

Результаты проведенных опытов по изучению динамики идиотипических антител при различных схемах иммунизации лабораторных животных антигенами из пироплазм лошади приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Динамика антител – идиотипов к *P.caballi* при различных схемах иммунизации лабораторных животных

| Схема иммунизации | Дни исследований после иммунизации | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|
| | титр антител – идиотипов, мкг/мл | | | | | | | | | |
| | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 | 30 |
| Fey et al. | 61 | 88 | 253 | 275 | 254 | 151 | 124 | 82 | 59 | 21 |
| Г.Фримеля | 41 | 58 | 228 | 244 | 211 | 96 | 73 | 31 | 11 | 9 |
| Сафронова | 38 | 60 | 108 | 125 | 139 | 83 | 61 | 35 | 11 | 7 |

Из таблицы 1 видно, что при иммунизации лабораторных животных антигеном из *P.caballi* по методу Fey et al. получен наивысший титр антител 1-го порядка, т.е. идиотипов, который достигал к 12 - 15 дню после последней иммунизации 275 – 254 мкг/мл с постепенным равномерным снижением к 21 – 24 дню после иммунизации до 124 – 82 мкг/мл и к концу наблюдений, т.е. к 27 – 30 дню после последней инъекции антигена снижался до 59 – 21 мкг/мл.

При иммунизации лабораторных животных антигеном из *P.caballi* по методу Г. Фримеля титры антител были достаточно высокими, практически такими же, что и при иммунизации по методу Fey et al. Так наивысший титр антител 1-го порядка, т.е. идиотипов при данной схеме иммунизации составил к 12 – 15 дню после иммунизации 244 – 211 мкг/мл также с относительно равномерным снижением, практически вдвое к 21 – 24 дню после иммунизации до 73 – 31 мкг/мл и к концу исследований, т.е. к 27 – 30 дню после последней инъекции антигена отмечали резкое снижение титра антител до 11 – 9 мкг/мл.

Схема иммунизации лабораторных животных антигеном из *P.caballi* по Сафронову давала относительно невысокие титры антител, ниже, чем при иммунизации по Fey et al. в 1,5 – 1,8 раза и составила к 12 – 15 дню показатели в пределах 125 – 139 мкг/мл. И хотя, титры антител в данной схеме были относительно высоки, в дальнейших исследованиях при наработке антител 2-го порядка, т.е. антиидиотипов к возбудителю пироплазмоза лошадей данная схема нами также не использовалась.

Результаты проведенных опытов по изучению динамики идиотипических антител при различных схемах иммунизации лабораторных животных антигенами из нутталей лошади приведены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что при иммунизации лабораторных животных антигеном из *N.egui* по методу Fey et al. получен наивысший титр антител 1-го порядка, т.е. идиотипов, который достигал к 12 - 15 дню после последней иммунизации 291 – 295 мкг/мл с постепенным равномерным снижением к 21 – 24 дню после иммунизации до 118 – 91 мкг/мл и к концу наблюдений, т.е. к 27 – 30 дню после последней инъекции антигена держался относительно стойко, снижался лишь до 62 – 34 мкг/мл.

Таблица 2 - Динамика антител – идиотипов к *N.egui* при различных схемах иммунизации лабораторных животных

| Схема иммунизации | Дни исследований после иммунизации | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|
| | титр антител – идиотипов, мкг/мл | | | | | | | | | |
| | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 | 30 |
| Fey et al. | 62 | 119 | 285 | 291 | 295 | 191 | 118 | 91 | 62 | 34 |
| Г.Фримеля | 41 | 59 | 258 | 211 | 209 | 157 | 69 | 41 | 28 | 12 |
| Сафронова | 42 | 68 | 81 | 121 | 149 | 81 | 75 | 63 | 38 | 11 |

При иммунизации лабораторных животных антигеном из *N.egui* по методу Г. Фримеля титры антител были достаточно высокими, практически такими же, что и при иммунизации по методу Fey et al. Так наивысший титр антител 1-го порядка, т.е. идиотипов при данной схеме иммунизации составил к 12 – 15 дню после иммунизации 211 – 209 мкг/мл также с относительно равномерным снижением, практически в полтора или вдвое к 21 – 24 дню после иммунизации до 69 – 41 мкг/мл и к концу исследований, т.е. к 27 – 30 дню после последней инъекции антигена отмечали резкое снижение титра антител до 28 – 12 мкг/мл.

Схема иммунизации лабораторных животных антигеном из *N.egui* по Сафронову давала относительно невысокие титры антител, ниже, чем при иммунизации по Fey et al. в 1,6 – 1,9 раз и составила к 12 – 15 дню показатели в пределах 121 – 149 мкг/мл. И хотя, титры антител в данной схеме были относительно высоки, держались более длительное время на достаточно высоком уровне в дальнейших исследованиях при наработке антител 2-го порядка, т.е. антиидиотипов к возбудителю нутталеза лошадей данная схема нами также не использовалась.

Таким образом, при анализе полученных результатов видно, что в целом на исследованных паразитологических моделях, использованных для иммунизации антигенами из кровепаразитов лошадей с целью наработки антител 1-го порядка, т.е. идиотипических антител, наблюдается одна общая тенденция.

При разных схемах иммунизации лабораторных животных соответствующими специфическими антигенами отмечено, что из трех схем иммунизации лабораторных животных иммунизация по методу Fey et al. к 9 – 18 дню давала наивысшие титры антител, которые были в пределах 254 – 275 мкг/мл к возбудителю пироплазмоза лошадей и 291 – 295 мкг/мл к возбудителю нутталлиоза лошадей. Причем во всех случаях отмечена относительная стабильность титра антител на протяжении 9 – 12 дней, т.е. на 9 – 18 дни после иммунизации с последующим плавным снижением титров антител до минимальных, количество которых колебалось в пределах 15 – 5 мкг/мл.

Схема иммунизации лабораторных животных по методу Г.Фримеля также давала достаточно высокие титры антител к 9 – 12 дню, которые были в пределах 228 – 244 мкг/мл к возбудителю пироплазмоза лошадей и 258 – 211 мкг/мл к возбудителю нутталлиоза лошадей. Причем практически во всех случаях наблюдалось резкое снижение титров антител с 15 – 18 дня после последней инъекции антигена, что не оставляло возможности для более длительного сбора материала от иммунизированных животных-продуцентов идиотипов.

Схема иммунизации по А.М.Сафронову во всех случаях давала низкие титры антител, примерно в 2 – 2,5 раза ниже, чем при двух других иммунизациях, отмечено, что максимальные титры антител также регистрируются к 9 – 15 дню во всех случаях, но по сравнению с двумя предыдущими схемами иммунизации показатели значительно ниже. Так, эти показатели были в пределах 125 – 139 мкг/мл к возбудителю пироплазмоза лошадей и 121 – 149 мкг/мл к возбудителю нутталлиоза лошадей. Причем практически во всех случаях, также как при иммунизации по Г.Фримелю наблюдалось резкое снижение титров антител с 15 – 18 дня после последней инъекции антигена, почти вдвое или втрое, что не оставляло возможности для более длительного сбора материала от иммунизированных животных.

Таким образом, на основании проведенных исследований считаем, что для наработки идиотипических антител против пироплазм и нутталлий лошадей следует рекомендовать иммунизацию лабораторных животных – кроликов по методам Fey et al. или Г. Фримеля.

Литература

1. Ройт А. Основы иммунологии. - М., 1991. - С.140 - 145.
2. Косицкая Л.С., Софронов Б.Н., Бичурина М.А., Брянцева Е.А., Розаева Н.Р. Индукция иммунного ответа к антигенам вируса гриппа антиидиотипическими антителами //Микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. - 1995. - Вып. 1. - С.40 - 44.
3. Патент 2000112397/14 РФ. Способ получения антиэмбриональной антиидиотипической сыворотки/Пантелеев Д.Ю., Шейн Ю.Т.
4. Francotte M., Urban J. Induction of antitobacco mosaic virus antibodies in raice by rabbit antilidiotypic antibodies. - J. Exp. Med. - 1984. - V.160. - P.1485 - 1494.
5. Celis S., Chand T.Y. Antibodies to hepatitis Bsurface antigen potentiate the response of human T - lymphocyte clones to the same antigen //Saence. - 1934. - Vol. 224. - P.297 - 299.
6. Фрейдлин Н.С. Роль антиидиотипических антител в индукции и протекании разных форм иммунного ответа //отчет НИИ эксперим. медицины, РАМН. - М., 1993. - 46 с.
7. Жангельдин Т.Б., Росляков А.А., Миловидова Ф.А. Иммунологические характеристики рабических антиидиотипических антител //Актуальные проблемы вирусологии. - Алматы, 1994. - С.78.
8. Патент 7А 61К 39/395. Антиидиотипическое моноклональное антитело, которое индуцирует иммунный ответ против ганглиозида GD, и продуцирующая это антитело гибридома/Charpman Paul B., Houghton Alan N. - Sloan - Kettering Institute For Cancer Research., 2003.
9. Матвеева Н.А., Квашин В.П. Антиидиотипические антитела, которые индуцируют иммунный ответ против рецептора эпидермального фактора роста //Мерк Патент ГмбХ (DE), 1998.
10. Шенжанов К.Т. Разработка методов диагностики бруцеллеза животных на основе использования антиидиотипических антител //отчет НИР, - Алматы, 1997. - 17 с.
11. Азизов Р.Г. Иммунофармакологическое исследование нейроиммунных взаимодействий: дисс. ...докт. биол. наук. - М., 1997. - 250 с.
12. Литвинов В.И., Авдиенко В.Г., Кондрашов С.Ю. Антиидиотипическая регуляция противотуберкулезного иммунитета //отчет НИР, Москва, 1997. - 57 с.
13. Баркова Е.П., Нагиев Ф.Г. Моноклональные антиидиотипические антитела, имитирующие биологические эффекты человеческих интерферонов типа гамма: получение, характеристика, использование //отчет НИР НИИВП РАМН, 1997. - 14 с.
14. Протопопова Е.В. Поиск и выделение клеточного рецептора для вируса клещевого энцефалита при помощи антиидиотипических антител: дисс. ...канд. биол. наук. - Новосибирск, 1998. - 223 с.
15. Патент US 6461612 ВВ. Inttipe Research. Ltd. Антиидиотипическое антитело и его применение в диагностике и терапии болезни, относящейся к ВИЧ /Meuller Sybille, Wang Haitao.
16. Предпатент 15693 РСФСР. Способ получения антиидиотипических антител к альфа - фетопротейну/Францев А.П., Францева И.А.
17. Новак М.Д. Сравнительная морфобиологическая и иммунологическая характеристика цистообразующих кокцидий родов Sarcocystis и Toxoplasma: дисс. докт. вет. наук. - С.Петербург, 1995. - 438с.
18. Еспанов Ж.У. Иммунобиологические особенности оводов лошадей, иммунодиагностика и феномен антиидиотипии при гастрофилезе и ринэстрозе: дисс. ...канд. биол. наук. - М., 1996. - 116 с.

19. Кусаинов Д.Х. Иммунодиагностика трипаносомоза сельскохозяйственных животных и меры борьбы с ним в республике Казахстан: дисс. ...канд. вет. наук. - Алматы, 1997. - 96 с.
20. Fey M., Pfietter H., Messerli I., Sturzenegger N., Crolimud F. *Methods of Isolation, Purification and Quantitation of Bovine Immunoglobulins.*//*Ibl.Vet.Med.*- 1976.-23.- P. 269-300.
21. Фримель Г. Иммунологические методы. – 1987. С. 56-57.
22. Фримель Г. Иммунологические методы. – 1987. С. 87-88.
23. Avrameas S., Ternynck T. *Biologically active water - usolybls protein polymers. Their use for isolation of antigens and antibodies* //*J. Biol. Chem.*, - 1969. - 242. - P.1651.
24. Маянский А.Н., Кравцова О.Я., Молчанова И.В. К методике приготовления иммуносорбента с фиксированными антителами на основе полиакриламидного геля.//*Лабораторное дело.* 1976.- № 3.
25. Heidelberger M. *The molecular composition of specific immune precipitation from rabbit sera.*//*J.Amer.Chem.Sac.*-1938.-60.-P.242-244.
26. Voller A., Huld G., Thors G., Bogvall P. *Enzyme immunosorbent assay for parasitic diseases. Trans - actions of the loyal society of tropical Medicine and Hygiene.* - 1976. 70. - P.93 - 106.

Тұжырым

Мақалада зертханалық жануарларды жылқы пироплазмидтардан, яғни пироплазмалар және нутталиялардан жасалған антигенімен иммунизациялау әдістері салыстырмалы түрде зерттелген. Ең жоғары нәтиже берген Fey et al. (1976) ұсынған әдісі боп табылды.

Салыстырмалы түрде пироплазмалар мен нутталияларға қарсы түзелген антиденешіктердың динамикасы келтірілген.

Summary

Material are presented In article on lifelength of the schemes to immunizations laboratory animal корпускулярным by antigen, prepared from invasio of piroplasma and nuttalia shelters horses to achieve the idiotaips an antibody i.e. first-order antibody (AT1). It Is Shown that at immunizations laboratory animal from three used schemes best results are received at immunizations on method Fey et al. (1976).

Track record idiotaips antibody is presented In comparative aspect against piroplasma and nuttalia at miscellaneous scheme to immunizations.

**Настоящая публикация сделана в рамках подпроекта, финансируемого в рамках СКГ, поддерживаемого Всемирным банком и Правительством РК. Заявления автора могут не отражать официальной позиции Всемирного банка и Правительства РК.*

УДК 581.524

¹Ережепов Д.А., ¹Богуспаев К.К., ²Искаков Б.К., ³Хеберле-Борс Э.

ТРАНСФОРМАЦИЯ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕН β-ГЛЮКУРОНИДАЗЫ И РАЗЛИЧНЫЕ ЭНХАНСЕРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ В *Arabidopsis thaliana*

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби НИИ проблем биологии и биотехнологии, ²Институт молекулярной биологии им. М.А. Айтхожина МОН РК, ³Венский университет, Австрия)

*В работе представлены результаты по созданию конструкций, содержащих репортерный ген β-глюкуро니다зы (GUS), вирусные и синтетические энхансерные элементы и промотор вируса цветной капусты и их трансформация в растения *A. thaliana**

Растительные мРНК являются моноцистронными, содержат 5'- и 3'-нетранслируемые районы и кодирующую область. Все исследованные клеточные мРНК растений, как правило, содержат кэп-структуру, представляющую собой инвертированный на 5'-конце 7-метилгуанозинтрифосфат m⁷G(5')ppp(5')N, и большинство мРНК имеют поли(А)-последовательность на 3'-конце мРНК. Однако были найдены кэп-независимые и единичные модели кэп-зависимой инициации трансляции (шунтинг) некоторых мРНК растительных вирусов /1,2/.

мРНК большинства растительных вирусов транслируются эффективней по сравнению с мРНК растения хозяина. Этот феномен описан как цис-действующие энхансеры трансляции в 5'-лидере. 68 нуклеотидный "Ω" лидер вируса табачной мозаики и 36 нуклеотидный лидер вирус мозаики люцерны были первыми, которые были исследованы в качестве трансляционных энхансеров. Некоторые мРНК растительных вирусов как вирус шероховатости табака (TEV), Y вирус картофеля (PVY), вирус мозаики турнепса и другие не имеют кэп-структуры, но эффективно транслируются /3/.

Было доказано, что таким механизмом усиления трансляции является образование комплементарных связей между энхансерными последовательностями (ЭП) и участками рРНК. Эта гипотеза была развита Мауро В. и сотрудниками, которые показали, что многие "сильные" мРНК имеют участки, высококомплементарные к некоторым регионам 18S рРНК, и что помещение этих участков в "слабые" мРНК повышало уровень трансляции

последних *in vitro* и *in vivo*. Было доказано, что участок во внутреннем регионе 18S рРНК, к которому высококомплементарны некоторые вирусные ЭП, играет важную роль в инициации и эффективности трансляции. Этот район 18S рРНК (с 1105 до 1124 н.), по-видимому, слабо экранирован рибосомными белками и петлями рРНК, так как было показано, что антисмысловые к этому району олигонуклеотиды беспрепятственно с ним связываются /4/. К тому же это не противоречит данным по строению декодирующего центра рибосомы. При помещении перед репортерным геном β-глюкуронидазы (GUS) последовательности, комплементарной к данному региону 18S рРНК, то экспрессия репортерного гена увеличивалась десяти-двадцати кратно /5/.

Целью данной работы была создание ДНК-конструкций, содержащих трансляционные энхансеры и их трансформация в растения *Arabidopsis thaliana*.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили вирусные и синтетические трансляционные энхансеры, 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты, репортерный ген *GUS*. Конструкции были созданы на основе плазмиды pI-GUS, любезно предоставленные Галли. Первая конструкция 115x3-GUS-TMV была ранее получена с помощью вставки в плазмиду pI-GUS по рестрикционным сайтам *HindIII* и *NcoI* ДНК фрагмента, который содержит трехкратный повтор 10 нуклеотидной последовательности повторяющий внутренний район 18S рРНК растений с 1115 по 1124 нуклеотид. Вторая конструкция PVY-GUS-TMV была получена с помощью вставки по тем же сайтам рестрикции 5'-нетранслируемой последовательности (5'-НТП) Y-вируса картофеля /6/.

Для соответствия мРНК растительным, по сайтам *NdeI* и *EcoRI* в данную конструкцию был добавлен терминатор нопаин синтазы (*NOS terminator*), ответственный за сигнал полиаденилирования.

В качестве контроля нами была создана дополнительная конструкция, не содержащая трансляционных энхансеров (35S-GUS-NOS-pC). Затем данные конструкции были клонированы в бинарную плазмиду pCAMBIA 2300, содержащую 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты, обеспечивающий высокую экспрессию гена во всех органах растения. Проверка плазмид осуществлялась методом рестрикционного анализа и секвенированием. Плазмиды 35S-115x3-GUS-TMV-NOS-pC, 35S-PVY-GUS-TMV-NOS-pC и 35S-GUS-NOS-pC были трансформированы в клетки *Agrobacterium tumefaciens* (штамм *AgI*) методом электропорации в 2мм кюветах при сопротивлении 200 Ом, ёмкости 25мкФ, напряжении 1,25 кВ/см /7/. Затем конструкции в растения *Arabidopsis thaliana* были трансформированы с помощью метода «*Floral Dip*» /8/.

Результаты и их обсуждение

Известно, что центральный район 18S РНК растений слабо экранирован и является ключевым фактором в эффективности трансляции. Было доказано, что лидерная последовательность Y-вируса картофеля усиливает трансляцию мРНК, в составе которой она находится в несколько раз и ее активность не меняется даже в условиях высокой температуры. В обычных физиологических условиях 5'-лидер Y-вируса картофеля повышает уровень трансляции примерно в 10 раз. Но в условиях инкубации при 37⁰С трансляция мРНК Y-GUS практически не изменилась, когда трансляция полилинкерной мРНК практически полностью ингибировалась. Было доказано, что район 18S рРНК (с 1105 до 1124 н.) очень важен в установлении связи с 40S рибосомной субчастицей /5/. Так же были сделаны исследования по энхансерной активности децинуклеотидных последовательностей, повторяющих центральный район 18S рРНК (с 1073 до 1134 нуклеотида). Последовательность, повторяющая район 18S рРНК растений с 1115 до 1124 нуклеотид (*ARC-1*) тоже является трансляционным энхансером. Кроме того, при увеличении количества копий данной последовательности, активность трансляции так же возрастает /5/.

Первая конструкция 5'-конце содержала природную 5'-НТП Y-вируса картофеля длиной в 184 нуклеотида (PVY-GUS-TMV):

HindIII

T7-promoter>GGCCTAAGCTT-

ААТТААААСААСТСААТАСААСАТААГАААААСААСГСАААААСАСТСАТААААСГСТСАТТСТСАСТСААГСААСТТГСТААГТТТСАГТТТАААТСАТТТСТТГСААТТТСТТАГААСААТАТТГГАААССАТТТСААСТСААСААГСААТТТСАТСАСТТССААССААТТТСАГАТССАСС АТГГСАГУSTGA-3'-UTR GUS (43b)-

NcoI

GAAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACC-TMV 3'UTR (247 п.о.)-CCATATG-GAATTC

Sall XbaI BamHI XmaI KpnI

NdeI EcoRI

Вторая конструкция в 5'-лидере содержала трехкратный повтор децинуклеотида (3xARC-1), повторяющего центральный район 18S рРНК растений с 1115 по 1124 нуклеотид (115x3-GUS-TMV):

HindIII

T7-promoter>GGCCTAAGCTT-

АСАААТАСТСССССАСАСАГСТТАСАААТАСТСССССАСААСАГСТТАСААТАСТСССССАСААСАГСТТГТССААСТТГСТААГТТТСАГТТТАААТСАТТТСТТГСААТТТСТТАГААСААТАТТГГАААССАТТТСААСТСААСААГСААТТТСАТСАСТТССААССААТТТСАГАТССАСС АТГГСАГУSTGA-3'-UTR GUS (43b)-

NcoI

GAAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACC-TMV 3'UTR (247 п.о.)-CCATATG-GAATTC

Sall XbaI BamHI XmaI KpnI

NdeI EcoRI