



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Для исследований
и клинического
применения

Иммунология и
серология



Рекомбинантная тиреопероксидаза щитовидной железы человека



Тиреопероксидаза (thyroid peroxidase, ТРО, ТПО) представляет собой цельный трансмембранный гликопротеин апикальной мембраны фолликулярных клеток щитовидной железы, который катализирует перекисное окисление йода с последующим йодированием тирозина, а также соединение остатков йодтирозина в процессе синтеза гормонов щитовидной железы:

трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4) (Ruf and Carayon, 2006). В мембране ТПО обнаруживается в виде гомодимера с субъединицами с молекулярной массой приблизительно 103 кДа (Baker et al. 1994). Тиреопероксидаза - ключевой фермент в биосинтезе гормонов щитовидной железы и важнейший антиген при её аутоиммунных заболеваниях. Аутоантитела к ТПО являются наиболее часто представленными аутоантителами в сыворотке пациентов, страдающих аутоиммунным заболеванием щитовидной железы; они присутствуют у 90% больных тиреоидитом Хашимото и у 75% пациентов с болезнью Грейвса (Mariotti et al. 1990). Таким образом, иммуноанализы для количественного определения аутоантител против ТПО широко используются в клинической практике.

В течение многих лет нативная ТПО человека, выделенная из щитовидной железы, использовалась в качестве ключевого компонента - антигена - в таких анализах. Исследования, проведенные в начале 90-х годов, показали, что растворимый внеклеточный домен рекомбинантной ТПО человека, продуцируемой в клетках насекомых, обладает иммунохимическими свойствами, подобными нативной тиреопероксидазе щитовидной железы человека (Haubruck et al. 1993). Технические ограничения в производстве больших количеств рекомбинантной ТПО наложили некоторые ограничения на её широкое использование в тестах.

Рекомбинантная ТПО человека, предлагаемая компанией Хайтест, обладает иммунохимическими свойствами, подобными нативному антигену, выделенному из щитовидной железы человека. Она может быть использована в качестве антигена в анализах для выявления человеческих ТПО-специфических аутоантител в крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы.

Хайтест предлагает рекомбинантную ТПО человека, экспрессируемую в клетках насекомых, в виде растворимого внеклеточного домена ТПО человека (аминокислотные остатки 19-846). Расчетная молекулярная масса белка 91 981 Да. Рекомбинантная ТПО человека не содержит каких-либо тагов. Белок очищают до гомогенности с использованием методов аффинной и ионообменной хроматографии на основе специфичных к ТПО моноклональных антител (рис. 1). Две видимые белковые полосы (в области 100-110 кДа) на геле после электрофореза в геле SDS-PAGE принадлежат ТПО, поскольку в вестерн-блоттинге обе реагируют с моноклональными антителами, специфичными к ТПО. По-видимому, электрофоретическая гетерогенность ТПО обусловлена дифференциальным гликозилированием белка. Идентичность ТПО была также подтверждена с помощью масс-спектрометрии MALDI.

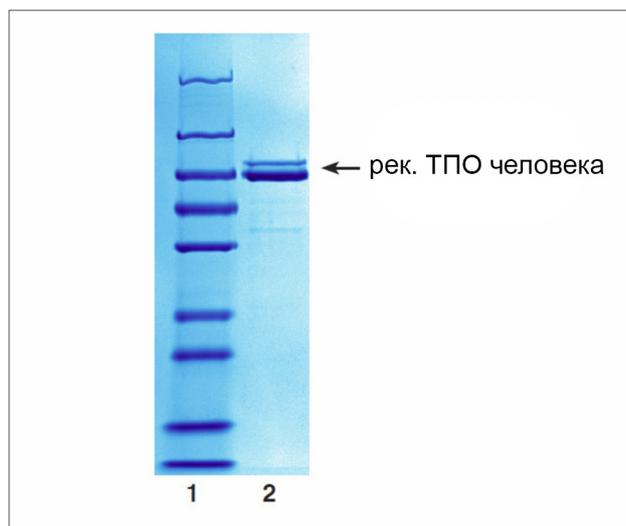


Рисунок 1. SDS-PAGE человеческой рекомбинантной ТПО, экспрессированной в клетках насекомых, восстанавливающие условия.

Полоса 1: Молекулярный весовой стандарт, Fermentas (250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 и 10 кДа).

Полоса 2: рекомбинантная ТПО человека, 1 мкг.

Окрашивание геля: Кумасси бриллиантовый синий G-250.

Иммунохимические свойства рекТПО человека анализировали в сравнении с ТПО, очищенной из щитовидной железы человека (нативная ТПО человека). В ELISA были протестированы сыворотки пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы с обоими препаратами ТПО, использованными в качестве антигена, нанесенного на поверхности планшетов (рис. 2).

Как следует из рис.2, рекомбинантная ТПО человека, произведенная компанией Хайтест, обладает иммунореактивностью очень схожей с таковой у нативного антигена. Коэффициент корреляции между значениями иммунохимической активности, полученными для рекомбинантной и нативной ТПО, составил 0,92 (n = 28). Эти данные позволяют предположить, что рекомбинантная тиреопероксидаза человека производства Хайтест может быть успешно использована в качестве антигена в иммуноанализах для выявления человеческих ТПО-специфических аутоантител.

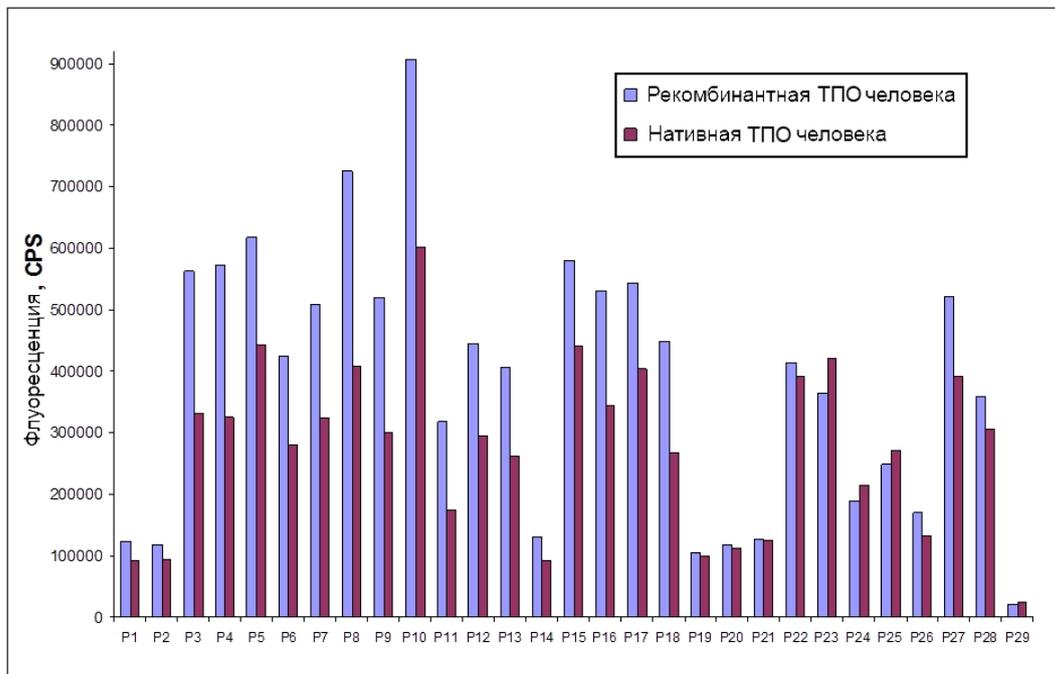


Рисунок 2. Сравнение иммунохимических свойств рекомбинантной и нативной ТПО человека, используемых в качестве антигенов для покрытия планшетов в ИФА. На планшеты для иммуноанализа наносили рекТПО или нативную ТПО (0,1 мкг/лунку). Сыворотки 28 пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы, а также одного здорового пациента (P29) разводили 1/50 и инкубировали в лунках в течение 1 часа. Затем связанные аутоантитела были обнаружены с помощью антител к IgG человека, меченных стабильным хелатом европия (Eu³⁺). Eu³⁺-флуоресцентные сигналы выражены в CPS.

Информация для заказа

АНТИГЕН

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Рекомбинантная тиреопероксидаза (ТПО)	8RTP0	>95%	Рекомбинантный

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Тиреопероксидаза (ТПО)	4TP15	6H7	IgG1	ИФА
		TPO28	IgG1	ИФА, ВБ
		TPO34	IgG1	ИФА, ВБ
		TPO35	IgG1	ИФА

Ссылки

1. **Ruf J, Carayon P**, Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. Arch. Biochem. Biophys. 2006, 445 (2): 269-77.
2. **Baker JR, Arscott P, Johnson J**, An analysis of the structure and antigenicity of different forms of human thyroid peroxidase. Thyroid. 1994, 4(2):173-8.
3. **Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G, Pinchera A**, Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. J Clin Endocrinol Metab. 1990, 71(3):661-9.
4. **Haubruck H, Mauch L, Cook NJ, Steffens U, Hunt N, Berthold H, Niemann H, Wirbelauer C, Northemann W**. Expression of recombinant human thyroid peroxidase by the baculovirus system and its use in ELISA screening for diagnosis of autoimmune thyroid disease. Autoimmunity. 1993, 15(4):275-84.