

© Д.И.Князев, А.А.Бабаев, В.В.Новиков, Д.В.Новиков, 2008

## Д.И.Князев, А.А.Бабаев, В.В.Новиков, Д.В.Новиков РАЗРАБОТКА НОВОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СО- ДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИМОГО CD18 АНТИГЕНА

НИИ молекулярной биологии и региональной экологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Н.Новгород, Россия

**Аннотация:**

Авторами ведется разработка новой иммуноферментной тест-системы для определения количества растворимой формы молекулы CD18 в биологических жидкостях человека. С применением генно-инженерных технологий получен рекомбинантный стандарт для данной тест-системы.

**Ключевые слова:**

CD18, иммуноферментный анализ, генная инженерия

Патогенетические механизмы развития многих иммуноопосредованных заболеваний сопровождаются изменением сывороточной концентрации растворимых форм дифференцировочных антигенов. Дифференцировочные антигены экспрессируются на мембране клеток иммунной системы на разных этапах гемопоэза и являются маркерами различных клеточных популяций. Мембранные белки могут иметь растворимые гомологи (s-формы), которые чаще всего образуются в результате протеолитического отщепления их внеклеточной части и обнаруживаются в различных биологических жидкостях. За последние несколько лет сформировано представление о том, что растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы являются новыми маркерами состояния иммунитета, имеющими мониторинговое и прогностическое значение при многих иммуноопосредованных заболеваниях. При наличии соответствующих моноклональных антител растворимые формы могут быть выявлены с помощью иммуноферментного анализа.

CD18 -  $\beta_2$ -цепь мембранных гетеродимерных гликопротеинов, относящихся к суперсемейству интегринов. Основными представителями  $\beta_2$ -семейства являются молекулы LFA-1 и Mac-1. Эти молекулы экспрессируются на клетках лейкоцитарного происхождения и участвуют во многих иммунологических процессах организма, таких как презентация антигена, воспаление, миграция лейкоцитов по межклеточному матриксу и др.

Авторами выполнены исследования, в ходе которых было впервые показано существование в крови человека растворимой формы CD18 антигена (sCD18), образующейся за счёт протеолитического расщепления мембранной формы. Уровень sCD18 антигена является одним из маркеров состояния иммунной системы и имеет мониторинговое значение при различных заболеваниях. Показано изменение его сывороточного уровня при вирусных гепатитах, ожоговой травме, раке молочной железы. Эти исследования проводились с помощью тест-системы, основанной на полуколичественном определении уровня sCD18 антигена в сыворотке крови. Уровень растворимо-

го CD18 определяли «сэндвич» модификацией ИФА. В качестве «первых» антител, сорбируемых в лунки планшетов, использовали поликлональные антитела против моноклеарных клеток периферической крови человека. Растворимый CD18 выявляли с применением моноклональных антител ИКО-108, меченых пероксидазой хрена.

На текущем этапе авторами разрабатывается тест-система для определения абсолютного количественного содержания растворимой формы CD18 антигена в биологических жидкостях человека. Применение рекомбинантного CD18 в качестве стандарта позволит установить абсолютное количественное содержание растворимого CD18 в сыворотке крови, что может быть использовано для оценки состояния иммунной системы в норме и при различных патологиях.

Авторами был создан ряд штаммов *Pichia pastoris*, несущих в геноме фрагмент ДНК, кодирующий внеклеточный регион CD18, и продуцирующих данный полипептид в культуральную жидкость. Получение рекомбинантного аналога внеклеточного региона CD18 антигена проводилось с применением методов генной инженерии. С помощью ОТ-ПЦР была получена комплементарная ДНК (кДНК) последовательности, кодирующей внеклеточный регион CD18. Матрицей для синтеза кДНК послужила мРНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови человека. Далее, полученный фрагмент лигировали с плазмидой pPICZαB по сайтам XhoI-XbaI. Рекомбинантным вектором pPICZαB/CD18 трансформировали штамм дрожжей X-33 *Pichia pastoris*. В культуральной жидкости после выращивания и индукции анализировали спектр белков методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Полученные результаты показали, что в культуральной среде штамма X-33/CD18 появляется дополнительный белок с молекулярной массой около 84 кДа.

Дальнейшие исследования будут направлены на очистку рекомбинантного белка и разработку тест-системы для определения количественного содержания растворимого CD18 антигена, что является важной составляющей в оценке состояния иммунной системы в норме и при различных патологиях.

**Contact Information:**

Д-р Князев Дмитрий Игоревич  
E-Mail: Dmitry-Kn@yandex.ru

D.I.Knyazev, A.A.Babaev, V.V.Novikov, D.V.Novikov

**THE CONSTRUCTION OF NOVEL TEST-SYSTEM FOR DETECTION OF SOLUBLE CD18**

Molecular Biology and Regional Ecology Research Institute N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University,  
N.Novgorod, Russia

**Abstract:**

Novel immune-enzyme assay system for quantification of soluble CD18 in human biological fluids is being constructed. Recombinant standard for this immune-enzyme assay system has been obtained by means of genetic engineering.

**Key words:**

CD18, immune-enzyme assay, genetic engineering