

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) является основным структурным белком астроцитов (астроглии) центральной нервной системы (головного и спинного мозга), также он обнаружен в немиелинизирующих клетках Шванна периферической нервной системы. Он поддерживает форму клетки и участвует в регуляции процессов, связанных с пролиферацией клеток, синаптической пластичностью, а также функцией гематоэнцефалического барьера.

Биохимия GFAP

GFAP принадлежит к группе белков промежуточных филаментов III типа. На сегодняшний день описано десять изоформ GFAP. Однако клиническое значение имеет только преобладающая изоформа (изоформа 1 или GFAP- α) (1).

GFAP представляет собой фибриллярный белок с массой около 50 кДа. Формирование филаментов включает латеральную димеризацию GFAP и полимеризацию образующихся димеров по принципу “голова к хвосту”. Белок является высококонсервативным у разных живых организмов и очень похож на некоторые другие белки, которые также участвуют в образовании таких промежуточных филаментов, как, например, виментин, десмин, периферин и альфа-интернексин.

GFAP как маркер в диагностике

GFAP является маркером повреждения глиальных клеток. В условиях, когда глиальные клетки повреждены, GFAP высвобождается из клеток и затем появляется в крови. GFAP может быть обнаружен в образцах крови вскоре после повреждения (2,3).

Как показали недавние исследования, GFAP может использоваться в качестве биомаркера черепно-мозговой травмы (ЧМТ). В частности, было установлено, что уровень GFAP заметно возрастает через восемь часов даже после легкой или умеренной ЧМТ травмы (3). Кроме того, есть предположение, что по уровню концентрации GFAP можно прогнозировать последствия травмы для организма пациента (4). Более того, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США одобрило тест, измеряющий уровень GFAP (и UCH-L1 - убиквитин карбокси-концевая гидролаза L1), для оценки состояния пациента после легкой ЧМТ (5).

Разграничение между геморрагическим и ишемическим инсультом.

Все большее число исследований свидетельствуют, что GFAP может быть полезным биомаркером для уточнения диагноза между геморрагическим и ишемическим инсультом. Обе патологии могут иметь серьезные последствия для пациента, но поскольку их физиология отличается, то назначаются взаимоисключающие стратегии лечения. Поэтому крайне важно наличие инструмента, позволяющего установить верный диагноз в кратчайшие сроки. Согласно исследованиям, в случае геморрагического инсульта уровень GFAP увеличивается в течение двух часов после начала инсульта, достигая пика между 6 и 12 часами. В случае же ишемического инсульта концентрация GFAP в крови повышается позднее (2,6).

Компания Хайтест предлагает несколько моноклональных антител (МоАт), специфичных к GFAP. Также мы предлагаем рекомбинантный антиген GFAP, который можно использовать в качестве стандарта или калибратора в иммуноанализах.

КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
Черепно-мозговая травма (ЧМТ)

Моноклональные антитела, специфичные к GFAP

Хайтест предлагает несколько хорошо охарактеризованных моноклональных антител (МоАт), которые специфичны к GFAP и которые могут быть использованы для количественного определения GFAP в сыворотке, плазме или спинномозговой жидкости.

Сэндвич-иммуноанализы для выявления GFAP

Для обнаружения GFAP в образцах цитратной или гепариновой плазмы, а также в образцах сыворотки с помощью сэндвич-иммуноанализа, мы рекомендуем три пары МоАт (см. Таблицу 1). Они не показали кросс-реактивности с виментином, десмином, периферином или альфа-интернексином. Калибровочная кривая с использованием прототипа GFAP83cc-GFAP81cc анализа показана на рисунке 1.

Таблица 1.

Рекомендуемые пары (подложка-детекция) для определения GFAP. Данные основаны на результатах, которые были получены с использованием сэндвич-хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA). Аббревиатура LoD в таблице означает предел детекции.

Антитело подложки	Детекторное антитело	LoD (пг/мл)
GFAP83cc	GFAP81cc	4.8
GFAP94cc	GFAP98cc	15.3
GFAP15cc	GFAP81cc	13.3

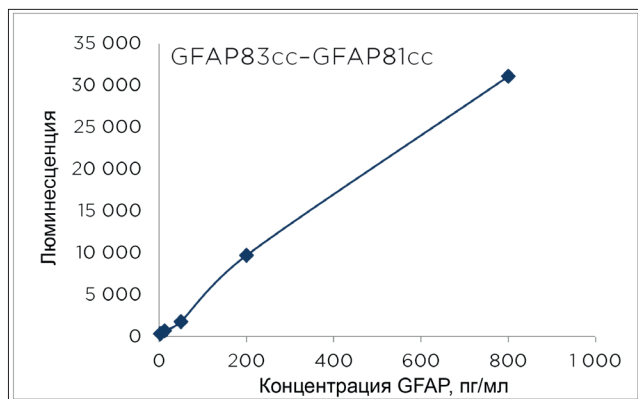


Рисунок 1.

Калибровочная кривая для пары GFAP83cc-GFAP81cc (подложка-детекция) с использованием нативного GFAP в качестве антигена.

Определение GFAP в клинических образцах

В рамках исследования мы измерили уровень детекции GFAP в образцах плазмы пациентов с геморрагическим (N = 5) или ишемическим (N = 5) инсультом с использованием пары моноклонов GFAP83cc-GFAP81cc. Все образцы были взяты в течение первых 12 часов после инсульта. Результаты исследования представлены на Рисунке 2. Анализ с использованием указанной пары обнаружил GFAP в образцах плазмы только у пациентов, перенесших геморрагический инсульт. Это соотносится с выводами других исследований и позволяет предположить, что GFAP подходит для исключения других типов инсульта. В случае же ишемического инсульта уровень GFAP повысится позднее 12 часов.

Применение МоАт в иммуногистохимии

МоАт GFAP15cc, GFAP81cc и GFAP83cc подходят для использования в иммуногистохимии. Для примера мы покрасили GFAP в глиальных клетках с использованием моноклона GFAP81cc (Рисунок 3).

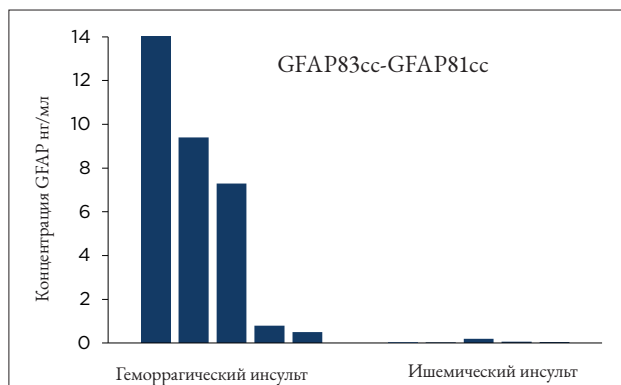


Рисунок 2.

Измерение уровня GFAP в образцах плазмы пациентов с геморрагическим и ишемическим инсультом с помощью прототипа иммунометрического анализа с парой моноклонов GFAP83cc-GFAP81cc.

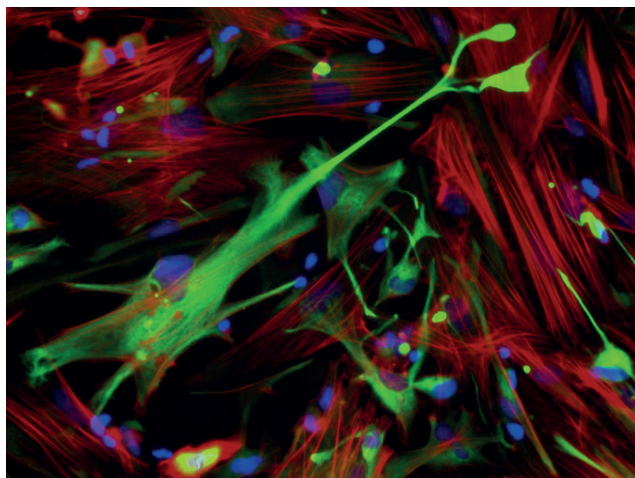


Рисунок 3.

Окрашивание GFAP в культивируемых глиальных клетках. Первичное антитело: GFAP81cc. Вторичное антитело: кроличьи антимышьяные поликлональные антитела, конъюгированные с Alexa-488 (зеленый).

Рекомбинантный GFAP

Наша компания предлагает рекомбинантный GFAP, который подходит для использования в качестве калибратора в иммуноанализах. Антиген состоит из аминокислот 60–383 человеческого GFAP и экспрессируется в *E. coli*. Чистота антигена более 90%. SDS-PAGE рекомбинантного GFAP показывает, что он мигрирует в виде одной полосы с кажущейся молекулярной массой 34 кДа (см. Рисунок 4). Обращаем ваше внимание, что GFAP – это фибриллярный белок, склонный к полимеризации. Кроме того, рекомбинантный GFAP склонен к образованию димеров, поэтому очищенный белковый препарат с высокой вероятностью будет содержать некоторое количество димерного GFAP.

Как избежать преципитации рекомбинантного GFAP?

Полимеризация GFAP может привести к осаждению белка при хранении. Особое значение в этом случае имеют температура, концентрация и буфер. Мы рекомендуем хранить белковые препараты при -70°C , восстанавливая лиофилизированный продукт до исходной концентрации (всегда менее 1 мг/мл), и избегать использования буферов с высокой ионной силой (например PBS).

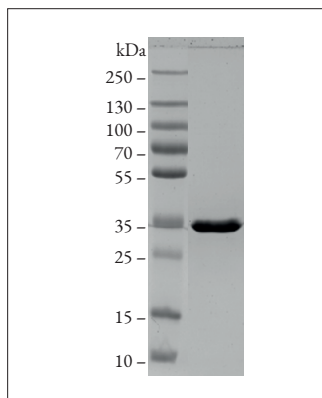


Рисунок 4.
SDS-PAGE рекомбинантного фрагмента GFAP в восстанавливающих условиях в градиентном геле (4–20%).
В гель погружали 2,5 мкг очищенного белка.

Рекомбинантный GFAP устойчив к циклам замораживания-оттаивания

Мы протестировали иммунохимическую стабильность рекомбинантного GFAP после нескольких циклов замораживания-оттаивания. В качестве проверки во время исследований мы восстанавливали лиофилизированный белок в дистиллированной воде или однопроцентном БСА. Иммунореактивность прототипа с использованием пары GFAP83сс-GFAP81сс существенно не изменилась даже после десяти циклов замораживания-оттаивания белка (см. Рисунок 5).

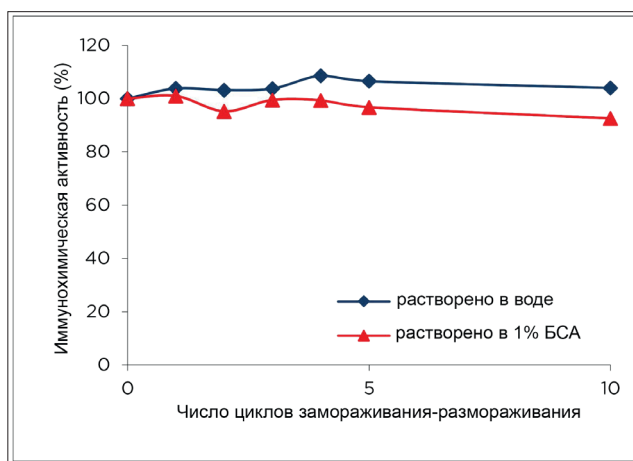


Рисунок 5.
Стабильность рекомбинантного GFAP при замораживании-оттаивании.
Лиофилизированный рекомбинантный GFAP, восстановленный в дистиллированной воде или 1% БСА, подвергался десяти циклам замораживания-оттаивания. Иммунореактивность после каждого цикла измеряли с помощью сэндвич-иммуноанализа на базе пары МоАт GFAP83сс – GFAP81сс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Middeldorp, J. & Hol, E. M.** GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* 93, 421–443 (2011).
2. **Foerch, C. et al.** Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. *Clinical Chemistry* 58, 237–245 (2012).
3. **Papa, L. et al.** Time course and diagnostic accuracy of glial and neuronal blood biomarkers GFAP and UCH-L1 in a large cohort of trauma patients with and without mild traumatic brain injury. *JAMA Neurology* 73, 551 (2016).
4. **Vos, P. E. et al.** GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: An observational cohort study. *Neurology* 75, 1786–1793 (2010).
5. **U.S. Food & Drug Administration.** FDA authorizes marketing of first blood test to aid in the evaluation of concussion in adults. FDA (2018). At <<http://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-authorizes-marketing-first-blood-test-aid-evaluation-concussion-adults>>
6. **Herrmann, M. et al.** Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 31, 2670–2677 (2000).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)	4G25	GFAP15cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, ИГХ
		GFAP81cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, ИГХ
		GFAP83cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, ИГХ
		GFAP94cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ
		GFAP98cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ

АНТИГЕН

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), человеческий, рекомбинантный	8G45	>90%	Рекомбинантный