

Прирост, за который взята масса последней стадии эмбриогенеза (при допущении 100% утилизации желтка), умноженный на среднюю калорийность [5], дал сходные величины в 10 и 20° и оказался ниже при 30°С. Увеличение энергетических трат и уменьшение прироста при 30° сказались на коэффициенте использования ассимилированной энергии на рост. В то время как при температурах 10 и 20°  $K_2$  имеет близкие значения, при 30° он несколько ниже.

Таким образом, культивирование дафний в условиях постоянных температур и высокой концентрации пищи благоприятно сказывается на величинах чистой эффективности роста в эмбриональном периоде развития, о чем свидетельствуют высокие значения  $K_2$ .

### Список литературы

1. Боденер Г. Современная эмбриология. М., 1971.
2. Рошин В. Е., Мазелев К. Л. // Вестн АН БССР. Сер. биол. наук. 1978. № 5.
3. Green Y. // Journ. Proc. Zool. Soc. London, 1956. V. 126. P. 173.
4. Сущеня Л. М. Интенсивность дыхания ракообразных. Киев, 1972.
5. Галковская Г. А., Сущеня Л. М. Рост водных животных при переменных температурах. Мн., 1978.
6. Laurence C. // Journ. Fish. Res. Board of Canada. 1973. V. 30. № 3. P. 435.
7. Kamler E. // Pol. Arch. Hydrobiol. 1976. V. 23. № 3. P. 431.

УДК 616.831

*В. П. КУРЧЕНКО, Н. В. ГАВРИЛЕНКО,  
М. В. МАТЮНИНА, А. Т. ПИКУЛЕВ*

### ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ТУБУЛИНА

При ряде патологических состояний в крови больных обнаружены аутоантитела к белкам цитоскелета. Наиболее часто встречаются аутоантитела к белкам микротрубочек: тубулину (ТБ), высокомолекулярным белкам (МАР) и др. [1]. Количество ТБ в мозгу млекопитающих в 4—6 раз выше, чем в других органах, и составляет 250—280 мкг на 100 мг ткани. При разрушении нейронов и глиальных клеток, нарушении гематоэнцефалического барьера возможен выброс значительного количества ТБ в кровь. Тубулин обладает низкой антигенностью, связанной с крайним консерватизмом первичной структуры этого белка. Поэтому для образования аутоантител ТБ должен длительное время и в значительных количествах поступать в кровь. Наличие в крови ТБ может служить маркером развития патологических состояний, связанных с разрушением гематоэнцефалического барьера.

Существующий метод определения ТБ, основанный на способности нативного тубулина связывать меченый тритием колхицин, имеет ряд ограничений и не годится для определения денатурированного белка [2].

Целью работы являлась разработка количественного гетерогенного иммуноферментного метода определения нативного и денатурированного тубулина в различных органах и тканях.

### Материал и методика

Выделение тубулина из мозга крыс проводилось методом полимеризации-деполимеризации [3]. Очистку тубулина от минорных примесей и МАР проводили хроматографией на фосфоцеллюлозе [4]. На колонку с фосфоцеллюлозой (1,5×25 см), уравновешенную 0,05М фосфатным буфером, рН 6,9 с 0,005М  $MgCl_2$ , 0,001М ЭГТА и 0,0005М ГТФ (буфер А), наносили 10—20 мг белка. Колонку промывали буфером А, собирая элюат фракциями по 2 мл. Фракции, элюируемые при промывке колонки, объединяли и концентрировали пресосовым диализом. Очищенный препарат тубулина хранили при  $-20^{\circ}C$ .

**Получение конъюгата пероксидаза хрена-тубулин [ТБ-ПХ]** проводили по описанной ранее методике [5] с некоторыми модификациями. Для синтеза конъюгата [ТБ-ПХ] использовали пероксидазу хрена, модифицированную по аминогруппам аминокислотных остатков уксусным ангидридом. Пероксидазу хрена (150 мг) растворяли в 30 мл 0,1М  $\text{NaHCO}_3$ , рН 8,0 и помещали в водяную баню. В течение 60 мин приливали 30 мкл свежеперегнанного уксусного ангидрида. Добавлением малых доз 1М  $\text{NaOH}$  поддерживали рН 8,0. По окончании реакции раствор модифицированной пероксидазы диализовали 24 ч против 100 объемов 0,01М фосфатного буфера рН 7,5.

К раствору, содержащему 20 мг модифицированной пероксидазы, присыпали 60 мг сухого периодата натрия и в темноте инкубировали 30 мин. Затем добавляли 0,035 мл этиленгликоля и через 60 мин диализовали против 0,01М карбонатного буфера рН 9,5.

После диализа к активированной пероксидазе прибавляли 6 мг тубулина в 0,1М карбонатном буфере рН 9,5. Реакцию конъюгации вели при комнатной температуре. Через 3 ч добавляли 15 мг боргидрида натрия и вели реакцию еще 3 ч. Реакционную смесь диализовали против 200 объемов 0,01М фосфатного буфера рН 7,5, содержащего 0,1М  $\text{NaCl}$  (буфер Б).

Выделение комплекса [ТБ-ПХ] вели на колонке с сефадексом G-200 (3,2×90 см), уравновешенной буфером Б. Профиль элюции представлен на рис. 1. Концентрацию компонентов конъюгата [ТБ-ПХ] определяли спектрофотометрически по поглощению при  $\lambda_{280}$  и  $\lambda_{403}$  нм. Мольное соотношение пероксидазы и тубулина в конъюгате [ТБ-ПХ] составило 1/2,4. Полученный конъюгат хранили в 0,5М фосфатном буфере рН 7,5 с 50 % глицерина при  $-20^\circ\text{C}$ .

Получение антисывороток к тубулину вели по методу [6]. Кроликов иммунизировали очищенным тубулином, предварительно обработанным додецилсульфатом натрия для повышения его антигенности. Иммунизацию животных вели смесью модифицированного тубулина и полного адьюванта Фрейнда один раз в две недели по 2,5 мг белка в течение девяти месяцев. Кровь у животных брали из ушной краевой вены после достижения титра антител к тубулину 1:8. Сыворотки хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

Выделение моноспецифичных антител к тубулину вели аффинной хроматографией антисывороток на тубулин-целлюлозе. Для получения сорбента 50 г микрокристаллической целлюлозы отмывали дистиллированной водой и суспендировали в 250 мл 0,1М цитратно-ацетатного буфера рН 4,25. К суспензии прибавляли 10 г периодата натрия и 60 мин перемешивали на магнитной мешалке. Затем промывали активированную целлюлозу дистиллированной водой. Препарат тубулина, очищенный на фосфоцеллюлозе (150 мг), в 0,01М карбонатном буфере рН 9,5 вносили в суспензию активированной целлюлозы и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч, затем добавляли 1 г пербората нат-

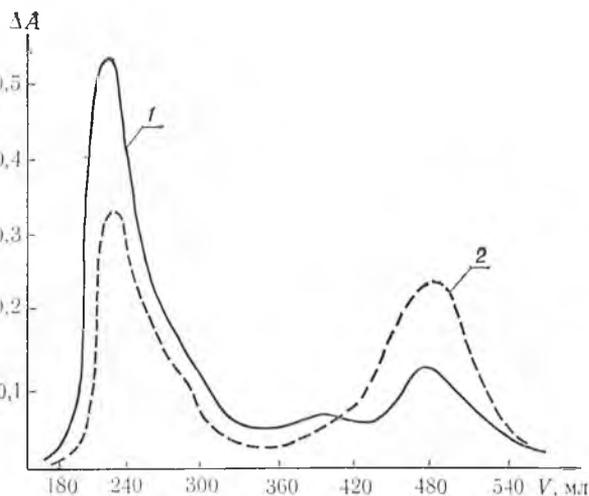


Рис. 1. Профиль элюции конъюгата [ТБ-ПХ] на колонке с сефадексом G-200

1 — поглощение при  $\lambda_{280}$  нм; 2 — поглощение при  $\lambda_{403}$  нм

рия и продолжали реакцию еще 3 ч. По окончании реакции осадок целлюлозы декантировали и промывали 0,1М NaCl. Количество связавшегося с целлюлозой тубулина определяли по разнице внесенного в реакционную смесь и содержащегося в промывной жидкости белка. С 50 г целлюлозы связывалось 80 мг тубулина.

Антисыворотку к тубулину (150 мл) диализовали против 0,05М трис-HCl буфера pH 6,9 с 0,2М NaCl (буфер В) и наносили на колонку с тубулин-целлюлозой (3,2×15 см), уравновешенную буфером В. Колонку промывали буфером В до исчезновения поглощения при  $\lambda_{280}$  нм в элюате. Элюцию антител вели буфером В, содержащим 4,5М MgCl<sub>2</sub>. Моноспецифичные антитела к тубулину диализовали против 0,01М бикарбоната аммония и лиофилизировали.

**Ход иммуноферментного анализа на тубулин.** В лунки полистирольного планшета разливали по 0,2 мл антител и инкубировали при 37 °С. Раствор антител через 60 мин сливали, в лунки вносили по 0,3 мл забуференного физиологического раствора, содержащего 0,5% бычьего сывороточного альбумина, и повторно инкубировали при 37 °С 30 мин. После удаления раствора из ячеек в них вносили в 0,3 мл различное количество тубулина, инкубировали 30 мин и добавляли по 0,02 мл конъюгата [ТБ-ПХ]. Инкубацию продолжали еще 30 мин. Затем, удалив смесь и промыв ячейки дистиллированной водой, в них вносили по 0,3 мл реакционной смеси, содержащей 0,006М *o*-дианизидина, 0,001М пербората натрия в 0,1М цитратно-ацетатном буфере pH 6,0 с 0,5 % твина-20. Реакцию вели 30 мин при 30 °С и фотометрировали при  $\lambda_{460}$  нм.

В работе использовались: пероксидаза хрена  $P_z$  403/280=2,5, планшеты для иммунологических реакций, бычий сывороточный альбумин, адыовант Фрейнда («Calbiochem», США), твин-20 («Merck», ФРГ), *o*-дианизидин, периодат натрия, боргидрид натрия и другие реактивы отечественного производства марки «хч».

### Результаты и их обсуждение

**Пероксидазная активность конъюгата [ТБ-ПХ]** была изучена в реакции окисления *o*-дианизидина (*o*-ДА) перборатом натрия при 30 °С. Для [ТБ-ПХ] получена зависимость скорости окисления субстрата от его концентрации, из которой вычислены кинетические параметры реакции пероксидазного окисления:  $k_{кат} = 3,03 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ ;  $K_M = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ;  $V = 7,57 \cdot 10^{-7} \text{ М/с}$ . Конъюгат сохраняет каталитические свойства, но сродство субстрата и каталитические константы несколько ниже в сравнении с их значениями для немодифицированной пероксидазы [7].

На рис. 2 показана зависимость скорости окисления *o*-ДА конъюгатом [ТБ-ПХ] от концентрации антител, сорбированных в лунках планшета. Наиболее полная сорбция антител на стенках лунок планшета достигается при внесении в лунку 0,15 мг белка моноспецифичных антител к тубулину.

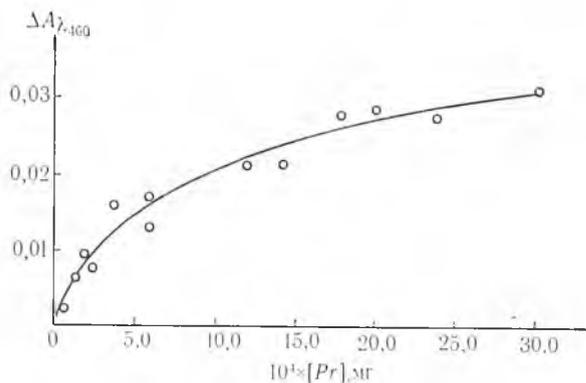


Рис. 2. Зависимость скорости окисления *o*-дианизидина конъюгатом [ТБ-ПХ] от концентрации антител

к тубулину. При этом сорбированные антитела эффективно взаимодействовали с тубулином конъюгата [ТБ-ПХ]. Оптимальное время взаимодействия антител и [ТБ-ПХ] составляет 30 мин при 37 °С.

**Имуноферментный анализ тубулина.** При 37 °С в течение 60 мин инкубировали моноспецифичные антитела к тубулину в лунках планшета (оптимальное содержание белка 0,02 мг/мл). Имму-

ноглобулины сорбируются на стенках лунок планшета. Последующая инкубация с забуференным физраствором, содержащем 0,5 % бычьего сывороточного альбумина, приводит к более полному покрытию поверхности лунок сорбированным альбумином, что предотвращает неспецифическую сорбцию конъюгата [ТБ-ПХ] полистиролом плашек. После удаления из лунок раствора в них вносили 0,3 мл раствора тубулина различной концентрации и через 30 мин приливали 0,02 мл раствора конъюгата ( $3,1 \cdot 10^{-11}$  М). Инкубация продолжалась еще 30 мин. Тубулин конкурирует с конъюгатом [ТБ-ПХ] за связывание с антителами к тубулину, сорбированными на поверхности лунки планшета: чем выше концентрация тубулина в смеси, тем меньше конъюгата связывается с антителами, и, следовательно, тем ниже скорость пероксидазного окисления *o*-ДА после удаления из лунки несвязавшихся компонентов. Активность конъюгата [ТБ-ПХ], связавшегося с сорбированными в лунке антителами, в окислении *o*-ДА определяли в стандартных условиях: 30 °С, в цитратно-ацетатном буфере рН 6,0, содержащем 0,4 мМ *o*-ДА и 1,0 мМ пербората натрия. На рис. 3 представлена градуировочная прямая в координатах: lg [ТБ] — % связывания метки. Как следует из рис. 3, линейная связь между процентом связавшегося конъюгата и концентрацией тубулина из мозга крыс наблюдается в диапазоне  $10^{-9}$ — $10^{-6}$  М.

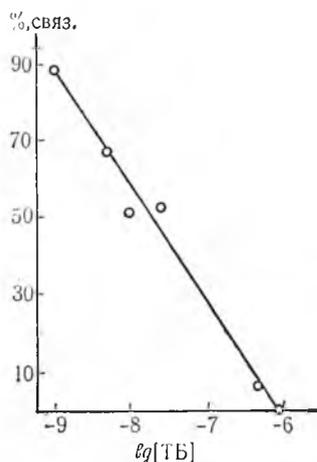


Рис. 3. Градуировочная прямая зависимости связывания конъюгата [ТБ-ПХ] от концентрации свободного тубулина

Таким образом, в описанных оптимальных условиях при концентрации конъюгата [ТБ-ПХ]  $3,1 \cdot 10^{-11}$  М возможно определение тубулина из мозга крыс порядка  $10^{-9}$  М. Достоинством метода является его простота, доступность реагентов и возможность с высокой точностью определять уровень тубулина (как нативного, так и денатурированного) в различных тканях.

### Список литературы

1. Вен - Зе'ев А. // Biochem. Biophys. Acta. 1985. V. 780. P. 197.
2. Sherline P., Bodwin K. C., Kipnis D. M. // Anal. Biochem. 1974. V. 62. P. 400.
3. Eipper B. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 8. P. 2283.
4. Kumar N., Flavin M. // Eur. Journ. Biochem. 1982. V. 128. № 3. P. 215.
5. Гаврилова Е. М., Дзантиев Б. Б., Егоров А. М. // Биохимия. 1979. Т. 44. № 9. С. 1614.
6. Андросова Л. В., Бурбаева Т. Ш. // Нейрохимия. 1985. Т. 4. № 1. С. 10.
7. Савенкова М. И., Курченко В. П., Метелица Д. И. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 7. С. 1147.

УДК 581.9(476.1)

Ю. А. БИБИКОВ

### ОХРАНЯЕМЫЕ РАСТЕНИЯ МИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Катастрофически быстро нарастает общепланетарное разрушение биологического разнообразия — разнообразия видов, популяций, их природных сочетаний (сообществ, флор и фаун), слагаемых ими экосистем. Этот процесс таит большую угрозу для выживания человечества и сохранения биосферы как сбалансированного целого. Опасность его еще недостаточно осознана. Необходимы неотложные меры по расширению и усвершенствованию национальной сети охраняемых территорий [1].

На кафедре ботаники Белгосуниверситета им. В. И. Ленина с 1968 г.