитела подавлять связывание меченого биотином антитела с адсорбированными на пластике антигеном РП 6–48 и РП 1–21. Результаты экспериментов показали, что все исследуемые антитела конкурируют между собой за связывание с твердофазным антигеном и, по-видимому, распознают один и тот же эпитоп, либо близко расположенный (рис.1). Это явление сделало невозможным разработку «сэндвич» варианта ИФА для определения пептида РП 1–21. Вследствие этого было предложено использовать конкурентный ИФА на основе меченого антигена.

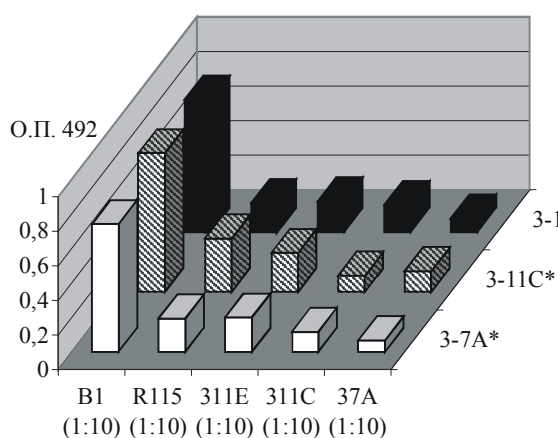


Рис.1. Разработка конкурентного метода иммуноанализа на основе меченых РП пептидов и твердофазных МКА 37А

Показано подавление связывания немеченых антител биотинилированными антителами, что свидетельствует о конкуренции за распознаваемый эпитоп

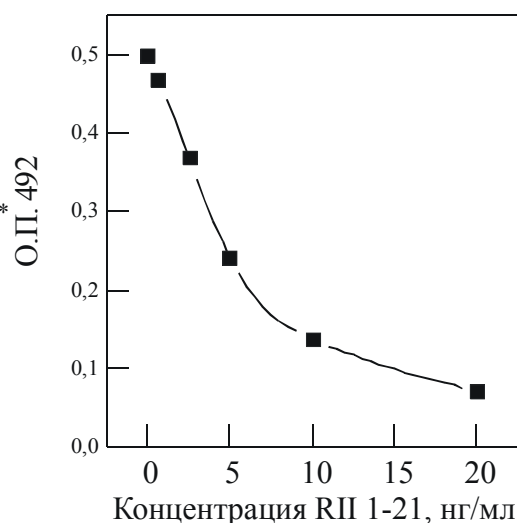


Рис.2. Калибровочная кривая конкурентного ИФА для РП 1-21 с использованием РП 1-21-Биотин в качестве меченого агента

Конкурентный метод ИФА является альтернативой «сэндвич» варианту ИФА и основан на конкуренции выявляемого и меченного антигенов за ограниченное количество мест связывания с иммобилизованными на твердой фазе МКА 37А.

Рабочий диапазон калибровочной кривой (рис.2) для определения RII 1–21 на основе меченого RII 1–21 составил 1–10 нг/мл.

Таким образом, разработанный ИФА характеризуется высокой чувствительностью (1 нг/мл для пептида RII 1-21), что в дальнейшем позволит определять растворимую форму рецептора CXCR2 в биологических жидкостях человека.

Литература

1. *Asagoe K, Yamamoto K, Takahashi A.* Down-regulation of CXCR2 expression on human polymorphonuclear leukocytes by TNF-alpha // *J Immunol.* 1998. Vol. 160. P. 4518–4525.
2. *Doroshenko T., Chaly Y., Savitsky V.* Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 // *Blood.* 2002. Vol.100. P. 2668–2672.
3. *Baggiolini M.* Chemokines and leukocyte traffic // *Nature.* 1998. Vol. 392. P. 565–568.
4. *Mukaida, N.* Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation // *Int. J. Hematol.* 2000. Vol. 72. P.391–402.
5. *Rollins B.* Chemokines // *Blood.* 1997. Vol. 90. P. 909–928.

ЦИКАДОВЫЕ РОДА *ARBORIDIA* ZACHV. (AUCHENORRHYNCHA: CICADELLIDAE: TYRHLOCYBINAE) ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ

А. Л. Егиян, О. И. Бородин

Территория Европы, согласно решению, принятому в 1970 году Международной федерацией документалистики подразделяется на Северную, Южную, Западную и Восточную, которые в свою очередь делятся на ряд регионов.

В настоящей работе под Восточной Европой мы понимаем регион, включающий в себя территории: европейской части России (без Кавказа), Прибалтики (Литва, Латвия, Эстония), Украины (без южной части Крымского полуострова) и Беларуси.

Установление видового состава и анализ данных по трофике, биотопическому распределению и сезонной динамике рода *Arboridia*, одной из наименее изученных и редких групп цикадовых Европы, осуществлялось нами преимущественно по материалам статей, а также с использованием собственных данных основанных на результатах сборов проводимых с