

Новый инструмент для изучения малоисследованных комплексов в плазме крови человека

Научный руководитель – Тиллиб Сергей Владимирович

Нестерова Айли Андреевна

Студент (специалист)

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.

Пирогова, Москва, Россия

E-mail: ailey_nesterova@mail.ru

Введение. У представителей семейства Верблюдовых, наряду с классическими антителами, в кровотоке присутствуют неканонические антитела, что является нормой [n1]. Из их однодоменных антиген-распознающих вариабельных фрагментов получают рекомбинантные белки, известные как наноантитела (НТ). Обладая высокой специфичностью, растворимостью, стабильностью, простой наработкой, они распознают конформационные эпитопы, стерически недоступные для классических антител. В настоящее время нарастает интерес применения НТ в медицине и биотехнологии. Ранее в группе Тиллиба С.В. (Институт биологии гена Российской академии наук) был разработан метод, позволяющий поэтапно и параллельно получать НТ к различным компонентам протеома плазмы крови человека. Получая НТ, используемые как лиганды иммуносорбентов для специфического удаления узнаваемых этими НТ мажорных компонентов из плазмы крови, можно истощать плазму крови. Такая истощенная плазма может служить новой отправной точкой для генерирования следующего поколения НТ.

Цель исследования. Получение новых рекомбинантных однодоменных антител как инструментов для анализа ранее малоизученных антигенов биологических жидкостей.

Материалы и методы. Данная работа начата на этапе наработки в периплазме бактерий *E.coli* отобранных ранее НТ (1–27 и 2–16) за счет наличия в них последовательности "pelB", кодирующей сигнал периплазматической локализации [n2]. Данные НТ специфически связывают мажорные компоненты истощенной плазмы крови, которую использовали, как для иммунизации верблюда, так и в процессе селекции НТ. Полученные НТ очищали из периплазматического экстракта с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии (MXAX) на сорбенте Ni-NTA (His-Select Nickel Affinity Gel, Sigma Aldrich, США). На С-конце НТ находится линкерная последовательность из 28 аминокислот, представляющая длинный вариант шарнирного участка верблюжьего антитела. За ней следуют гемагглютинин (НА)-таг и последовательность из шести гистидинов (His)-таг, обеспечивающая очистку белка с помощью MXAX [n3]. Линкерная область включает четыре остатка лизина, служащие местом для проведения химических реакций пришивки НТ на BrCN-цефарозе и элюции по рекомендациям производителя ("GE Healthcare Life Sciences", США). С помощью белкового электрофореза в градиентном 5–19% SDS-полиакриламидном геле в восстанавливающих и в невосстанавливающих условиях проводили анализ элюированных комплексов с полученных иммуносорбентов с НТ. В качестве контроля использовали исходную плазму здорового донора. Выявляемые белковые продукты (полосы на геле) в дальнейшем будут вырезаны и затем проанализированы с помощью масс-спектрометрии.

Результаты. Получены иммуносорбенты на основе однодоменных антител, которые способны связывать малоизученные мажорные комплексы размером 120–130 кДа в плазме крови здорового человека.

Выводы. Получен новый инструмент для исследования комплексов, циркулирующих в плазме крови человека. Исследование таких мажорных и при этом малоизученных ком-

понентов крови важно для расширения фундаментальных знаний о их роли в организме, что может иметь большой потенциал для диагностики патологических процессов.

Источники и литература

- 1) Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. Annual Review of Biochemistry, 82, 775-797.
- 2) Lei, S. P., Lin, H. C., Wang, S. S., Callaway, J., & Wilcox, G. (1987). Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. Journal of Bacteriology, 169(9), 4379-4383.
- 3) Barbas, C.F. Phage display: a laboratory manual / C.F. Barbas – NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 736 pp.