



УДК 576.097.3

**МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ
КОМПЛЕМЕНТА C2, C3, C4 И C5***Бозлов Л. В., Крылова Ю. И., Чих В. И.,
Молчанова Н. Н.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Предложены модифицированные методы избирательной инактивации факторов C2, C3, C4 и C5 в сыворотке крови, позволяющие получить реагенты R2, R3, R4 и R5 для определения гемолитической активности соответствующих факторов комплемента. Для определения C2 и C4 используется реагент и EA, а для определения C3 и C5 — реагент и комплекс EAC14, получаемый с помощью R2.

Система комплемента, часть иммунной системы организма, представляет собой совокупность 20 белков: ферментов, регуляторов и белков мембраноатакующего комплекса [1]. За проявлением активности комплемента удобно следить по гемолизу эритроцитов барана, сенсибилизированных кроличьими антителами против них (EA). Комплекс EA инициирует классический путь активации комплемента, в котором участвуют белки, узнающие иммунный комплекс и запускающие систему, — C1q, C1r, C1s, факторы C4, C2 и C3, создающие C3- и C5-конвертазы, а также белки мембраноатакующего комплекса C5—C9 — общего для обоих путей активации: классического и альтернативного [1].

Удобным подходом для изучения функциональных свойств каждого из факторов комплемента является конструирование системы, в которой отсутствует один изучаемый фактор. Создать такую систему можно либо из чистых факторов, либо специфическим удалением интересующего нас фактора из цельного комплемента, в качестве которого, как правило, пользуются сывороткой крови человека или морской свинки. Второй путь кажется предпочтительным. Известны различного рода воздействия на комплемент, приводящие к разрушению отдельных факторов. Такой прием ранее использовался для получения реагентов R2, R3 и R4 при определении факторов C2, C3 и C4 [2]. Однако эти реагенты оказались неудовлетворительными в отношении как чувствительности, так и специфичности [3], и неудачи в их использовании относили за счет необходимости поэтапного образования комплексов с последовательным присоединением к EA факторов C1, C4, C2, C3 и т. д. [2, 3]. Однако мы полагаем, что неудачи можно объяснить неудовлетворительным качеством самих реагентов, при получении которых наряду с требуемым инактивировались и другие факторы комплемента.

Целью настоящей работы явилась ревизия и модифицирование методов избирательного удаления отдельных факторов комплемента, необходимые для получения адекватных методов количественного определения компонентов комплемента. Нас интересовали главным образом первые 5 факторов. (Хороший метод определения фактора C1q с избирательным его удалением на аффинной колонке был недавно опубликован [4]. Мы несколько модифицировали этот метод для определения также суммарного фактора C1, о чем будет сообщено в отдельной публикации.)

Сокращения: EA — эритроциты барана, покрытые кроличьими антителами против них, EAC14, EAC14_{oxy3} — комплексы EA с факторами комплемента C1, C4 и C1, C4, окисленным водом C2 и C3 соответственно.

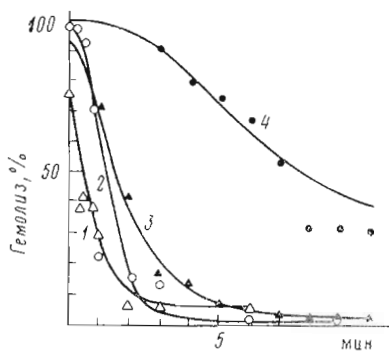


Рис. 1

Рис. 1. Денатурация факторов C2 (1, 3) и C4 (2, 4) при 56° С (1, 2) и 50° С (3, 4) в плазме крови человека. Инактивацию факторов определяли по степени гемолиза

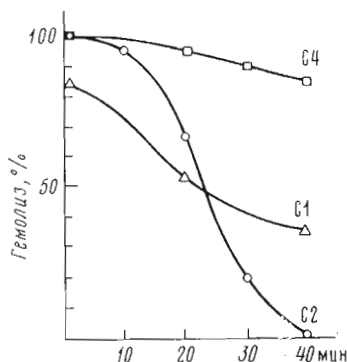


Рис. 2

Рис. 2. Инактивация факторов C2, C1 и C4 в сыворотке при 50° С и разбавлении 1 : 25 для C2 и 1 : 600 для C1 и C4. Инактивацию определяли по степени гемолиза

Метод количественного определения компонентов комплемента основан на предложенной Мейером «теории одного удара» [2], заключающейся в том, что одно отверстие в мембране эритроцита, образованное мембраноатакующим комплексом C5b-9, достаточно для лизиса клетки. Поэтому к лизису одного эритроцита должна приводить активация одной молекулы тестируемого фактора комплемента. Реально гемолитически активной оказывается одна молекула на сотни или тысячи активируемых молекул, вследствие того, что большая часть активируемых молекул становится неэффективной из-за наличия отрицательных обратных связей регулирования, осуществляемого ингибиторами, инактиваторами и малым временем жизни активированного состояния. Подсчет числа лизированных эритроцитов может дать информацию о числе гемолитически эффективных молекул. Число отверстий на один эритроцит — z подчиняется распределению Пуассона, и для расчета пользуются формулой $z = -\ln(1-y)$, где y — степень лизиса, т. е. доля лизированных эритроцитов. Умножив z на количество эритроцитов в пробе, получают общее число эффективных молекул тестируемого фактора.

Была выбрана концентрация эритроцитов барана (в виде комплекса EA), необходимая для оптимальной чувствительности метода. При проведении лизиса эритроцитов комплементом зависимость степени лизиса от количества комплемента x описывается уравнением фон Крюга [2]:

$$x = K \left(\frac{y}{1-y} \right)^{1/n}.$$

Наиболее благоприятны условия, когда $1/n=0,2$; эти условия соответствуют концентрации эритроцитов в суспензии $6 \cdot 10^7$ клеток/мл. Количество лизированных эритроцитов удобно определять по поглощению (λ 412 нм) вышедшего в раствор гемоглобина: 10^7 лизированных клеток в 1 мл имеют поглощение, равное 1 [5].

Для определения тестируемого фактора использовали единую систему. Инкубировали при 37° С в течение 30 мин смесь, состоящую из 0,2 мл комплекса EA (или EAC14) с концентрацией $1,5 \cdot 10^8$ клеток/мл, 0,05 мл соответствующего реагента R и 0,25 мл тестируемой пробы. После инкубации к смеси добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl и после отделения центрифугированием нелизированных клеток и «теней» эритроцитов определяли поглощение раствора при 412 нм, численно равное степени лизиса. Линеиность графика зависимости z от количества взятой сыворотки (в качестве тестируемого фактора комплемента) является характеристикой

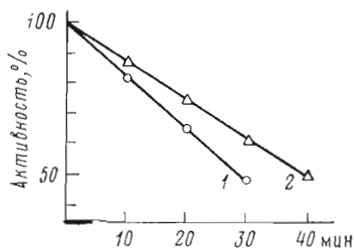


Рис. 3

Рис. 3. Инактивация фактора C4 в сыворотке при 50°С до удаления (1) и после частичного удаления (2) иммуноглобулинов

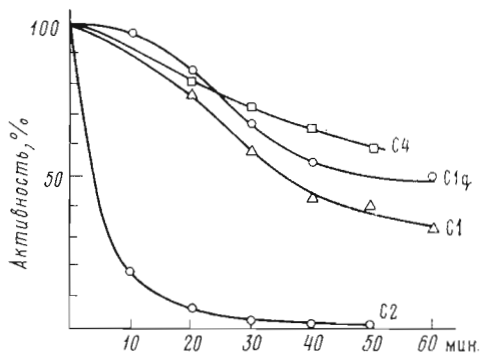


Рис. 4

Рис. 4. Инактивация отдельных факторов комплемента нагреванием сыворотки при 50°С

реагента R. Изломы на графике означали бы, что реагент дефицитен не только по тестируемому фактору.

Для определения фактора C2 описан сложный метод, требующий наличия очищенных факторов C1 и C4 для получения комплекса EAC14 [5]. Применяемый ранее метод с использованием R2, заключающийся в нагревании сыворотки при 56°С в течение 30 мин, давал неудовлетворительные результаты [2]. При такой обработке полностью теряется также активность фактора C1q, а факторов C1q, C6 и C8 — частично [6].

Проведенное нами исследование термоинактивации комплемента при 56°С в плазме крови человека показало, что исчезновение активности обусловлено преимущественно инактивацией фактора C4 (рис. 1). В этих условиях константа скорости инактивации C4 (1,85 мин⁻¹) превышает константу скорости денатурации наиболее термолabile фактора C2 (1,5 мин⁻¹). Мы нашли, что при 50°С константа скорости инактивации C4 в плазме составляет 0,4 мин⁻¹, а соответствующая константа для C2 — 0,7 мин⁻¹ (рис. 1). В сыворотке крови скорости падения активностей факторов C2 и C4 существенно более низкие (рис. 2). Можно предположить, что падение активностей факторов C4, C1 и C2 связано наряду с термоденатурацией C1q и C2 также и с активацией системы комплемента благодаря агрегации иммуноглобулинов при повышенной температуре. Присутствие фибриногена в плазме может способствовать такой агрегации, поэтому процесс протекает быстрее. О роли иммуноглобулинов в инактивации C4 свидетельствует уменьшение скорости инактивации C4 при частичном удалении иммуноглобулинов из сыворотки с помощью аффинного сорбента — белок А—сефарозы (рис. 3).

Выбор подходящего времени инактивации для каждой индивидуальной сыворотки позволяет получить реагент R2, содержащий достаточное количество факторов C1 и C4, но лишенный фактора C2. Один из таких экспериментов приведен на рис. 4. В качестве реагента R2 выбирается препарат сыворотки, прогретый при 50°С в течение 35 мин и разбавленный в соотношении 1 : 5. В этих условиях денатурации сохраняется выше 50% активности факторов C4, C1q и суммарного C1.

Реагент R2 позволяет определять активность C2 с высокой чувствительностью (рис. 5). Расчет количества эффективных молекул C2 в сыворотке показывает, что гемолитически эффективна одна молекула из 2000, что соответствует теоретической величине [7]. Это означает, что с реагентом R2 удается достичь теоретической чувствительности метода. Известно, что окисление C2 иодом приводит к возрастанию гемолитической активности фактора [8]. Увеличение активности в 13 раз наблюдали при окислении чистого фактора C2 и в 6 раз при окислении C2 в сыворотке [5]. Наблюдаемое нами увеличение активности в 14,5 раза

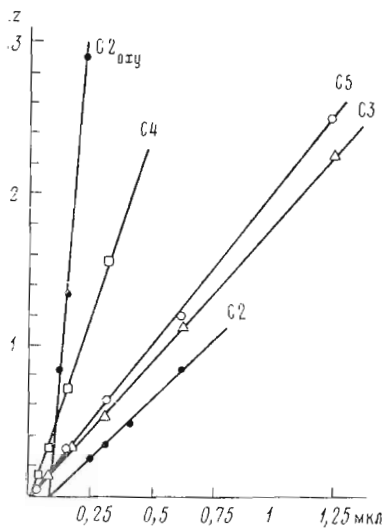


Рис. 5

при окислении C2 в сыворотке (рис. 5) также свидетельствует об адекватности нашего метода определения активности C2. Реагент R2 оказался, кроме того, полезным при получении комплекса EAC14.

Методы определения активности факторов C3, C4 и C5 довольно сложны. Нашей целью было максимально их упростить. Трудности избирательного удаления факторов C3, C4 и C5 из сыворотки объясняются близостью физико-химических свойств этих компонентов комплемента. Они ответственны за связывание с мембраной, функционально и структурно похожи и, возможно, эволюционно родственны [9]. Гомология прослеживается у белков C3a и C5a — N-концевых фрагментов факторов C3 и C5 [10]. Общность факторов C3 и C5, а также C3 и C4 отражает их способность быть субстратами одного фермента. Так, C3 и C5 активируются конвертазами классического и альтернативного путей активации. В составе этих конвертаз протеолитическая активность для расщепления C3, и C5 обусловлена одним фактором: в классической системе C2a, в альтернативной — Bb. Факторы C3b и C4b расщепляются и инактивируются общим инактиватором C3bINA [11]. Связывание всех факторов с мембраной осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий их активированных фрагментов C3b, C4b и C5b, а для C3b и C4b имеется также ковалентное связывание. Факторы C3 и C4 имеют спрятанную в глобуле молекулы тиолсложноэфирную связь, образованную γ -карбоксылной группой остатка глутаминовой кислоты и SH-группой остатка цистеина [11, 12]. Соответственно их инактивация может происходить в результате действия нуклеофильных агентов (например, аминов), которые расщепляют эту связь. В отличие от C3 и C4 фактор C5, по-видимому, не содержит тиолсложноэфирной связи и не инактивируется при обработке аминами [12]. Хаотропные агенты (KBr и KSCN) приводят к нарушению структуры белка и экспонированию в раствор энергетически богатой тиолсложноэфирной связи в C3 и гидролизу последней [13]. Однако действию хаотропных ионов (KBr, KI и KSCN) подвержены все три мембраносвязывающихся фактора, в том числе и не содержащий активированную группу C5 [14]. Наиболее сильно действие KSCN, обработка 1 M раствором которого приводит к полной инактивации C3, C4 и C5 и сохранению других факторов комплемента. Наиболее чувствителен к действию хаотропных ионов, по данным работы [14], фактор C3, за ним следуют C5 и C4 [14].

Для получения реагента R3 мы воспользовались методом, предложенным в работе Така и Праля [15], основанным на инактивации фактора C3 в сыворотке инкубацией последней при 4° C в течение 18 ч в смеси с равным объемом насыщенного раствора KBr; активности C4 и C5 при этом также частично теряются [15]. Поэтому для определения активнос-

Рис. 5. Определение в сыворотке активности факторов C2, окисленного C2 (C2_{окис}) и C4 с комплексом EA, а также C3, C5 с комплексом EAC14 с использованием соответствующих реагентов R2, R3, R4 и R5

Рис. 6. Инактивация факторов C3 и C5 при инкубации сыворотки с сефалорозой 4В при 37° C

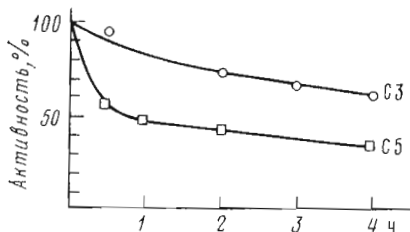


Рис. 6

сти С3 используется комплекс ЕАС14, получаемый из чистых компонентов С1 (морской свинки) и С4 (человека).

Мы получали реагент R3 по методу [15], однако показали, что при этом в реагенте полностью инактивируется также фактор С4, но С5 практически полностью сохраняет свою активность. В нашей методике определения активности С3 было упрощено получение комплекса ЕАС14. Этот комплекс получали с помощью R2. Определение фактора С3 в сыворотке показано на рис. 5. Калибровочный график линейен, что свидетельствует об адекватности метода.

Для получения реагента R3 ранее использовалась обработка сыворотки зимозаном [2], который, как известно, активирует альтернативную систему комплемента [16]. При этом на первом этапе происходит активация факторов С3 и В с образованием альтернативной С3-конвертазы, а затем и С5-конвертазы, в результате чего в сыворотке инактивируются С3- и В-факторы. Активировать альтернативную систему комплемента может также поверхность гранул сефарозы 4В*. Оказалось, что при инкубации сыворотки крови человека с сефарозой 4В скорость инактивации фактора С5 выше скорости инактивации С3 (рис. 6). Полной инактивации С3 в сыворотке человека не удается достичь при инициации альтернативного пути. Это согласуется также с данными Лахмана и Хобарта [17] о неполном удалении фактора С3 в сыворотке человека с помощью зимозана и о полном удалении этого фактора в этих условиях в комплементе морской свинки.

В связи с этим уместно отметить, что реагент, получаемый при обработке человеческой сыворотки зимозаном [2] и используемый в качестве R3, на самом деле является реагентом на фактор С5 — R5. Мы решили воспользоваться этим для получения R5. Вместо труднодоступного (и часто малоактивного) зимозана мы использовали клетки пекарских дрожжей, обработанные по методу Лахмана и Хобарта [17]. В реагенте, полученном при обработке свежей сыворотки в течение 45 мин при 37° С суспензией дрожжевых клеток, содержание (до разбавления) фактора С5 составляло 10%, С3 — 42%; С4 — 45% (от исходного по активности). Следует учесть, что сыворотка содержит гемолитически эффективных молекул фактора С3 в 5—10 раз больше, чем таких же молекул С5 [7]. Поэтому полученный препарат (разбавленный в 5 раз) можно использовать в качестве реагента R5. При этом с реагентом в систему вводится свыше 10 гемолитических единиц С3, а недостаток С4 компенсируется применением комплекса ЕАС14 (получаемого, как и в случае определения С3, с помощью R2). Определение С5 в сыворотке крови этим методом показано на рис. 5. Метод существенно проще метода определения С5 по Таку и Пралю [15], в котором используются очищенные факторы С1, С4, С2 и С3, и метода Лахмана и Хобарта [17], в котором используется сложным образом получаемый комплекс ЕАС14_{чел} и сыворотка мышей, дефицитных по С5.

Методика получения реагента на С4 (R4) не содержит принципиальной новизны [2]. Проведенная нами экспериментальная проверка, однако, показала, что лучшие результаты достигаются, если в качестве источника комплемента для получения R4 использовать комплемент морской свинки. Хорошая воспроизводимость приготовления реагента достигается, если вместо аммиака, применяемого для инактивации С4, комплемент обрабатывать 1,5 ч 0,015 М гидразингидратом при комнатной температуре. Кроме того, после нейтрализации раствора необходимо удалить гидразингидрат диализом, поскольку остающийся гидразин инактивирует фактор С3 даже при нейтральных рН. В полученном реагенте R4 практически полностью сохраняется активность С5; фактор С3 частично инактивируется. Для определения фактора С4 использовали комплекс ЕА и разбавленный реагент R4. Вводимый в систему реагент содержал свыше 5 гемолитических единиц С3, что оказалось достаточным. На рис. 5 приведено определение С4 с помощью R4 и ЕА в сыворотке крови.

* Сообщение будет опубликовано в ближайшем номере журнала «Биоорганическая химия».

Экспериментальная часть

В работе использовали 5,5-диэтилбарбитуровую кислоту (веронал) и ее натриевую соль (мединал) фирмы «Serva» (ФРГ), этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N, N'-тетрауксусную кислоту (EGTA) фирмы «Sigma» (США), β-меркаптоэтанол (Loba — Chemie, Австрия), под-ацетамид (Amersham, Англия), сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), альбумин бычий сывороточный лп.офилизированный марки В Олайнского завода химреактивов, гемолизин — кроличьи антитела к бараньим эритроцитам — сухая гемолитическая сыворотка, комплемент морской свинки и остальные реактивы (квалификации не ниже ч.д.а.) отечественного производства.

Изотонический вероналовый буфер (VBS). 2 л раствора содержат 5,75 г веронала, 3 г мединала, 85 г NaCl, pH 7,4. Перед работой буфер разбавляли в 5 раз.

Изотонический буферный раствор с Ca^{2+} и Mg^{2+} (VBS^{2+}). Готовили 2 л VBS, как указано выше, добавляя, кроме того, 5 мл 1 М $MgCl_2$ и 1,5 мл 1 М $CaCl_2$.

В готовые буферные растворы перед работой полезно добавить бычий сывороточный альбумин в расчете 1 г белка на 1 л буферного раствора. Использование альбумина делает эритроциты менее подверженными спонтанному лизису.

Изотонический фосфатный буфер (PBS): 0,85% раствор NaCl, содержащий 2% по объему 0,2 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,2.

Раствор Олсвера [5]. В 750 мл дистиллированной воды растворяли 8 г цитрата натрия (дигидрата тринатриевой соли), 4,2 г NaCl и 20,5 г глюкозы, добавляли ~5,5 мл 10% лимонной кислоты до pH 6,1 и доводили объем раствора до 1 л. Для стерилизации раствор кипятили.

Сыворотка крови человека. Отбирали донорскую кровь в сухую стерильную посуду и оставляли на 2 сут при 4° С. Супернатант разливали по пробиркам и хранили при -50° С.

Эритроциты барана. Кровь барана из яремной вены отбирали с соблюдением асептических условий в равный объем стерильного раствора Олсвера со стеклянными шариками, перемешивали и стерильно разливали по пробиркам. Оставляли на 3—7 сут при 4° С для стабилизации клеток. Стерильно отобранные эритроциты можно хранить около 2 месяцев при 4° С.

Приготовление стандартной взвеси бараньих эритроцитов. Осадок эритроцитов трижды промывали с центрифугированием (1000 g) 5—10 объемами VBS^{2+} , суспендировали в 18 объемах VBS^{2+} для получения ~5% суспензии; 1 мл суспензии с 14 мл воды должен обладать поглощением 0,7 OE_{541} , что соответствует концентрации клеток в суспензии $1 \cdot 10^9$ клеток/мл. Для стандартизации пользовались формулой $v_k = v_0 \cdot D_{541} / 0,7$, где v_k — конечный объем суспензии, v_0 — начальный объем с концентрацией, определяемой по величине D_{541} . Стандартизованные эритроциты хранили при 4° С несколько суток.

Приготовление сенсibiliзированных эритроцитов (EA). К 10 мл взвеси эритроцитов ($1 \cdot 10^9$ клеток/мл) прибавляли 10 мл гемолитической сыворотки, разбавленной VBS^{2+} в отношении 1:400, тщательно перемешивали и инкубировали 30 мин при 37° С, периодически перемешивая. Взвесь эритроцитов доводили до концентрации $1,5 \cdot 10^8$ клеток/мл, добавляя 46,7 мл VBS^{2+} ; 0,2 мл суспензии EA в смеси с 2,8 мл воды должны иметь D_{412} .

Приготовление комплекса EAC14. 10 мл EA с концентрацией $1 \cdot 10^9$ клеток/мл инкубировали с 1 мл R2 при 37° С в течение 5 мин. Комплекс промывали VBS^{2+} при 4° С с центрифугированием при 1000 g. Далее готовили стандартную концентрацию EAC14— $1,5 \cdot 10^8$ клеток/мл ($1 OE_{412}$).

Приготовление реагента R2. Сыворотку разливали в тонкостенные пробирки по 3 мл и выдерживали в водяном термостате, контролируя температуру (50° С) внутри пробирок. Отбирали пробы через каждые

10 мин, определяя активность факторов С1, С1g, С4 и контроль на гемолиз по методике определения С2, используя в качестве R2 отобранную пробу. Для получения R2 выбирали время инкубации данной сыворотки, при котором сохраняется активность С1 и С4 при достаточно низком контроле (разное время для разных сывороток, обычно ~35 мин); R2 хранили при 4°С, добавив борную кислоту до 4%.

Приготовление R3. К 10 мл охлажденной до 4°С свежей сыворотки при непрерывном перемешивании медленно приливали 10 мл охлажденного насыщенного при 4°С раствора КВг. Смесь инкубировали 18 ч при 4°С, затем диализовали 18 ч против PBS, разливали по пробиркам и хранили при -50°С. В качестве реагента R3 использовали препарат, разбавленный VBS²⁺ в соотношении 2 : 3.

Приготовление R4. К 1 мл раствора комплемента морской свинки в 0,15 М NaCl приливали 0,25 мл 0,075 М раствора гидразингидрата, смесь инкубировали 1,5 ч при 20°С, добавляли 0,25 мл 0,15 М HCl, затем диализовали 18 ч при 4°С против PBS, разливали по пробиркам и хранили при -50°С. Реагент использовали в качестве R4 при разбавлении VBS²⁺ в соотношении 1 : 3.

Приготовление денатурированных дрожжевых клеток [17]. 450 г свежих пекарских дрожжей суспендировали в 2 л PBS и автоклавировали 30 мин при 120°С. Центрифугировали 10 мин при 2000g и осадок отмывали PBS до прозрачного супернатанта. Осадок ресуспендировали в 250 мл PBS, содержащих 1,7 мл β-меркаптоэтанола, и инкубировали 2 ч при 37°С при перемешивании на качалке. Суспензию центрифугировали и трижды отмывали 0,15 М NaCl до удаления β-меркаптоэтанола. Осадок ресуспендировали в 500 мл 0,02 М раствора иодацетамида, приготовленного на 0,15 М NaCl, содержащем 20% (по объему) 0,2 М фосфатного буфера, pH 7,2, и перемешивали 2 ч при комнатной температуре, поддерживая pH 7,2. Суспензию центрифугировали 10 мин при 2000g и трижды промывали PBS. Осадок ресуспендировали в 2 л PBS и автоклавировали 30 мин при 120°С. Центрифугировали и промывали осадок PBS до отсутствия белка в супернатанте. Осадок суспендировали в 1 л VBS²⁺, добавляли 200 мг азиды натрия и хранили при 4°С.

Приготовление R5. К 1 мл свежей сыворотки добавляли 0,05 мл суспензии дрожжевых клеток и инкубировали 45 мин при 37°С. В качестве реагента R5 использовали полученный препарат, разбавленный VBS²⁺ в соотношении 1 : 4.

Определение активности факторов С2, С3, С4 и С5. К 0,2 мл EA (для С2 и С4) или EAC14 (для С3 и С5) в концентрации $1,5 \cdot 10^8$ клеток/мл добавляли 0,25 мл тестируемой пробы (в необходимом разбавлении VBS²⁺) и 0,05 мл соответствующего реагента. Смесь 30 мин инкубировали при 37°С, добавляли 2,5 мл охлажденного 0,15 М NaCl, центрифугировали при 1000g и измеряли поглощение супернатанта при 412 нм. В качестве контролей инкубировали 0,2 мл EA или EAC14 с 0,3 мл VBS²⁺ (K_{EA}); 0,2 мл EA или EAC14+0,25 мл VBS²⁺+0,05 мл R (K_R), а также контролировали полный лизис: 0,2 мл EA или EAC14 и 2,8 мл H₂O (K_L); K_{EA} , K_R и K_L — соответствующие величины D_{412} , $A - D_{412}$ в опыте. Величину z определяли по формуле

$$z = \ln [(K_L + K_{EA} - K_R) / (K_L + K_{EA} - A)].$$

Окисление С2 (С2_{oxy}) в сыворотке [5, 17]. Окисляющий раствор готовили растворением 8,3 г KI и 0,25 г I₂ в 4 мл фосфатного буфера, pH 6, ионная сила 0,1 (105 мл 1 М NaH₂PO₄+35 мл 0,5 М Na₂HPO₄+H₂O до 1,5 л), затем доводили объем до 10 мл тем же буфером. Хранили в темной склянке при 4°С в течение недели. Окисляющий раствор (10 мкл) добавляли к 1 мл сыворотки, инкубировали 5 мин при 4°С и нейтрализовали избыток йода добавлением 1 мг глюкозы на 1 мл пробы.

Обработка сыворотки сефарозой 4В. Сефарозу 4В промывали 3 раза дистиллированной водой и 2 раза VBS, содержащим 5 мМ MgCl₂ и 10 мМ EGTA, суспендировали в свежей сыворотке человека, содержащей 5 мМ

MgCl₂ и 10 мМ EGTA, в объемном соотношении 1:1. Суспензию инкубировали при 37° С, отбирая через каждый час пробы и определяя в них активности С3 и С5.

Аффинное удаление иммуноглобулинов из сыворотки. 10 мл сефарозы 4В с иммобилизованным белком А (1,1 мг/мл), уравновешенной VBS²⁺, смешивали с 15 мл свежей сыворотки при комнатной температуре и сорбент удаляли фильтрованием.

Определение активностей С1 и С1q проводили методами, аналогичными определению активностей других факторов комплемента. Реагенты R1 и R1q получали, как описано в работе [4].

Авторы выражают благодарность В. И. Суровцеву за предоставление препарата синтезированного им аффинного сорбента, а также Л. Л. Заваде и М. Н. Сизой за предоставление реагентов R1 и R1q.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reid P. B. M., Porter R. R. Ann. Rev. Biochem., 1981, v. 50, p. 433-464.
2. Кэбор Е., Мейер М. Экспериментальная иммунохимия. М.: Медицина, 1968, с. 140-246.
3. Borsos T., Rapp H. J., Cook C. T. J. Immunol., 1961, v. 87, № 4, p. 330-336.
4. Kolb W. P., Kolb L. M., Podack E. R. J. Immunol., 1979, v. 122, № 5, p. 2103-2111.
5. Methods in immunology and immunochemistry/Eds Williams C. A., Chase M. W. N. Y.: Acad. Press, 1974, v. 4, p. 127-274.
6. Иванюв А. А. Успехи совр. биол., 1977, т. 83, № 2, с. 251-264.
7. Prahl J. W. In: Trace components of plasma: isolation and clinical significance/Ed. Alan R. N. Y.: Liss Inc., 1976, p. 43-67.
8. Polley M., Müller-Eberhard H. J. J. Exptl Med., 1967, v. 126, № 1, p. 1013-1025.
9. Müller-Eberhard H. J. Ann. Rev. Biochem., 1975, v. 44, p. 697-724.
10. Fernandez H. N., Hugli T. E. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 19, p. 6955-6964.
11. Tack B. F., Harrison R. A., Janatova J., Thomas M. L., Prahl J. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 10, p. 5764-5768.
12. Law S. K., Lichtenberg N. A., Levine R. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 12, p. 7194-7198.
13. Janatova J., Lorenz P. E., Schechter A. N., Prahl J. W., Tack B. F. Biochemistry, 1980, v. 19, № 19, p. 4471-4478.
14. Dalmaso A. P., Müller-Eberhard H. J. J. Immunol., 1966, v. 97, № 5, p. 680-685.
15. Tack B. F., Prahl J. W. Biochemistry, 1976, v. 15, № 20, p. 4513-4521.
16. Müller-Eberhard H. J. In: Molecular basis of biological degradative processes/Eds Berliner R. D., Hermann H., Lepow I. H., Tanzer J. M. N. Y.: Acad. Press, 1978, p. 65-114.
17. Lachmann P. J., Hobart M. J. In: Handbook of experimental immunology. 3d ed./Ed. Weir D. M. N. Y.: Blackwell Scientific Publications, 1979, p. 5A. 1-5A. 23.

Поступила в редакцию
2.XII.1981

MODIFIED METHODS OF FUNCTIONAL ASSAY OF THE COMPLEMENT FACTORS C2, C3, C4 AND C5

KOZLOV L. V., KRYLOVA Yu. I., CHIKH V. P., MOLCHANOVA N. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Modified methods of selective inactivation of factors C2, C3, C4 and C5 in serum are proposed which allow to obtain the reagents R2, R3, R4 and R5 for hemolytic assay of the respective complement factors. To determine C2 and C4, the reagent and EA are used, while for C3 and C5 the reagent is used with EAC14, the latter being prepared from EA and R2.