



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Клиника и
исследования

Неврология



Легкие нейрофиламенты (NfL)



Нейрофиламенты являются основными белками цитоскелетной структуры нейронов (1). Их диаметр составляет примерно 10 нм - толще актина и тоньше миозина. Поэтому они классифицируются как промежуточные филаменты (IF) наряду с филаментами, построенными из кератинов, ядерных ламинов и других членов семейства белков IF.

Нейрофиламенты состоят из четырех различных субъединиц, стехиометрия которых зависит от зрелости нейрона. Три из этих субъединиц - NfL (легкая), NfM (средняя) и NfH (тяжелая) – всегда входят в состав и относятся к IF-белкам IV типа. Четвертая субъединица может быть либо α -интернексином (также IV тип), либо периферином (тип III) для центральной и периферической нервной системы соответственно (см. Рисунок 1). NfM и NfH, которые имеют длинные и сильно заряженные С-концевые домены, в основном обнаруживаются снаружи филаментов, тогда как NfL вместе с α -интернексином или периферином формируют основу филамента (2). Таким образом, NfL играет решающую роль в процессе полимеризации нейрофиламентов, а также в поддержании структуры аксонов.

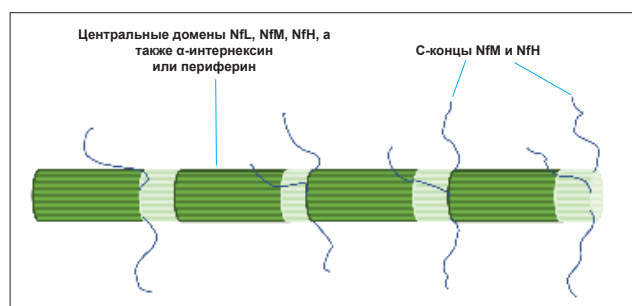


Рисунок 1. Субъединицы нейрофиламентов.

Биохимические свойства NfL

Все NF имеют вариабельную N-концевую глобулярную головку, консервативный альфа-спиральный стержневой домен, несущий гидрофобные повторы, облегчающие формирование спиральной катушки, а также С-концевой домен. Нейрофиламенты проходят через посттрансляционные модификации, фосфорилирование и гликозилирование в их головной и хвостовой областях (3). Эти модификации способствуют формированию, структуризации и выполнению NfL различных функций NF (2). Головной домен человеческого NfL содержит остатки серина и треонина, которые подвергаются фосфорилированию, а сайты терминации транскрипции - O-гликозилированию. Концевые домены NfM и NfH содержат богатые глутаминовой кислотой и лизином фрагменты различной длины, а также множественные участки для фосфорилирования серина. В то же время у NfL С-концевые участки гораздо короче, поэтому они фосфорилируются с меньшей интенсивностью. NfL человека состоит из 543 аминокислотных остатков с общей теоретической pI 4,63 и молекулярной массой 61,4 Да. NfL может сформировать гомополимеры in vitro (2). Схематическое изображение сборки нейрофиламентов in vivo представлено на Рисунке 2.

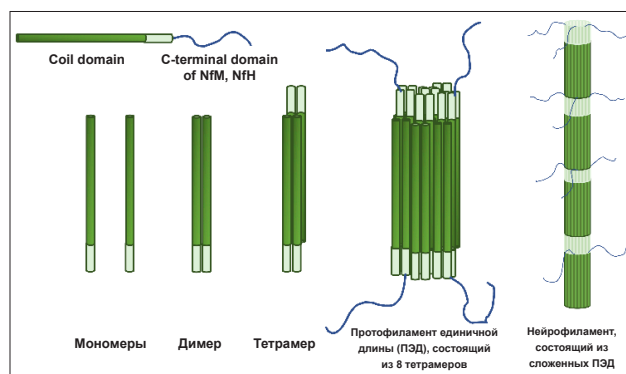


Рисунок 2. Схематическое изображение сборки нейрофиламентов.

Клиническое применение:

- ✓ Черепно-мозговая травма
- ✓ Нейродегенеративные заболевания

NfL как диагностический маркер повреждения нейронов

Повреждение аксонов и нейродегенерация приводят к появлению нейрональных белков в спинномозговой жидкости (СМЖ). Нейрофиламенты представляют собой наиболее широко распространённые белки, которые экспрессируются исключительно в нейронах, поэтому они могут служить отличным маркером дегенерации нейронов (4). Многочисленные исследования показали, что нейрофиламенты могут быть маркерами таких острых состояний (как инсульт или травма), а также ряда неврологических заболеваний - болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, лобно-височная деменция, диабетическая невропатия, и другие патологические процессы, сопровождающие центральные или периферические невропатии (5). Наблюдение уровня NfL в спинномозговой жидкости или крови полезно для построения прогноза развития различных острых и хронических неврологических заболеваний, а также для оценки эффективности лечения (4).

Реагенты для разработки надежного анализа NfL

Наша компания предлагает несколько моноклональных антител (МоАт), которые распознают NfL в СМЖ с высокой специфичностью и чувствительностью и подходят для разработки чувствительного и специфического иммуноанализа NfL. Наши антитела не обладают кросс-реактивностью с белками IF типа III (Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), виментин, десмин, периферин) и некоторыми другими нейронными белками. Пары МоАт эффективно распознают как рекомбинантный, так и эндогенный NfL, и их можно использовать для различных иммунологических анализов, таких как прямой ИФА, непрямой ИФА и иммунологических анализов сэндвич-типа. Наши антитела — хороший выбор для разработки высокочувствительных иммунологических анализов, таких как хемилюминесцентный (CLIA), иммунологический анализ одиночных молекул (SIMOA) и других.

Моноклональные антитела, специфичные к NfL человека

Мы предоставляем несколько МоАт, специфичных к NfL человека, полученных от трех видов животных и предназначенных для использования в иммунологических анализах, специфичных к NfL. Более подробная информация представлена в Таблице 1.

Таблица 1. Список МоАт к NfL человека производства ХайТест.

МоАт	Вид-источник	Изотипы
NF31	Мышь	IgG2b
NF36	Кролик	IgG
NF71	Мышь	IgG2b
NF79	Крыса	IgG2b

Все МоАт эффективно обнаруживают NfL в различных приложениях. Из пяти возможных пар МоАт, перечисленных в Таблице 2, мы в первую очередь рекомендуем пары NF79-NF71, NF79-NF36 и NF36-NF71. Однако, поскольку эффективность анализа зависит от платформы, метки, буфера, условий анализа и т. д., мы рекомендуем использование дополнительных захватывающих или детектирующих антител для создания комбинаций 2+1 или 1+2 с целью повышения эффективности анализа.

Таблица 2. Пары наших МоАт для сэндвич-иммуноанализа NfL, рекомендуемые пары отмечены зеленым цветом.

Захват \ Детекция	NF31	NF36	NF71
NF36	+		+
NF71	+		
NF79		+	+

Детектирующие антитела могут быть помечены HRP, ALP, биотином или другими метками. На Рисунках 3 и 4 показаны примеры калибровочных кривых для прототипа анализа на основе пар NF79-NF71 - колориметрического и CLIA соответственно. Предел обнаружения (LoD) в лучшем прототипе сэндвич-иммуноанализа составил 30 пг/мл для колориметрической версии и 10 пг/мл для версии CLIA соответственно. Чувствительность анализа для наших МоАт может быть значительно повышена за счет использования высокочувствительных платформ (SIMOA и другие).

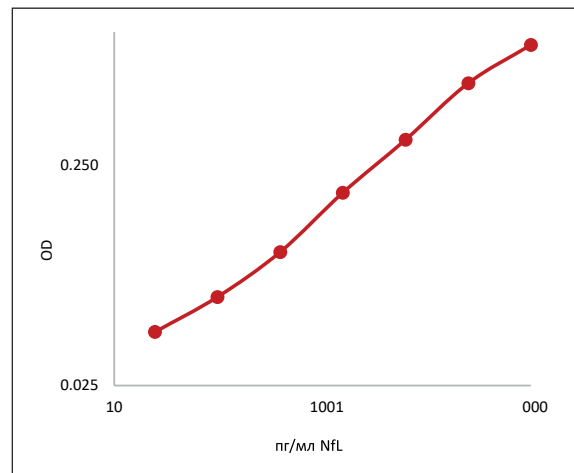


Рисунок 3. Калибровочная кривая для прототипа анализа на основе пар NF79-NF71. 3-этапный сэндвич-иммуноанализ. Детектирующие антитела наносили на планшеты Costar EIA/RIA. В качестве калибратора использовали очищенный эндогенный бычий NfL (Uman Diagnostics). Детектирующие клоны метили биотином. Для выявления иммунных комплексов использовали конъюгат стрептавидин-HRP.

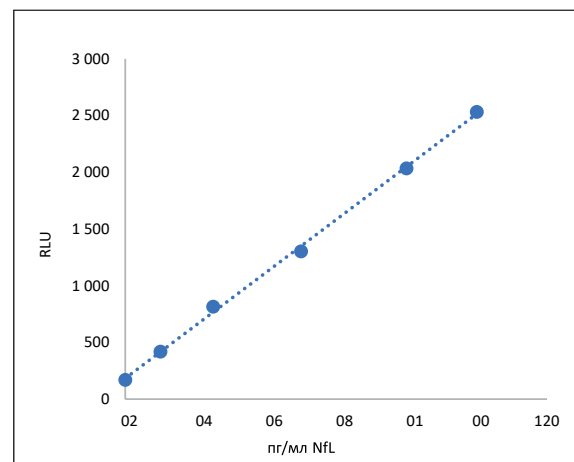


Рисунок 4. Калибровочная кривая для прототипа анализа CLIA на основе пар NF79-NF71. 1-этапный сэндвич-иммуноанализ. Антитела подложки наносили на магнитные шарики стрептавидина. В качестве калибратора использовали внутренний рекомбинантный NfL нашей компании. Детектирующие МоАт метили эфиром акридиния. Иммунные комплексы выявляли с помощью измерения хемилюминесценции.

Специфичность прототипов анализа NfL

Было изучено большое количество белков IF типа III и некоторых других нейронных белков для тестирования прототипов иммуноанализа сэндвич-типа. Наши исследования не установили какой-либо перекрестной активности с белками

IF типа III или другими протестированными нейрональными белками. Более подробная информация представлена на Рисунке 5.

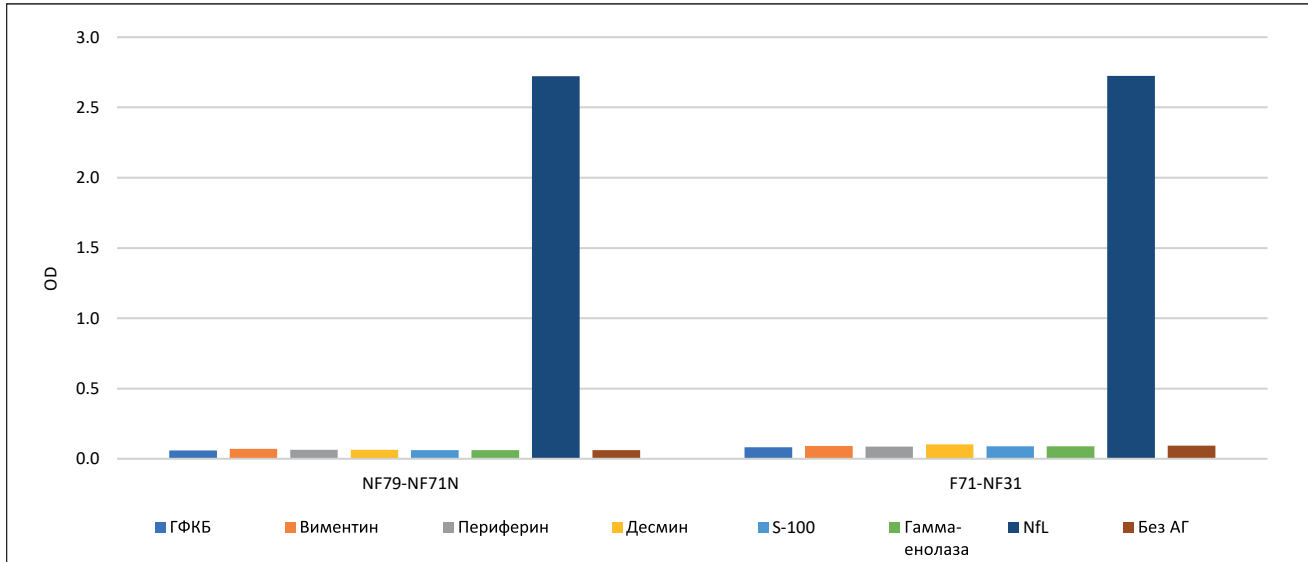


Рисунок 5. Кросс-реактивность различных прототипов анализов на различные нейрональные белки. Иммуноанализ сэндвич-типа проходил в 3 этапа. Рекомбинантные белки добавляли в концентрации 1000 нг/мл с рекомбинантным NfL для положительного контроля.

Обнаружение NfL в клинических образцах

Анализы, в которых применяются наши пары моноклональных антител (МоАт), подходят для измерения эндогенного NfL в образцах СМЖ. На Рисунке 6 представлена кривая титрования NfL в спинномозговой жидкости, измеренная с помощью прототипа ИФА-анализа на основе пары NF79-NF71. Тест-прототип NF79-NF71 также использовался для иммунодетекции NfL в образцах спинномозговой жидкости нескольких пациентов с различными диагнозами. В зависимости от диагноза, уровни NfL были низкими, умеренными или высокими (Рисунок 7).

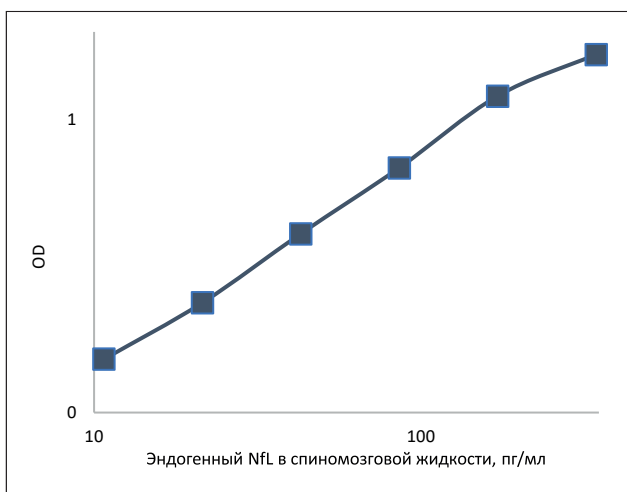


Рисунок 6. Кривая титрования эндогенного NfL в образце СМЖ. Кривая титрования получена с использованием прототипа на паре NF79-NF71 в сэндвич-иммуноанализе. Концентрация NfL в СМЖ была предварительно измерена с помощью анализа Uman Diagnostics NF-light® ELISA.

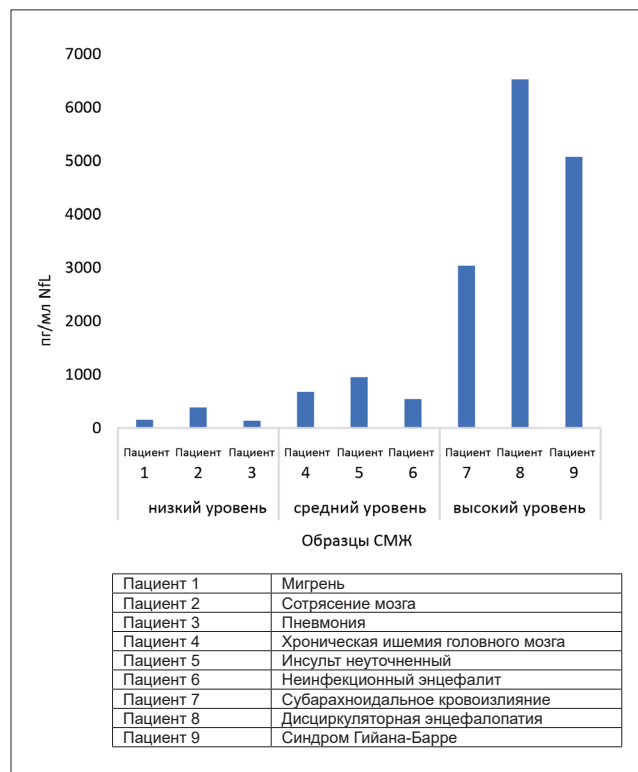


Рисунок 7. Иммунодетекция NfL в образцах СМЖ с помощью прототипа трехэтапного сэндвич-иммуноанализа собственного производства на основе пары NF79-NF71. Диагнозы пациентов представлены в соседней таблице. Образцы СМЖ разбавляли 4-5 раз перед измерением.

Пациент 1	Мигрень
Пациент 2	Сотрясение мозга
Пациент 3	Пневмония
Пациент 4	Хроническая ишемия головного мозга
Пациент 5	Инсульт неуточненный
Пациент 6	Неинфекционный энцефалит
Пациент 7	Субарахноидальное кровоизлияние
Пациент 8	Дисциркуляторная энцефалопатия
Пациент 9	Синдром Гийана-Барре

Протитипы анализов демонстрируют хорошую корреляцию с анализами, представленными на рынке. 23 образца СМЖ реальных пациентов в различных состояниях анализировались при помощи NF-Light® ELISA (Uman Diagnostics) (доступен в продаже), а также тремя тестами-прототипами на основе пар NF79-NF71, NF79-NF36 и NF36-NF71. Все упомянутые анализы представляют собой трехэтапные ИФА сэндвич-типа с биотинилированными детектирующими МоАт. Все протитипы анализов на основе наших МоАт продемонстрировали хорошую линейную корреляцию с упомянутым тестом другого производителя.

МоАт NF36 к NfL также подходят для иммунохимического окрашивания. Результаты такого окрашивания представлены на Рисунке 9.

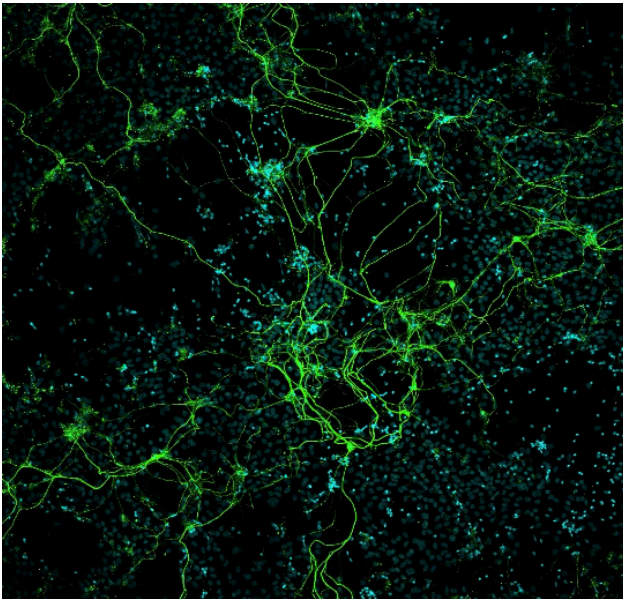


Рисунок 9. Иммунохимическое окрашивание NfL в культивируемых мышинных нейронах. Нейроны выделяли из гиппокампа эмбриона мыши. Первичное антитело - NF36, вторичное - кроличьи поликлональные антитела, конъюгированные с Alexa-488 (зеленый). Ядра окрашивали посредством Hoechst 33342.

Информация для заказа

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Легкие нейрофиламенты (NfL) человека	4NF3	NF31	IgG2b	ИФА
		NF71	IgG2b	ИФА
		NF36	IgG	ИФА, ИГХ, рекомбинантное кроличье антитело
		NF79	IgG2b	ИФА, красное моноклональное антитело

Ссылки

1. **Lee MK, Cleveland DW.** Neuronal intermediate filaments. Annual Review of Neuroscience. 1996, 19 pp.187-217.
2. **Yuan A et al.** Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2017, Apr 3; 9(4): a018309.
3. **Grant P, Pant HC.** Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. Journal of Neurocytology. 2000, 29 (11-12) pp. 843-72.
4. **Khali M et al.** Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. Nature Review Neurology. 2018, Oct; 14(10) pp. 577-589.
5. **Braissant O.** Neurofilament Proteins in Brain Diseases. New Research on Neurofilament Proteins. 2007, pp. 25-51.

ООО «Хайтест»
117105, Россия, г. Москва,
Варшавское шоссе, д. 28А

E-mail: hytest@hytest.ru,
sales@hytest.ru
www.hytest.ru

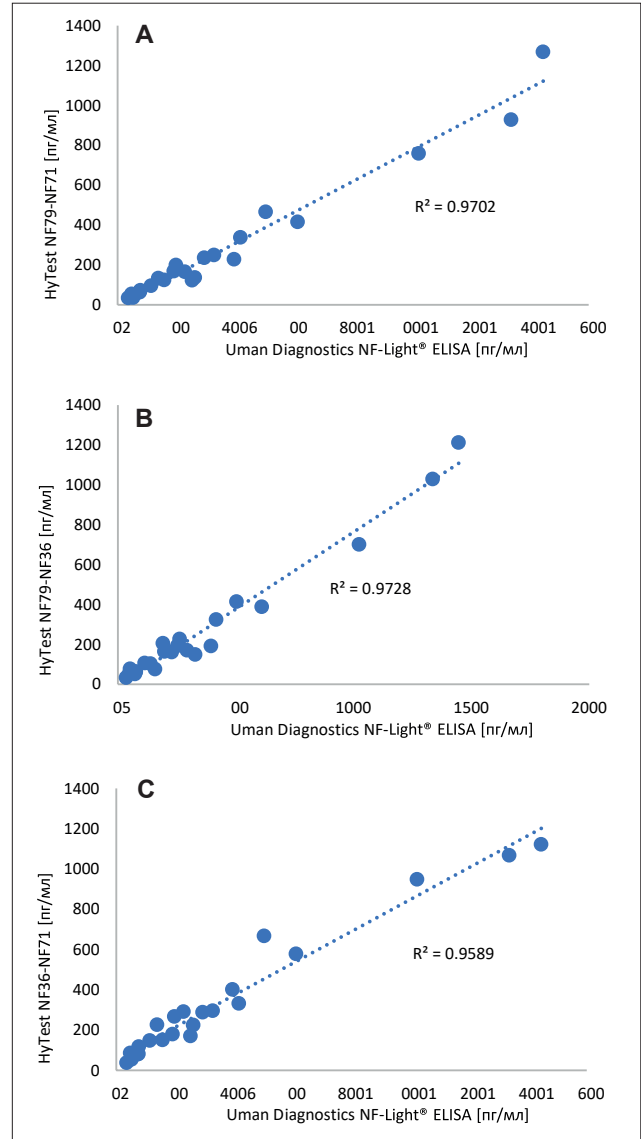


Рисунок 8. Корреляция между результатами измерения NfL в 23 образцах спинномозговой жидкости с помощью NF-Light® ELISA (Uman Diagnostics) и трех прототипов ELISA анализов с антителами нашей компании: А) NF79-NF71, В) NF79-NF36 и С) NF36-NF71.