



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Клиника и
исследования

Исследования



GAPDH (Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа)



GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) хорошо известен как один из ключевых ферментов, участвующих в гликолизе. GAPDH катализирует обратимое окислительно-восстановительное фосфорилирование глицеральдегид-3-фосфата. По последним данным, GAPDH млекопитающих, помимо функции роста ферментов гликолиза в цитоплазме,

участвует во множестве внутриклеточных процессов, таких как слияние мембран, связывание микротрубочек, фосфотрансферазная активность, экспорт ядерных РНК, репликация и репарация ДНК.

В течение последних десятилетий было сделано много выводов относительно роли GAPDH в различных патологиях, в том числе прогрессирование рака предстательной железы, программируемой гибели нейронных клеток и возрастные неврологические заболевания, такие как болезни Альцгеймера и Хантингтона.

Молекула GAPDH представляет собой гомотетрамер, состоящий из субъединиц массой 36 кДа, а молекулярный вес всей молекулы - 144 кДа. Так как GAPDH постоянно и стабильно экспрессируется почти во всех тканях на высоком уровне, GAPDH хорошо зарекомендовал себя как белок обще клеточных (неспецифических) функций и широко используется в качестве контроля нагрузки для нормализации белка в таких исследованиях, как вестерн-блоттинг, что актуально для визуализации клеток в микроскопических исследованиях. Такие заболевания как гипоксия и диабет, могут увеличивать экспрессию GAPDH в определенных типах клеток.

Моноклональные антитела, специфичные к GAPDH

Моноклональные антитела (МоАт) к GAPDH, разработанные Хайтест, подходят для иммунодетекции GAPDH с помощью вестерн-блоттинга, сэндвич-иммуноанализов и иммуноцитохимических применений. Особенно хорошо изучен клон 6С5сс.

Сэндвич-иммуноанализ для количественного определения GAPDH

GAPDH-специфические моноклональные антитела тестировали в парах подложка-детекция, чтобы выбрать лучшую комбинацию двухсайтовых МоАт для разработки количественного сэндвич-иммуноанализа. Наиболее эффективной выбранной парой для количественной иммунодетекции человеческого GAPDH является пара (подложка-детекция): 6С5сс - 4G5.

Иммунодетекция GAPDH в прямом ИФА

Все МоАт к GAPDH распознают человеческий GAPDH в прямом ELISA (рис. 1).

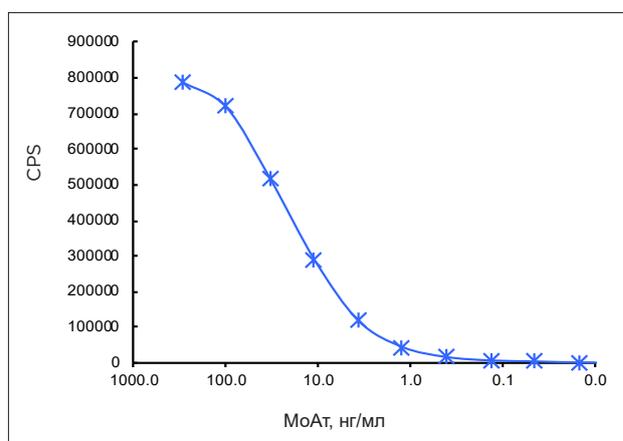


Рисунок 1. Взаимодействие клона 4G5 МоАт к GAPDH с GAPDH, выделенным из сердечной ткани человека, в методе прямого флуоресцентного иммуноанализа.

Для покрытия планшетов использовали 100 нг человеческого антигена на лунку.

Иммунодетекция GAPDH с помощью вестерн-блоттинга

МоАт к GAPDH тестировали на их способность распознавать GAPDH из экстракта тканей различных видов животных и лизатов различных типов клеток в вестерн-блоттинге (рис. 2). Все МоАт с высокой чувствительностью определяют человеческий GAPDH с помощью вестерн-блоттинга и демонстрируют кросс-реактивность с GAPDH различных животных. Это позволяет применять МоАт к GAPDH в биохимических и иммунохимических исследованиях самых разнообразных объектов.

Мы настоятельно рекомендуем клон 6C5с как наиболее подходящий для вестерн-блоттинга, однако клон 4G5 также успешно используется в вестерн-блоттинге. Рекомендуемая концентрация МоАт для вестерн-блоттинга составляет 0,5–1 мкг/мл. Стандартные протоколы вестерн-блоттинга можно легко применить ко всем моноклональным антителам к GAPDH, что было подтверждено многочисленными исследованиями (см. ссылки на стр. 3).

МоАт к GAPDH, производимые Хайтест, обладают широкой перекрестной активностью с другими животными и могут быть выбраны в соответствии с потребностями клиентов (см. Таблицу 1). Так как GAPDH высоко консервативен у разных животных, вполне вероятно, что МоАт к GAPDH Хайтест можно применять для животных, которые не представлены в табл.1.

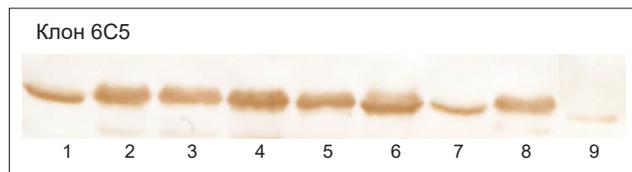


Рисунок 2. Иммунодетекция GAPDH в экстрактах тканей с использованием клона 6C5 в вестерн-блоттинге после SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. Экстракты из сердечной ткани были приготовлены из разных видов животных. На дорожку наносили около 0,25 мг гомогенизированной влажной сердечной ткани. МоАт 6C5 конъюгировали с HRP.

Дорожка 1: человек, Дорожка 2: собака, Дорожка 3: кошка, Дорожка 4: свинья, Дорожка 5: кролик, Дорожка 6: крыса, Дорожка 7: утка, Дорожка 8: курица, Дорожка 9: рыба

Таблица 1. Кросс-реактивность МоАт с GAPDH разных видов животных.

Клон	Кросс-реактивность в вестерн-блоттинге									
	Чел.	Корова	Свинья	Коза	Собака	Кролик	Кошка	Крыса	Мышь	Рыба
6C5	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4G5	++	++	++	++	+	+	++	++	++	+

Иммунопреципитация GAPDH из экстрактов тканей и лизатов клеток

Иммунопреципитация – это широко используемая процедура, с помощью которой пептиды или белки, которые специфически реагируют с антителом, могут быть удалены из раствора. Эта технология обеспечивает быстрый и простой метод отделения определенного белка от лизатов цельных клеток, экстрактов тканей или супернатантов культур. Кроме того, этот метод можно использовать для изучения биохимических характеристик, посттрансляционных модификаций, уровней экспрессии или для подтверждения идентичности интересующего белка. Некоторые из моноклональных антител к GAPDH, предлагаемых Хайтест, могут применяться для иммунопреципитации. На рисунке 3 представлены примеры использования клонов 6C5 и 4G5 для экстрагирования GAPDH из различных тканевых экстрактов.

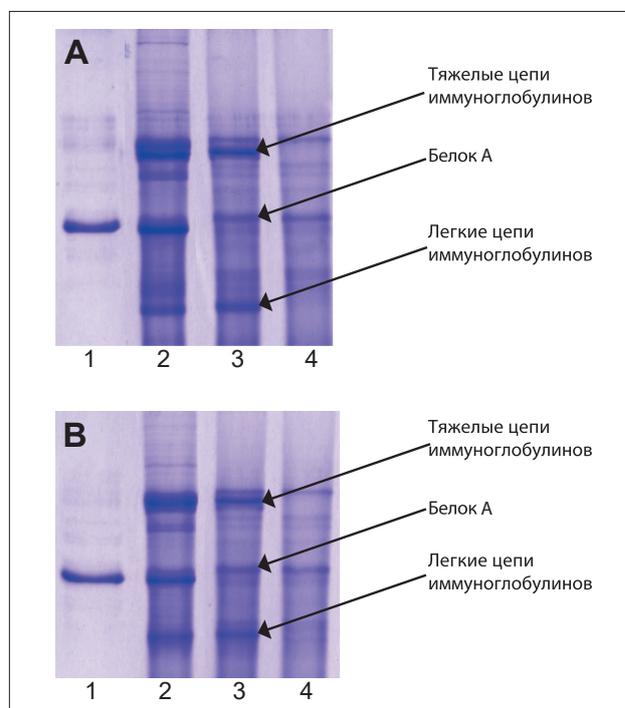


Рисунок 3. Иммунопреципитация GAPDH из экстракта сердечной мышцы крысы с использованием клонов 6C5 (А) или 4G5 (В), специфичных к GAPDH.

Смесь белок А-сефарозы с МоАт к GAPDH и экстрактом тканей инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и осаждали центрифугированием. Осадок промывали PBS, суспендировали в восстанавливающем буфере для образцов для электрофореза и нагревали в течение 5 минут при 100°C. После центрифугирования супернатант наносили на гель, и белки разделяли электрофорезом в SDS.

Дорожка 1: GAPDH человека (1 мкг)
Дорожка 2: GAPDH, иммунопреципитированный из экстракта ткани сердца крысы.

Дорожка 3: Только клоны 6C5 (А) или 4G5 (В), предварительно инкубированные с белок А-сефарозой.

Дорожка 4: Только белок А-сефароза

Иммуноцитохимическое определение GAPDH

В живой клетке GAPDH представлен преимущественно в цитоплазме. Недавние исследования показали, что в зависимости от метаболического статуса клетки GAPDH может быть связан с другими клеточными компартментами, такими как лизосомы, синаптические везикулы, цитоскелет и плазматические мембраны. Было показано, что GAPDH, как растворимый белок, служит транспортным белком между внутриклеточными сайтами. Считается, что перемещение GAPDH в ядро связано с гибелью клеток. Известно, что ядерная форма GAPDH отличается по конформации и биохимическим свойствам от цитоплазматической и колокализована с фрагментированным и/или конденсированным хроматином. Таким образом, иммуноцитохимическое определение точной локализации GAPDH является чрезвычайно полезным и утвержденным инструментом для исследования метаболизма и функциональной активности клеток. Рисунок 4 демонстрирует применение моноклональных антител специфичных к GAPDH производства компании Хайтест для иммуноцитохимического обнаружения GAPDH в различных типах клеток.

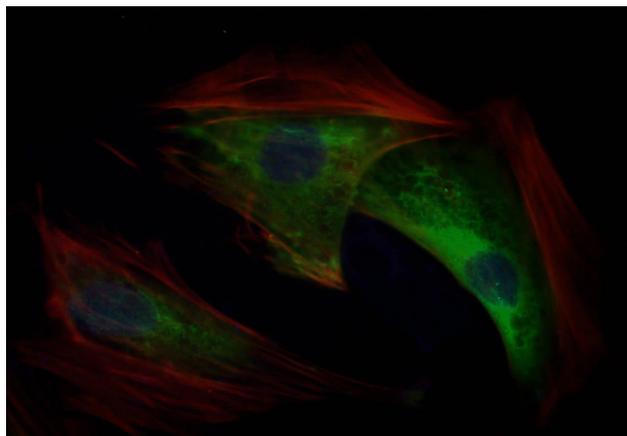


Рисунок 4. Иммуноокрашивание GAPDH в клеточной линии A-10 (гладкомышечные клетки аорты крысы).
Клетки фиксировали формалином и GAPDH окрашивали:
Клон 6C5 (зеленый цвет)
Краситель, связывающий F-актиновые микрофиламенты (красный)
ДНК-связывающий краситель (темно-синий)

Информация для заказа

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Cat. #	Клон	Подкласс	Примечания
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH)	5G4	6C5	IgG1	ИФА, ВБ, ИФ, ИГХ, ИП, доступны данные по к/р (ВБ контроль)
		4G5	IgG1	ИФА, ВБ, ИФ, ИГХ, ИП
	5G4cc	6C5cc	IgG1	In vitro, ИФА, ВБ, ИФ, ИГХ, ИП, доступны данные по к/р (ВБ контроль)

Ссылки

- Bentham M et al.** Role of myristoylation and N-terminal basic residues in membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein. *J Gen Virol* 87:563-71 (2006).
- Lee DC et al.** Enhanced cystatin C and lysosomal protease expression following 6-hydroxydopamine exposure. *Neurotoxicology* 27:260-76 (2006).
- Rouleau C et al.** Protein tyrosine phosphatase PRL-3 in malignant cells and endothelial cells: expression and function. *Mol Cancer Ther* 5:219-29 (2006).
- Dove B et al.** Cell cycle perturbations induced by infection with the coronavirus infectious bronchitis virus and their effect on virus replication. *J Virol* 80:4147-56 (2006)
- Fraser M et al.** Regulation of p53 and suppression of apoptosis by the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway in human ovarian cancer cells. *Oncogene* 25:2203-12 (2006).
- Carroll RC et al.** Prospective evaluation of platelet B2 bradykinin and thrombopoietin receptor levels from preeclamptic compared to non-preeclamptic pregnancy patients. *Thromb Res* 117:551-6 (2006).
- Fediuc S et al.** Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol* 100:1867-75 (2006).
- Grigorieva JA, Dainiak MB, Katrukha AG, Muronetz VI.** Antibodies to the nonnative forms of d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: identification, purification, and influence on the renaturation of the enzyme. *Arch Biochem Biophys*. 369(2):252-60 (1999).
- Dainiak MB, Izumrudov VA, Muronetz VI, Galaev IY, Mattiasson B.** Conjugates of monoclonal antibodies with polyelectrolyte complexes-- an attempt to make an artificial chaperone. *Biochim Biophys Acta*. 1381(3):279-85 (1998).