

УДК 547.963.3

БИОХИМИЯ

М. И. МОСЕВИЦКИЙ, А. М. ПОВЕРЕННЫЙ, В. К. ПОДГОРОДНИЧЕНКО

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ДНК МЕТОДОМ ГЕЛЕВОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

(Представлено академиком А. С. Спириным 25 IV 1975)

Молекула ДНК в растворе представляет собой легко деформируемый клубок. Благодаря способности к деформации молекулы ДНК с молекулярным весом даже свыше 10^8 дальтон обладают подвижностью при гелевом электрофорезе. При этом они продавливаются сквозь поры, размеры которых во много раз меньше диаметра недеформированного клубка (^{1, 2}). Любой механизм структурирования, т. е. возникновения внутри- или межмолекулярных сшивок, должен приводить к резкому падению деформируемости клубков ДНК и, соответственно, к потере ими способности перемещаться в геле. В настоящей работе это явление использовано в качестве высокочувствительного теста на взаимодействие у.-ф. облученной ДНК с антителами к у.-ф. облученной ДНК.

ДНК из тимуса теленка выделяли детергентным методом (³). Антитела к у.-ф. облученной ДНК получали, иммунизируя кроликов ДНК, облученной в дозе $3 \cdot 10^5$ эрг/мм², как описано ранее (⁴). О присутствии в сыворотках антител судили по результатам реакции пассивной гемагглютинации (р.п.г.а.) (⁵). Антитела, взаимодействующие с неповрежденными азотистыми основаниями, которые в небольшом количестве присутствуют в иммунных сыворотках, удаляли адсорбентом с денатурированной ДНК (⁶). Облучение ДНК, используемой в серологических реакциях, производили лампой БУВ-30 на расстоянии 25 см. Концентрация ДНК составляла 25–50 мкг/мл в 0,15 М растворе NaCl. К 0,2 мл раствора ДНК добавляли 0,02 мл антисыворотки при соответствующем разведении.

Агарозо-полиакриламидный гель был приготовлен в основном как описано в работе (⁷). Акриламид и метиленбисакриламид («Reanal», Венгрия) были перекристаллизованы из горячего хлороформа и ацетона соответственно. Концентрация бисакриламида составляла 5% от общей концентрации акриламида и бисакриламида, концентрация агарозы («Ferak», Берлин) 0,5%, акриламида 1%. Концентрация персульфата аммония составила 0,09%, а N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин 0,01% (²). Буферная система содержала 0,04 М трис, 0,02 М Na-ацетат, 2 мМ Na₂ ЭДТА, pH 8,0.

При применении чисто агарозных гелей использовали 1 и 1,5% агарозу в указанной выше буферной системе.

Электрофорез проводили при 4–6° в стеклянных трубках длиной 70 мм и диаметром 6 мм при градиенте напряжения 4 в/см. Время электрофореза от 1 до 2 час. ДНК окрашивали 0,2% раствором метиленового синего в 0,4 М ацетатном буфере (⁷) в течение 10 мин. и затем отмывали водой. Изменение объема ДНК и антисыворотки в пределах от 0,05 до 0,2 мл с содержанием ДНК 1–5 мкг не влияло на результаты.

В экспериментах, иллюстрируемых снимками, общий нанесенный на гель объем 0,1 мл, концентрация ДНК 25 мкг/мл.

Препараты ДНК для электронной микроскопии были приготовлены путем прикосновения к поверхности суспензии угольной пленкой, полученной на поддерживающей слюдяной пластине. Оттенеение образцов

проводили на вращающемся столике распылением в вакууме платины под углом 8° . Угольную пленку с оттененными препаратами снимали со слюды на поверхность воды и подхватывали электронно-микроскопическими сеточками. Электронно-микроскопические снимки получены на электронном микроскопе JEM-5G.

На рис. 1 представлены результаты электрофореза различных препаратов ДНК без антисыворотки и совмещенных с антисывороткой к у.-ф. облученной ДНК. Как видно из рисунка, необлученная ДНК без антисыворотки к у.-ф. облученной ДНК и с антисывороткой обладает способ-

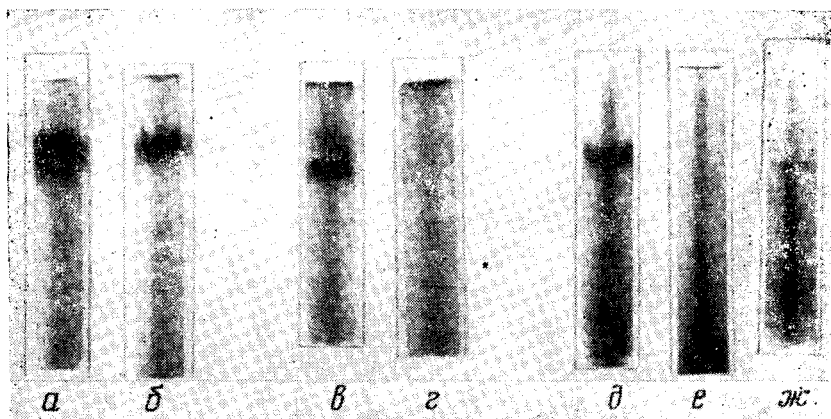


Рис. 1. Электрофорез ДНК в 1,5% агарозных гелях. Длительность электрофореза 2 часа. Напряженность 4 в/см. *а* — необлученная ДНК; *б* — необлученная ДНК в присутствии антисыворотки к димерам (10^{-2}) (здесь и далее в скобках указаны разбавления антисыворотки; ДНК везде 25 мкг/мл); *в* — ДНК, облученная дозой 200 эрг/мм²; *г* — она же в присутствии антисыворотки к димерам (10^{-2}); *д* — ДНК, облученная дозой 1000 эрг/мм²; *е* — она же в присутствии антисыворотки к димерам (10^{-3}); *ж* — она же в присутствии антисыворотки к димерам (10^{-4})

ностью мигрировать в геле (*а*, *б*). После облучения у.-ф. светом ДНК без антисыворотки сохраняет эту способность (*в*, *д*), но совмещенная с антисывороткой теряет способность перемещаться сквозь поры геля (*г*, *е*, *ж*). При увеличении дозы облучения требуется меньшее количество антисыворотки для того, чтобы воспрепятствовать миграции ДНК. Такой эффект, очевидно, можно объяснить присутствием в сыворотке спектра антител, направленных к структурам, поврежденным в различной степени у.-ф. светом (⁴). При увеличении дозы облучения в ДНК возникают новые антигенные детерминанты, и вследствие этого в реакцию вступает большее количество антител. Таким образом, предложенный метод позволяет давать количественную оценку антител в условных единицах путем нахождения наибольшего разведения сыворотки, которое еще способно вызывать задержку миграции ДНК. Неспособность антисыворотки к у.-ф. облученной ДНК влиять на миграцию интактной ДНК свидетельствует о специфичности предложенного метода. По чувствительности метод не уступает реакции пассивной гемагглютинации. Об этом свидетельствует тот факт, что используемая в исследованиях антисыворотка взаимодействовала в р.п.г.а. с эритроцитами, сенсibilизированными ДНК, облученной дозой 10^5 эрг/мм² при разведении 1:1280. При таком же разведении антисыворотка полностью лишала ДНК, облученную дозой 200–500 эрг/мм², способности входить и мигрировать в геле. Денситометрия снимков гелей позволяет увеличить чувствительность метода и сделать его количественным. На электронных микрофотографиях (рис. 2) представлена у.-ф. облученная ДНК (*а*) и у.-ф. облученная ДНК в присутствии ан-

тител к фотопродуктам (б). На фотографиях видно, что антитела при взаимодействии «сшивают» молекулы ДНК (рис. 2 см. вкл. к стр. 96).

Вследствие высокой чувствительности и специфичности метод гелевого электрофореза может быть использован в иммунохимических исследованиях ДНК, а также для определения антител к нуклеиновым кислотам у людей с различными заболеваниями. Как известно, для выявления антител к нуклеиновым кислотам у больных используют как прямые, так и косвенные методы (⁸, ⁹). При определении антител к нативной ДНК особенно целесообразно использование прямых методов, при которых исключается возможность нарушения вторичной структуры, поскольку появление деспирализованных участков может обусловить реакцию за счет антител к денатурированной ДНК, часто присутствующих в сыворотках одновременно с антителами к нативной ДНК. Для этой цели в наиболее полной мере подходит радиоиммунологический метод с фиксацией иммунного комплекса на мембранных фильтрах. Однако его применение ограничено техническими условиями. Предложенный метод относительно прост, доступен для большинства лабораторий и может быть использован для определения антител к нативной ДНК, так как в процессе электрофореза состояние вторичной структуры ДНК не нарушается (¹).

Следует также отметить, что метод электрофореза в агарозо-полиакриламидном геле имеет преимущество перед методом встречного иммуноэлектрофореза, получившего распространение для определения антител к нативной ДНК (¹⁰⁻¹²). Известно, что на взаимодействие между сыворотками и ДНК оказывает влияние ионная сила. В условиях встречного иммуноэлектрофореза реакция проводится только при низкой ионной силе порядка 0,025–0,05. В растворах с низкой ионной силой может происходить неспецифическое взаимодействие ДНК с различными белками сыворотки (¹³). Предложенный метод лишен этого недостатка, так как взаимодействие ДНК с антисывороткой производится в 0,15 *M* растворе NaCl. Кроме того, методом гелевого электрофореза можно определять различные антитела к ДНК, а методом встречного иммуноэлектрофореза только преципитины.

Авторы выражают искреннюю благодарность С. Е. Бреслеру за интерес к работе и А. И. Лишанской за помощь в проведении опытов по гелевому электрофорезу.

Ленинградский институт ядерной физики
им. Б. П. Константинова
Академии наук СССР

Поступило
7 III 1975

Научно-исследовательский институт
медицинской радиологии
Академии медицинских наук СССР
Обнинск Калужской обл.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. H. Flint, R. E. Harrington, *Biochemistry*, v. 11, № 25, 4858 (1972). ² A. I. Lishanskaya, M. I. Mosevitsky, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 52, 1213 (1973). ³ E. Kay, N. Simmons, A. Daunce, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 74, № 7, 1724 (1952). ⁴ В. К. Подгородниченко, А. М. Поверенный, А. Л. Мазин, *Мол. биол.*, т. 3, № 1, 105 (1969). ⁵ А. М. Поверенный, М. И. Леви, *Биохимия*, т. 28, № 1, 80 (1964). ⁶ В. В. Адлер, А. М. Поверенный и др., *Мол. биол.*, т. 7, № 2, 203 (1973). ⁷ A. C. Peacock, C. W. Dingman, *Biochemistry*, v. 6, № 6, 1818 (1967). ⁸ А. М. Поверенный, Т. Л. Алейникова, А. С. Саенко, *Биохимия*, т. 31, № 1, 6 (1966). ⁹ З. С. Алекберова, Л. М. Цыпляковская и др., *Терапевт. архив*, т. 11, 82 (1974). ¹⁰ A. Klajman, R. Farkash, B. D. Myers, *J. Immunology*, v. 111, № 4, 1136 (1973). ¹¹ P. C. Arquetvourg, M. Lopez et al., *J. Immunological Methods*, v. 5, 119 (1974). ¹² M. Henderson, C. Wallis et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 61, № 1, 66 (1974). ¹³ А. М. Поверенный, И. А. Иващенко, Д. В. Стефани, *Вопр. мед. хим.*, т. 14, № 2, 175 (1968).