



УДК 577.152.271.083.3

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К $\alpha$ -СУБЪЕДИНИЦЕ ГИПОТЕТИЧЕСКОЙ $H^+, K^+$ -АТФ-АЗЫ ЧЕЛОВЕКА, КОДИРУЕМОЙ ГЕНОМ *atp1all*

© 1997 г. Т. В. Корнеенко, Н. Б. Пестов, М. В. Егоров,  
М. В. Иванова, М. Б. Костина, М. И. Шахпаронов\*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 02.12.96 г. Принята к печати 25.03.97 г.

N-Концевой фрагмент белка АТР1А1 – предполагаемой каталитической субъединицы убаинчувствительной  $H^+, K^+$ -АТФ-азы человека – синтезирован в *E. coli* в виде двух рекомбинантных белков: фрагмента Ser<sup>14</sup>–Phe<sup>104</sup> и этого же фрагмента, содержащего в N-концевой области последовательность His<sub>6</sub>. С использованием очищенного металлоаффинной хроматографией белка в качестве антигена созданы две гибридомные линии, продуцирующие антитела класса IgM. Показано, что эти моноклональные антитела специфически распознают не только исходный антиген, но и полноразмерный рекомбинантный белок АТР1А1 и не реагируют с  $Na^+, K^+$ -АТФ-азой.

**Ключевые слова:**  $H^+, K^+$ -АТФ-аза, АТР1А1, гибридома, ИФА, моноклональные антитела, ПЦР, убаин, эпитоп.

Среди различных ионтранспортирующих АТФ-аз Р-типа (образующих фосфорилированный интермедиат в ходе рабочего цикла) можно выделить  $K^+$ -зависимые АТФ-азы ( $H^+, K^+$ -АТФ-азы, КФ 2.7.1). Эти мембранные белки являются гетеродимерами и состоят из каталитической  $\alpha$ -субъединицы и сильно гликозилированной  $\beta$ -субъединицы. По своим структурным и функциональным свойствам внутри семейства  $K^+$ -зависимых АТФ-аз выделяют три группы белков: несколько изоформ  $Na^+, K^+$ -АТФ-азы, универсального компонента плазматических мембран высших эукариот [1],  $H^+, K^+$ -АТФ-азу слизистой желудка [2] и группу  $H^+, K^+$ -АТФ-аз так называемого нежелудочного типа [2].

Каталитические субъединицы  $H^+, K^+$ -АТФ-аз человека кодируются семейством родственных генов [3]. Функциональный статус одного из членов этого семейства – гена *atp1all* – долгое время оставался под вопросом. К настоящему времени определена полная нуклеотидная последовательность кДНК *atp1all* [4], а также экзон-интронное строение гена [5].

Предполагаемый продукт гена *atp1all*, белок АТР1А1, последовательность которого выведена из структуры кДНК, состоит из 1039 а. о. и содержит структурные мотивы, характерные для  $H^+, K^+$ -АТФ-аз [4]. Результаты сравнительного

анализа последовательностей  $K^+$ -зависимых АТФ-аз позволили предположить, что белок, кодируемый геном *atp1all*, относится к третьей группе семейства  $H^+, K^+$ -АТФ-аз, отличной от  $Na^+, K^+$ -АТФ-аз и  $H^+, K^+$ -АТФ-азы слизистой желудка, поскольку гомологичен с ними всего на 63–64% [4]. В третью группу  $H^+, K^+$ -АТФ-аз включают также гипотетическую  $H^+, K^+$ -АТФ-азу дистального отдела толстого кишечника крысы [6] (86% гомологии с белком АТР1А1) и  $H^+, K^+$ -АТФ-азу мочевого пузыря лягушки *Bufo marinus* (75% гомологии) [7].

Существование  $\beta$ -субъединицы, ассоциированной с соответствующими  $\alpha$ -субъединицами  $K^+$ -зависимых АТФ-аз этой группы, подтверждено только для  $H^+, K^+$ -АТФ-азы лягушки [8]. Функциональная экспрессия гена *atp1all* осуществлена совместно с геном  $\beta$ -субъединицы желудочной  $H^+, K^+$ -АТФ-азы (gH, K $\beta$ ) кролика в ооцитах *Xenopus laevis* [9] и в культивируемой клеточной линии млекопитающих НЕК 293 [10]. Данные по измерению связывания <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (заменитель ионов  $K^+$ ) позволили сделать вывод, что комплекс АТР1А1–gH, K $\beta$  действительно является  $K^+$ -зависимой АТФ-азой, причем параметры его чувствительности и к убаину (специфическому ингибитору  $Na^+, K^+$ -АТФ-аз), и к SCH 28080 (специфическому ингибитору желудочной  $H^+, K^+$ -АТФ-азы) имели промежуточные значения между величинами, известными для  $Na^+, K^+$ -АТФ-азы и желудочной  $H^+, K^+$ -АТФ-азы [9, 10]. На основании результатов по измерению внутриклеточного рН был сделан вывод, что исследуемый белок транс-

Сокращения: МА – моноклональные антитела; PBS – фосфатно-солевой буфер, рН 7.4; PBST – PBS + твин-20 (10 г/л), TNF – фактор некроза опухолей.

\* Автор для переписки.

портирует также и протон [9, 10]. Однако стехиометрия транспорта  $K^+$  и  $H^+$  была оценена как 10/1, а кроме того, поглощение  $Rb^+$  не стимулировалось острым понижением внутриклеточного pH [10]. Поэтому не исключается возможность транспорта этим насосом и других катионов (не только протона) в обмен на  $K^+$ . Таким образом, в настоящее время принято считать, что белок ATP1A1 является  $\alpha$ -субъединицей убаинчувствительной  $H^+, K^+$ -АТФ-азы.

На уровне мРНК установлено, что *atplall* экспрессируется в коже, мозге и почках человека [4]. Работы по регуляции экспрессии мРНК  $H^+, K^+$ -АТФ-аз Р-типа в почках и толстом кишечнике при хронической гипокалиемии [11, 12] и в условиях изменения кортикостероидного статуса [12] свидетельствуют о важной физиологической роли  $H^+, K^+$ -АТФ-азы в поддержании гомеостаза ионов  $K^+$ . Однако на сегодняшний день предполагаемая  $H^+, K^+$ -АТФ-аза – белковый продукт гена *atplall* – не обнаружена *in vivo*, не идентифицирована ее подлинная  $\beta$ -субъединица, и физиологическая функция этого белка остается неясной.

Удобным инструментом детекции и выделения гипотетических белков, в том числе и ATP1A1, могут стать специфические антитела. Основной целью нашей работы являлось получение МА, специфичных к гипотетическому белку ATP1A1. В качестве антигена был выбран фрагмент Ser<sup>14</sup>-Leu<sup>104</sup> этого белка, который имеет низкий уровень гомологии с другими АТФ-азами Р-типа [4]. Соответствующий участок кДНК амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали по сайтам *Bam*HI/*Hind*III вектора рQE30 под контроль модифицированного промотора фага Т5 [13], в результате чего была получена конструкция рН30, обеспечивающая синтез целевого фрагмента белка с последовательностью His<sub>6</sub> в N-концевой области. Затем вставка из плазмиды рН30 была субклонирована в вектор рQE16 по сайтам *Bam*HI/*Hind*III для получения белкового продукта без дополнительных остатков гистидина (конструкция рTL16/1). Выведенные N- и C-концевые аминокислотные последовательности полученных белков представлены в таблице. На рис. 1 показаны результаты электрофоретического анализа лизатов клеток *E. coli* SG13009[pREP4], содержащих конструкции рН30 и рTL16/1, до и после индукции экспрессии, а также очищенного при помощи металлоаффинной хроматографии в денатурирующих условиях белкового продукта, кодируемого рН30.

Очищенный рекомбинантный белок имеет молекулярную массу около 14 кДа и *pI* около 9.0, что соответствует теоретически рассчитанным величинам. Выход очищенного белка составил 20 мг на 1 л культуры, причем на электрофореграмме не заметно примесей бактериальных белков (на рис. 1 видна слабая полоса около 28 кДа, которая также принадлежит продукту экспрессии, поскольку в

Выведенные N- и C-концевые аминокислотные последовательности синтезированных рекомбинантных белков. Курсивом показаны аминокислотные остатки, кодируемые ДНК вектора

Плазмида	Аминокислотная последовательность*
рН30	<i>MRGSHHHHHHGSSG</i> TKDIVKTD(....)TPEIKLN
рTL16/1	<i>MRGSSG</i> TKDIVKTD(....)TPEIKLN

\* Подчеркнут участок, последовательность которого подтверждена N-концевым секвенированием.

иммуноблоттинге реагирует с поликлональными антителами к фрагменту Ser<sup>14</sup>-Leu<sup>39</sup> [10]). Важно отметить, что после денатурации в 6 М гидрохлориде гуанидина и диализа против PBS белок не выпадает в осадок в отличие от многих других рекомбинантных белков. Очищенный продукт, кодируемый плазмидой рTL16/1, был подвергнут N-концевому секвенированию, и полученная последовательность MRGSSGTKDI полностью совпала с выведенной из ДНК.

Очищенный металлоаффинной хроматографией белок использовали в качестве антигена для иммунизации мышей и скрининга гибридомных клонов. Были получены две стабильные гибридомные линии – 2Н11 и 1А3, продуцирующие антитела класса IgM, которые взаимодействуют с исходным антигеном.

Полученные МА реагируют в ИФА (рис. 2) с исходным антигеном, лизатом клеток *E. coli*, содержащим белковый продукт, кодируемый рTL16/1, препаратом мембран клеток Sf-9, продуцирующих полноразмерный рекомбинантный белок ATP1A1\*, но не взаимодействуют с Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-азой, не реагируют с химерным белком, состоящим из TNF и фрагмента Ser<sup>14</sup>-Leu<sup>39</sup> (плазмида рТНУ230 [10]), и с контрольным белком, содержащим последовательность His<sub>6</sub> в N-концевой области [14].

Таким образом, получены МА, специфически распознающие белок ATP1A1. Специфичность этих МА и кроличьих поликлональных антител в целом примерно одинакова, однако МА имеют заметную кроссреактивность с неизвестным компонентом мембран клеток Sf-9 (рис. 2, Sf-9 – контроль).

Далее нами были предприняты попытки использовать полученные антитела для детекции белка в иммуноблоттинге. Однако только в случае продукта, кодируемого плазмидой рН30, можно было разглядеть слабую полосу и никогда – для белка без последовательности His<sub>6</sub>, кодируемого плазмидой рTL16/1 (результаты не представлены). Поскольку в ИФА на полистирольных планшетах, напротив, лизат клеток с плазмидой рTL16/1 дает существенно более сильный сигнал, чем лизат с плазмидой рН30 (рис. 2), можно сде-

\* Ю Чулиан, Н.Н. Модянов, А. Аскар (неопубликованные данные).



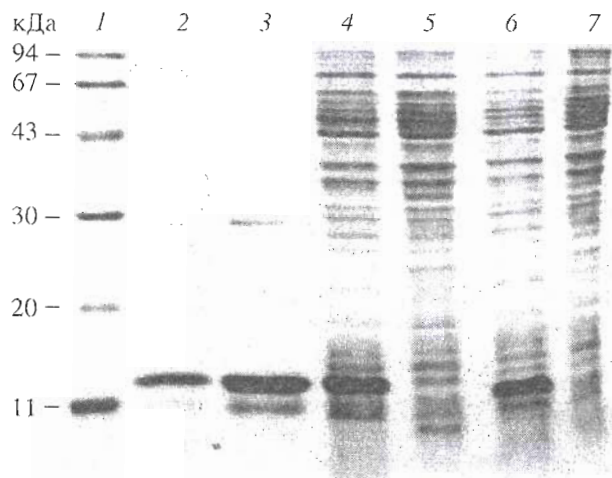


Рис. 1. Электрофореграмма в 15% ПААГ лизатов клеток *E. coli* SG13009[rREP4], содержащих плазмиды rH30 (4 – после индукции экспрессии, 5 – до индукции) и rTL16/1 (6 – после индукции, 7 – до индукции), а также препарата рекомбинантного белка, кодируемого rH30, очищенного металлоаффинной хроматографией (2, 3, с различной нагрузкой); 1 – стандарты молекулярной массы.

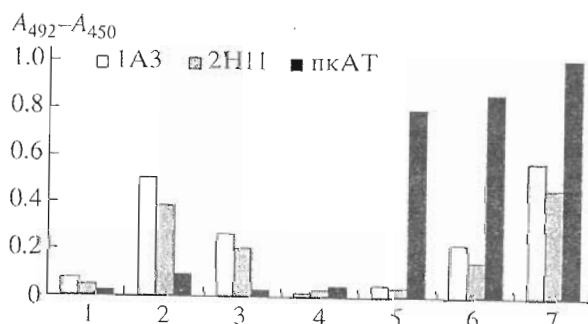


Рис. 2. Результаты ИФА моноклональных (1A3 и 2H11) и поликлональных антител (пкАТ) к фрагменту Ser<sup>14</sup>-Leu<sup>39</sup> [10] с использованием антигенов, иммобилизованных на полистирольных планшетах. В качестве антигенов использовали: 1 – Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азу, 2 – мембраны клеток Sf-9, содержащие полноразмерный рекомбинантный белок АТР1АЛ1; 3 – препарат мембран клеток Sf-9 (контроль); лизаты клеток *E. coli* SG13009[rREP4], содержащие: 4 – контрольный белок с последовательностью His<sub>6</sub> в N-концевой области (продукт экспрессии фрагмента гена Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азы плазматических мембран, кодирующего C-концевую область белка); 5 – химерный белок, состоящий из TNF и фрагмента Ser<sup>14</sup>-Leu<sup>39</sup> белка АТР1АЛ1, кодируемый плазмидой rTNУ230; 6 – плазмиду rH30 (после индукции); 7 – плазмиду rTL16/1 (после индукции).

помощи алгоритма Хоппа-Вудса [15] указывает на районы Lys<sup>56</sup> и Glu<sup>77</sup> как на возможные антигенные детерминанты полученных МА.

Нам удалось получить только две гибридомы и антитела только класса IgM, пониженная стабильность и специфичность которых в сравнении с IgG являются существенным недостатком для их использования. Возможно, что иммуногенность использованного белка со сравнительно небольшой молекулярной массой недостаточна для успешного создания гибридом, которые продуцировали бы МА, имеющие комплекс всех желаемых свойств: высокую аффинность и специфичность по отношению к нативному и денатурированному антигену, хорошую реакционную способность в разных условиях (ИФА на планшетах и иммуноблоттинге).

Возможно ли использовать полученные МА для иммуоаффинной очистки белка АТР1АЛ1? Пока на этот вопрос невозможно дать четкий ответ, поскольку до настоящего времени все исследования проводились исключительно с рекомбинантным материалом и нельзя с полной определенностью утверждать, что структура эпитопов получаемых антител эквивалентна структуре соответствующего участка нативного фермента. С одной стороны, полученные МА четко отличают АТР1АЛ1 от Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы из почек свиньи, с другой – принадлежат к невыгодному для аффинной хроматографии классу IgM и демонстрируют взаимодействие только в специфических условиях. Основная проблема здесь состоит в том, что уровень экспрессии *atpl1* в разных тканях *in vivo* до сих пор еще очень мало исследован и невозможно предпринять хотя бы предварительные эксперименты по выделению белка с помощью иммуоаффинной хроматографии.

Кроме того, надо отметить, что уровень гомологии между АТР1АЛ1 и родственными АТФ-азами других видов значительно меньше, чем между Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-азами разных видов [5]. Поэтому встает вопрос: не является ли белок АТР1АЛ1 в значительной мере характерным именно для человека? Вполне возможно, что использование животных тканей для выделения родственных АТФ-аз не даст результата, достоверного по отношению к АТР1АЛ1. В то же время сильно ограниченная доступность большинства человеческих тканей затрудняет возможность детекции и выделения реального фермента.

Поэтому требуются дополнительные исследования по уровню экспрессии гена *atpl1* и родственных ему генов в различных тканях и у разных видов хотя бы на уровне мРНК, прежде чем можно будет дать окончательный ответ о возможности применения иммуоаффинной хроматографии для очистки белка. Кроме того, необходимо испробовать как можно больше различных поли- и моноклональных антител для разработки тест-систем для аналитических целей.

лать вывод, что гексагистидиновая последовательность не входит в эпитоп наших МА, и несколько странную реактивность можно объяснить различным способом прикрепления белков к твердой фазе. Также можно предположить, что эпитопы этих МА не располагаются в участке Ser<sup>14</sup>-Leu<sup>39</sup>. Предсказание антигенных сайтов при

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: среду RPMI 1640, сыворотку плода коровы, концентрированную смесь гипоксантина, аминоптерина и тимидина, глутамин (Flow Laboratories, Великобритания); полиэтиленгликоль 3400, 3,3'-диаминобензидин, желатин, конъюгат пероксидазы хрена с антимышиным и антикроличьим IgG (Sigma, США), набор для определения классов и подклассов иммуноглобулинов, полный адъювант Фрейнда (Calbiochem, США), NTA-Ni-агарозу, плазмидные векторы pQE30, pQE16 и штамм SG13009[pREP4] (Qiagen, США). Другие реактивы – отечественного производства.

**Клонирование фрагмента гена *atp111*, соответствующего аминокислотной последовательности Ser<sup>14</sup>-Pе<sup>104</sup>.** Для амплификации фрагментов гена *atp111* в ПЦР использовали праймеры HA-f14 ((5') ACGCGGATCCAGCGGAACТАAGG-ACATCGTG) и HA-b104 ((5') GCTAAGCTTГAT-CTCAGGCGTCTGCTTGGG) (подчеркнуты сайты рестрикции *Bam*HI и *Hind*III соответственно), а в качестве матрицы – плазмиду pHAS34.1 [4], содержащую полноразмерную кДНК гена *atp111*. Продукт ПЦР последовательно экстрагировали фенолом, смесью фенола с хлороформом (1 : 1), хлороформом и после осаждения этанолом обрабатывали 1 ч при 37°C эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Hind*III и очищали электрофорезом в 8% ПААГ с последующей элюцией из геля [16], после чего дополнительно очищали с помощью набора NucleiClean (Sigma, США) и лигировали с ДНК pQE30, расщепленной *Bam*HI/*Hind*III. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* TG1, колонии скринировали при помощи анализа белковой продукции [14]. Плазмиду из положительного клона "H30" выделяли при помощи набора Wizard Minipreps (Promega, США) и после секвенирования по методу Сенгера [17] при помощи праймера (5') GAATTCATTAAGAGGAGAAA и набора Sequenase version 2.0 sequencing kit (Amersham, Великобритания) применяли для электротрансформации клеток SG13009[pREP4] как описано в работе [18], но с использованием самодельного электропоратора. Для субклонирования ДНК плазмиды rH30 и pQE16 расщепляли рестриктазами *Bam*HI и *Hind*III; нужные фрагменты разделяли электрофорезом в агарозном геле, выделяли при помощи набора Sephaglas (Pharmacia, Швеция) и лигировали; 2 мкл лигазной смеси перед электропорацией клеток SG13009[pREP4] обессоливали капельным диализом [19].

**Синтез рекомбинантного белка, соответствующего фрагменту Ser<sup>14</sup>-Pе<sup>104</sup>,** и очистку продукта, кодируемого плазмидой rH30, при помощи металлоаффинной хроматографии осуществляли по ранее разработанной методике [14]. Клетки SG13009[pREP4], трансформированные pTHY230 [10], выращивали в течение ночи.

**Получение и характеристика МА.** Очищенный рекомбинантный белок (продукт плазмиды rH30) использовали в качестве антигена для им-

мунизации мышей линии BALB/c: 50 мкг белка в эмульсии, состоящей из смеси полного адъюванта Фрейнда и PBS (1 : 1), вводили внутривентриально. Через 2 нед проводили повторную иммунизацию раствором антигена с неполным адъювантом, а затем, на 18-е и 32-е сут, – без адъюванта.

Слияние спленоцитов иммунизированной мыши с клетками мышечной миеломной линии X-63-Ag8-653 и клонирование клеток проводили по методу Келлера и Мильштейна [20] в модификации Гальфре [21].

Полученные гибридные клоны тестировали на способность продуцировать специфические антитела методом твердофазного ИФА [22]. По 100 мкл антигена в PBS (pH 7.4) в концентрации 1 мкг/мл иммобилизовали в 96-луночных планшетах (Costar, США).

Для ИФА бактериальных лизатов клетки *E. coli* из 30 мл культуры инкубировали 1 ч в 5 мл буфера А (6 М гидрохлорид гуанидина, 0.1 М фосфат натрия, 0.01 М трис, pH 8.0) и центрифугировали 30 мин при 35000 g, затем супернатант быстро разводили в PBS с 10% метанола до концентрации белка 2 мкг/мл. Для ИФА мембран клеток Sf-9, присланных в лиофильно высушенном виде, препарат ресуспендировали в воде, солюбилизировали 30 мин в буфере для нанесения образца [23] и быстро разводили в PBS с 10% метанола. Планшеты с антигеном инкубировали в течение ночи при 4°C или 1 ч при 37°C. После трехкратной промывки PBST и инкубации с 0.1% желатином в течение 1 ч, трехкратной промывки PBST в лунки планшета вносили по 100 мкл культуральной жидкости от каждой гибридомы и инкубировали 1 ч. В качестве положительного контроля использовали иммунную мышечную сыворотку в разведении 1 : 4000, в качестве отрицательного – культуральную среду. Планшеты промывали 6 раз буфером PBST и инкубировали 1 ч с раствором конъюгированных с пероксидазой хрена овечьих антител против иммуноглобулинов мыши. После промывки определяли ферментативную активность, добавляя в лунки по 100 мкл раствора субстрата (4 мг *o*-фенилендиамина и 4 мкл 30% перекиси водорода в 10 мл 0.1 М натрий-цитратного буфера, pH 5.0) и измеряя поглощение при 492 нм или разницу поглощений при 492 и 450 нм (в последнем случае реакцию останавливали, добавляя по 100 мкл 2 М серной кислоты).

Отобранные положительные клоны дважды клонировали методом лимитирующих разведений [20–22]. Для получения асцитов мышам линии BALB/c вводили внутривентриально 0.5 мл пристана и через 10–14 сут –  $3 \times 10^6$  гибридомных клеток в PBS [22].

**Электрофорез белков в ПААГ** проводили по методу Лэмми [24].

Для определения N-концевой аминокислотной последовательности белка *E. coli*, разделенные электрофорезом, переносили на поливинилидендифторидную мембрану (Bio-Rad, США) как опи-



сано [25], окрашивали 0.1% кумасси G-250 (Bio-Rad) в 50% метаноле в течение 1 мин, быстро осветляли метанолом, вырезали нужные полоски мембраны, длительно (ночь и более) обесцвечивали в нескольких сменах метанола и определяли N-концевую аминокислотную последовательность на газофазном секвенаторе, модель 470 A (Applied Biosystems, США).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 95-04-13297а и 95-04-12245а), International Science Foundation (M4N300), Министерства науки (Программа "Белковая инженерия") и U.S. Civilian Research and Development Foundation (RB1-198).

Авторы выражают признательность С.В. Гон-тареву и Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов, Ю. Чулиану (Yu C.) и проф. А. Аскари (Askari A.) (Медицинский колледж Огайо, США) за препарат рекомбинантного АТРАЛ1, Ю.Ф. Леоновой за определение N-концевой последовательности, А.С. Гришину за предоставление кроличьей сыворотки и плазмиды рТНУ230, а также Е.А. Платошкиной за препараты  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазы из почек свиньи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lingrel J.B., Kuntzweiler T. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 19659–19662.
2. Shull M.M., Lingrel J.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 4039–4043.
3. Modyanov N.N., Petrukhin K.E., Sverdlov V.E., Grishin A.V., Orlova M.Y., Kostina M.B., Makarevich O.I., Broude N.E., Monastyrskaya G.S., Sverdlov E.D. // FEBS Lett. 1991. V. 278. P. 91–94.
4. Grishin A.V., Sverdlov V.E., Kostina M.B., Modyanov N.N. // FEBS Lett. 1994. V. 349. P. 144–150.
5. Sverdlov E.V., Kostina M.B., Modyanov N.N. // Genomics. 1996. V. 32. P. 317–327.
6. Crowson M.S., Shull G.E. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 13740–13748.
7. Jaiser F., Horisberger J.-D., Geering K., Rossier B.C. // J. Cell Biol. 1993. V. 123. P. 1421–1429.
8. Jaiser F., Horisberger J.-D., Rossier B.C. // Pfluegers Arch. 1993. V. 425. P. 446–452.
9. Modyanov N.N., Mathews P.M., Grishin A.V., Beguin P., Beggaah A.T., Rossier B.C., Horisberger J.-D., Geering K. // Am. J. Physiol. 1995. V. 269. P. C992–C997.
10. Grishin A.V., Bevensee M.O., Modyanov N.N., Rajendran V., Boron W.F., Caplan M.J. // Am. J. Physiol. 1996. V. 271. P. F539–F551.
11. DuBose T.D., Codina J.J., Burges A., Pressley T.A. // Am. J. Physiol. 1995. V. 269. P. F500–F507.
12. Jaiser F., Escoubet B., Contry N., Eugene E., Bonvalet J.P., Farman N. // Am. J. Physiol. 1996. V. 270. P. C679–687.
13. Buiard H., Gentz R., Lanzer M., Stüber D., Müller M., Ibrahim I., Häuptle M.T., Dubberstein B. // Meth. Enzymol. 1987. V. 155. P. 416–433.
14. Пестов Н.Б., Гусакова Т.В., Костина М.Б., Шахпаронов М.И. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 664–670.
15. Hopp T., Woods K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 3824–3828.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
17. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
18. Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 6127–6145.
19. Jacobs M., Wnedt S., Stahl U. // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. P. 1653.
20. Köhler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. P. 495–497.
21. Galfré G., Milstein C. // Meth. Enzymol. 1981. V. 73. P. 3–46.
22. Harlow E., Lane D. // Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. P. 557–590.
23. Heim R., Iwata T., Zvaritch E., Adamo H.P., Rutishauser B., Strehler E., Guerini D., Carafoli E. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 24476–24484.
24. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
25. Laurière M. // Anal. Biochem. 1993. V. 212. P. 206–211.

## Monoclonal Antibodies to the $\alpha$ -Subunit of the Putative Human $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase Encoded by the *atp1a1* Gene

T. V. Korneenko, N. B. Pestov, M. V. Egorov, M. V. Ivanova,  
M. B. Kostina, and M. I. Shakhparonov

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10,  
GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Abstract**—The N-terminal fragment of АТРАЛ1, the possible catalytic subunit of human ouabain-sensitive  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза, was expressed in *Escherichia coli* cells as two recombinant proteins: the Ser<sup>14</sup>–Ile<sup>104</sup> fragment or the same fragment containing His<sub>6</sub> sequence at its N-end. The second protein was purified by metal-affinity chromatography and used as an antigen to construct two hybridoma lines producing antibodies of the IgM class. These monoclonal antibodies were shown to recognize not only the starting antigen but also the full-size recombinant АТРАЛ1 protein and do not react with  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза.

**Key words:**  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза, АТРАЛ1, hybridoma, EIA, monoclonal antibodies, PCR, ouabain, epitope.