



УДК 616.831—097.2

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ТУБУЛИНА,
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ НЕРВНОЙ ТКАНИ

АНДРОСОВА Л. В., БУРБАЕВА Г. Ш.

Всесоюзный научный центр психического здоровья АМН СССР, Москва

Антигенные свойства тубулина, выделенного из мозга быка, изучали с помощью антисывороток, полученных против препаратов тубулина, выделенного полимеризацией-деполимеризацией с последующей очисткой от минорных примесей на фосфоцеллюлозе, а также модифицированного бычьим сывороточным альбумином и денатурацией при обработке додецилсульфатом натрия. Специфичность и титр антисывороток исследовали в реакции двойной иммунодиффузии. Реакция идентичности между нативным и денатурированным тубулином указывает на то, что обработка додецилсульфатом натрия не изменяет антигенную детерминанту белка. Специфические антитела к тубулину были выявлены в антисыворотках к конъюгату и к денатурированному тубулину, причем титр был выше при иммунизации конъюгатом.

Имеющиеся в настоящее время данные о некоторых различиях в кинетике реакции полимеризации—деполимеризации и колхичинсвязывающей активности тубулина, выделенного из ткани разных органов [1—4], позволяют предположить их структурные различия, которые, по-видимому, могут быть выявлены иммунохимическими методами с использованием моноспецифических антисывороток. Вместе с тем существуют трудности получения моноспецифической антисыворотки к тубулину, связанные с его низкой антигенностью [5—7].

Целью данной работы было изучение антигенных свойств нативного и модифицированного тубулина. Модификацию тубулина для усиления его антигенности проводили двумя методами: конъюгированием с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и денатурацией при обработке додецилсульфатом натрия (ДДС-Na).

Материалы и методы

Тубулин выделяли из ткани мозга быка методом полимеризации-деполимеризации, описанным Shelanski и соавт. [1], через 1,5—3 ч после забора животного. В отличие от общепринятого метода в качестве рабочего буфера использовали 50 мМ K^+ , Na^+ -фосфатный буферный раствор, содержащий 1 мМ $MgCl_2$, pH 6,7 при 20°. В процессе выделения использовали 0,1 мМ GTP («Sigma», США) и 1 мМ ЭГТА («Serva», ФРГ).

Исследовали возможность ступенчатого выделения тубулина: процесс его получения прерывали на стадии полимеризации микротрубочек, их осадок суспендировали в 25 mM K^+ , Na^+ -фосфатном буфере, содержащем 1 mM $MgCl_2$, 4 M глицерина и 1 mM ЭГТА. Для выделения тубулина препарат микротрубочек вновь инкубировали 1 ч при 37° и затем центрифугировали при 100000g в течение 1 ч при 25—30°. Осадок микротрубочек суспендировали в рабочем растворе, остальные этапы выделения тубулина из микротрубочек повторяли, как описано Shelanski и соавт. [1].

Полученные препараты тубулина хранили до полутора лет при -20°, или же в виде микротрубочек в 8 M глицерине в течение года при тех же условиях. При проведении деполимеризации таких микротрубочек их предварительно разбавляли в 2 раза рабочим раствором (50 mM K^+ , Na^+ -фосфатный буфер, содержащий 1 mM $MgCl_2$ и 2 mM ЭГТА). К полученному раствору добавляли 0,1 mM GTP, инкубировали при 37° 1 ч, центрифугировали при 100000g 1 ч при 25—30° и далее проводили все операции, как описано выше [1]. Сохранность тубулина контролировали электрофоретически, по способности связываться с колхицином и иммунологически.

Для получения тубулина, свободного от минорных компонентов (микротубулоассоциированных белков), использовали хроматографию на фосфоцеллюлозе [8]. Тубулин элюировали с колонки 25 mM K^+ , Na^+ -фосфатным буфером, содержащим 1 mM $MgCl_2$, 1 mM β -меркаптоэтанол и 0,1 mM ЭДТА, а микротубулоассоциированные белки элюировали 1 M NaCl в том же буфере и затем проводили диализ против него, после чего белковый раствор лиофилизировали.

Денатурированный тубулин получали методом электрофореза в ПААГ-пластинке (25×12×1,5 см), содержащей ДДС-Na, на которую наносили 1,2—1,5 мг тубулина, выделенного методом полимеризации-деполимеризации. По окончании электрофореза из геля вырезали зону, соответствующую тубулину (предварительно выявленную при окрашивании электрофоретической дорожки). Элюцию белка проводили 0,005 M фосфатным буферным раствором, pH 7,0, содержащим 0,05%-ный ДДС-Na, в течение 18 ч при 37°. После диализа против деионизированной воды белок лиофилизировали.

Для доказательства того, что выделенный белок является тубулином, был проведен ряд контролей: 1. Электронномикроскопический контроль на стадии полимеризации микротрубочек. Отобранную аликвоту суспензии микротрубочек (5—10 мл) центрифугировали при 70000g 1 ч при 25—30°. Осажденные микротрубочки фиксировали 2%-ным раствором глутарового альдегида в 0,1 M фосфатном буферном растворе, pH 7, 4, в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее обработку материала проводили по общепринятой схеме [9]. Ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе «Philips-201-C» (Голландия)*. 2. Определение колхицина-вызывающей активности тубулина по методу Sherline и соавт. [2], используя 3H -колхицин [3H -C-methoxy]-Colchicine; 5,0 Ci/mole, "Amersham", Англия).

3. Определение величины M_r и гомогенности тубулина методом электрофореза в 10%-ном ПААГ, содержащем 0,1% ДДС-Na [10] с использованием необходимых стандартных белков («Sigma», США): бычий альбумин, яичный альбумин, пепсин, трипсиноген, β -лактоглобулин, лизоцим.

Иммуные сыворотки получали путем иммунизации кроликов по схеме, разработанной в нашей лаборатории [11]. В качестве антигена использовали три вида препаратов тубулина: 1) тубулин, полученный полимеризацией-деполимеризацией и очищенный на фосфоцеллюлозе (исходный препарат); 2) конъюгат этого препарата с БСА; 3) гомогенный препарат тубулина, полученный в результате обработки исходного препарата ДДС-Na с последующей элюцией из ПААГ, содержащего ДДС-Na, после проведения электрофореза.

*Электронномикроскопическое исследование препаратов проведено сотрудниками отдела морфологии нашего центра В. И. Андерс и О. М. Литвиновой, которым авторы приносят свою благодарность.



Рис. 1. Электрофореграммы тубулина мозга быка, выделенного методом полимеризации-деполимеризации, из свежей (*а*) и замороженной (*б*) ткани



Рис. 2. Электронная микрофотография микротрубочек, выделенных из мозга быка. Препарат обрабатывали 1%-ной осмиевой кислотой в течение 30 мин с последующей проводкой в 20, 40, 50, 70, 96, 100%-ном спирте. $\times 70000$

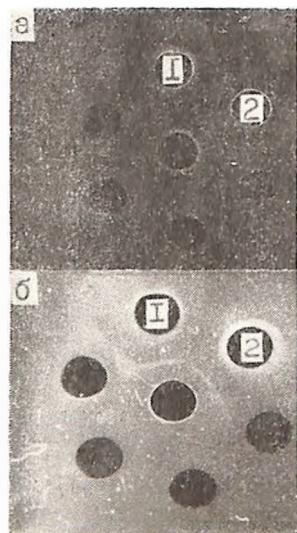


Рис. 4. Реакция двойной иммунодиффузии при иммунизации кроликов препаратами НТ (а) и НТ-БСА (б). 1. НТ—тубулин мозга, выделенный методом полимеризации-деполимеризации и очищенный на фосфоселлюлозе (1 мг/мл); 2. НТ—тубулин мозга, выделенный препаративным электрофорезом (1 мг/мл); в центре—антисыворотка к тубулину мозга—НТ (а) и к конъюгату тубулина мозга с БСА—НТ-БСА (б); в остальных лунках—физиологический раствор.

Конъюгирование тубулина с БСА проводили, используя метилированный БСА («Serga», ФРГ) [12].

Для истощения антител к БСА антисыворотки, полученные против конъюгата, абсорбировали хроматографией на имуносорбенте—сефароза-4В-БСА [13].

Титр и специфичность полученных антисывороток определяли в реакции двойной иммунодиффузии в агаровом геле [14]. При этом исследуемую антисыворотку вносили в центральную лунку, а в периферические лунки—последовательные двукратные разведения препаратов тубулина с исходной концентрацией 8 мг/мл. За титр принимали максимальное разведение экстракта, которое образует преципитат с исследуемой антисывороткой.

Результаты и обсуждение

Было проведено сравнительное исследование возможности выделения тубулина методом полимеризации-деполимеризации [1] из свежей и замороженной ткани мозга быка. При выделении оценивали однородность и выход полученного препарата. Как видно из электрофореграммы (рис. 1, а), тубулин, выделенный из свежей ткани мозга быка, имеет четко различимую доминантную зону с M_r 54,00—0,65 кД, что совпадает с литературными данными [15, 16], и несколько минорных компонентов. Белки минорных зон, по-видимому, являются микротубулоассоциированными белками, так как они обнаруживаются, причем не изменяясь количественно, при повторных циклах полимеризации-деполимеризации. Эти белки не только инициируют и регулируют процесс полимеризации, но и сами включаются в структуру микротрубочек [17].

Таблица

Выход тубулина, полученного методом полимеризации-деполимеризации из свежей и замороженной ткани мозга быка

Материал	Масса ткани, г	Общее количество водорастворимых белков в экстракте, мг	Количество препарата тубулина, мг	Количество препарата тубулина в % от общего количества водорастворимых белков экстракта
Свежая ткань	640	5090	370	7
	800	6750	660	10
	600	4930	390	8
	100	1070	80	7,5
	100	1070	85	8
	120	1450	120	8
Замороженная ткань	500	4733	19,8	0,4
	650	5576	24,7	0,4
	670	5400	23,6	0,4

Тубулин, выделенный из замороженной ткани, представлял собой гетерогенный препарат (рис. 1, б), при этом выход белка был в 17—25 раз ниже, чем из свежей ткани (таблица).

Следовательно, выделение тубулина возможно проводить только из свежей ткани, полученной через 1,5—3 ч после забоя животного.

Электронномикроскопические исследования подтвердили, что полученный в процессе полимеризации препарат состоит из структур, характерных для микротрубочек (рис. 2).

Выделенный препарат тубулина связывается с колхицином, причем уровень колхицинсвязывающей активности полученного белка согласуется с данными, приводимыми в работе Sherline и соавт. [2] (рис. 3).

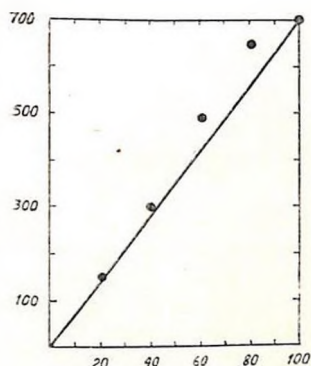


Рис. 3. Зависимость связывания колхицина от концентрации тубулина мозга быка. Концентрация тубулина 7 мг/мл принята за 100%

Таким образом, нами был выделен тубулин, обладающий колхицинсвязывающей активностью и имеющий характерную для данного белка величину M_r .

Для исследования антигенной активности нативного и модифицированного тубулина проводили иммунизацию кроликов нативным препаратом тубулина, очищенным на фосфоцеллюлозе (НТ); конъюгатом его с БСА (НТ-БСА), а также тубулином, денатурированным ДДС-На и элюированным из геля после электрофореза (ДТ). Специфичность антисывороток оценивали в тесте двойной иммунодиффузии в агаровом геле. Антисыворотки тестировали двумя видами препаратов тубулина—НТ и ДТ.

Показано, что при иммунизации препаратами НТ антитела не вырабатывались (рис. 4, а).

Антисыворотки, полученные против конъюгата (НТ-БСА), после предварительной абсорбции БСА в реакции преципитации с НТ давали одну зону, при этом титр в реакции двойной иммунодиффузии был в пределах 1/32—1/64 при исходной концентрации тубулина 8 мг/мл. Полученная специфическая антисыворотка к тубулину реагировала как с НТ, так и с ДТ, давая при этом реакцию идентичности между этими белками (рис. 4, б). Это указывает на то, что во-первых, антисыворотка направлена только к тубулину, и, во-вторых, обработка ДДС-На не изменяет антигенную детерминанту тубулина.

Антисыворотки, полученные к препарату ДТ в реакции двойной иммунодиффузии, давали тоже одну зону преципитации с НТ и ДТ, однако титр этих антител был невысок (1/2—1/4) при концентрации тубулина 8 мг/мл. При дальнейших циклах иммунизации титр антител увеличивался незначительно.

Так как при иммунизации НТ были получены отрицательные результаты, то, следовательно, он обладает низкой иммуногенностью, что согласуется с данными литературы [5—7].

Полученные результаты позволяют заключить, что оба используемых нами метода—конъюгирование с БСА и денатурация ДДС-На—повышают антигенную активность тубулина. В обоих случаях были получены моноспецифические антисыворотки, реагировавшие также с НТ, что указывает на сохранение нативности антигенных детерминант тубулина в модифицированных препаратах. Анализ полученных

антисывороток показал, что конъюгирование тубулина с БСА в большей степени усиливает антигенные свойства, чем его денатурация. Таким образом, для получения моноспецифической антисыворотки необходимо более эффективно проводить иммунизацию кроликов конъюгатом тубулина с БСА.

ANTIGENIC PROPERTIES OF TUBULIN ISOLATED FROM NERVOUS TISSUE

ANDROSOVA L. V., BURBAEVA G. Sh.

All-Union Research Center of Mental Health, USSR Academy of Medical
Sciences, Moscow

3 kinds of tubulin samples from bovine brain were used for raising antiserum: 1) tubulin, purified by means of polymerization-depolymerization and further separated from microtubule-associated proteins by chromatography on phosphocellulose (sample I); 2) a conjugate of sample I with BSA; 3) tubulin, eluted from PAG after electrophoresis of the sample I, in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS).

The specificity and titer of antiserum was tested in the reaction of double immunodiffusion. Identity reaction between the native and denaturated tubulin indicated that SDS treatment didn't change the antigen determinants of the protein. Antitubulin specific antibodies were detected in the antiserum against conjugate and denaturated protein, the titer of the anticonjugate antiserum being higher.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Shelanski M. L., Gaskin F., Cantor C. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 70, № 3, p. 763—768, 1973.
2. Sherline P., Bodwin C. K., Kipnis D. M. Anal. Biochem., v. 62, p. 400—407, 1974.
3. Barnes L. D., Roberson G. M. Arch. Biochem. and Biophys., v. 196, № 2, p. 511—524, 1979.
4. Ray P., Strott C. A. Biochim. et biophys. acta, v. 581, № 1, p. 79—86, 1979.
5. Anbin J. E., Subrahmanyam L., Kalnins V. I., Ling V. Proc. Nat. Acad. Sci. USA v. 73, № 4, p. 1246—1249, 1976.
6. Wiche G., Cole R. D. Exp. Cell Res., v. 99, № 1, p. 15—22, 1976.
7. Eckert B. S., Snyder J. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 75, № 1, p. 331—338, 1978.
8. Lockwood A. H. Cell, v. 13, 613—627, 1978.
9. Андреев В. Н., Сальников В. В. Цитология, т. 20, № 5, с. 581—583, 1978.
10. Shapiro A. L., Vinuela E., Maize J. V. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 28, p. 815—820, 1967.
11. Клишник Т. П., Бурбаева Г. Ш. Биохимия, т. 48, № 7, с. 1203—1208, 1983.
12. Moore B. W., Perez V. J., Genring M. J. Neurochem., v. 15, с. 265—272, 1972.
13. Игнатов С. А.—Журн. невропатол. и психиатрии, т. 1, с. 48—51, 1977.
14. Гусев А. И.—В кн.: Иммунохимический анализ (под ред. Л. А. Зильбера), с. 99—120. М., Медицина, 1968.

15. *Berkowitz S. A., Katagiri J., Binder H. K., Williams R. C.* Biochemistry, v. 16, № 25, 5610—5617, 1977.
16. *El-Hamlatwi A.—R. A.* Biochem. J., v. 169, p. 717—719, 1978.
17. *Bender P., Rebhun L. I., Benjamin D. C.* Biochim. et biophys. acta, v. 708, p. 149—159, 1982.

Поступила 28. V 1984

ИЗДАТЕЛЬСТВО «CHURCHILL LIVINGSTONE»

(Великобритания)

опубликована книга «Научные основы клинической нейрологии» (под ред. M. Swash и Ch. Kennard, 820 с. 1984 г.).

В коллективной монографии, авторами которой являются 67 представителей различных нейронаук, дается всестороннее описание нейрохимических и физиологических механизмов, относящихся к патологии центральной и периферической нервной системы.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» В 1985 г. ПРЕДЛАГАЕТ:

НИКОЛС Д. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию (пер. с англ.). М., «Мир», 1985 (1 кв.)—13 л. Тираж 8000 экз., цена 1 р. 40 к.

Книга известного английского биохимика посвящена хемиосмотической теории, создатель которой П. Митчел был удостоен в 1978 г. Нобелевской премии. Рассмотрены принципы энергетических превращений, происходящих в биологических мембранах, дана краткая характеристика клеточных структур в мембранах которых осуществляется транспорт ионов и различных биологических молекул.

Предназначена для биохимиков, биофизиков и молекулярных биологов.