

УДК 57.089.23
©Н. А. Шевчук.

ВРЕМЯРАЗРЕШЁННЫЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НА ДНК И ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА

Н. А. ШЕВЧУК.

Институт биоорганической химии Сибирского отделения РАН

О внеклеточной ДНК крови известно, что она присутствует в очень низких концентрациях и её уровень способен значительно повышаться при некоторых злокачественных опухолях, системной красной волчанке и радиационном поражении. Нашей задачей была разработка количественного метода анализа для исследования уровня ДНК в сыворотке крови человека в норме и при патологии. Для этого были разработаны подходы к индукции антител класса G к нативной ДНК млекопитающих. Успешной оказалась иммунизация кроликов комплексом метилированного БСА с ДНК и в результате у одного из шести животных была получена антисыворотка против нативной ДНК млекопитающих (содержащая помимо иммуноглобулинов класса M антитела класса G). На основе анти-ДНК антител класса G был разработан времяразрешённый иммунофлуоресцентный сэндвич-анализ на ДНК. Чувствительность метода составляет 8 пкг/мл, а рабочий диапазон от 10 пкг до 1000 000 пкг/мл. При помощи времяразрешённого сэндвич-анализа были исследованы образцы сывороток здоровых доноров, больных вирусными гепатитами и аутоиммунным тиреоидитом. Концентрация ДНК в сыворотке здоровых доноров составляет $0,62 \pm 0,49$ нг/мл (среднее \pm среднеквадратическое отклонение). У 19 больных вирусным гепатитом (В или С) и 14 пациентов с аутоиммунным тиреоидитом сывороточная концентрация ДНК значительно повышена и составляет соответственно $2,3 \pm 6,6$ и 105 ± 175 нг/мл. Высокий уровень внеклеточной ДНК в крови может являться одной из причин индукции ДНК-гидролизующих антител, которые часто встречаются при этих заболеваниях. Поскольку представленный сэндвич-метод способен определять следовые количества ДНК на фоне высоких концентраций белка в сыворотке крови, он может быть также рекомендован для анализа и других биологических жидкостей.

Ключевые слова: времяразрешённый анализ, антитела к ДНК, ДНК крови, аутоиммунный тиреоидит, вирусный гепатит

Настоящий адрес: Nikolai Shevchuk, Center II, CRI, 111 Michigan Ave, NW, Washington, DC 20010, USA. Phone: (202) 861-0596, Fax: (202) 994-0967
E-mail: niash@gwu.edu

ВВЕДЕНИЕ. В начале 60-х годов появились первые сообщения о наличии свободных нуклеиновых кислот в системе кровообращения человека и они оставались долгое время предметом дискуссий из-за несовершенства используемых методов, таких как, например, спектрофотометрия и фосфатный метод [1]. Тем не менее, большинством исследователей был принято, что внеклеточная ДНК присутствует в крови в очень низких концентрациях, и у некоторых больных системной красной волчанкой (СКВ) уровень ДНК может быть повышен [2]. С появлением более чувствительных и специфичных методов определения ДНК, таких как радиоактивное мечение с предварительной фенольной очисткой, радиоиммуноанализ, повышение концентрации сывороточной ДНК помимо СКВ было отмечено при некоторых злокачественных опухолях и радиационном поражении [3]. Интересные корреляции между уровнем сывороточной ДНК и прогнозом развития опухоли были найдены у больных с опухолями органов желудочно-кишечного тракта [4]. При радиационном поражении уровень ДНК в крови прямо пропорционален тяжести поражения и понижается при улучшении состояния больных. Однако у больных СКВ на сегодня нельзя сделать однозначного вывода о тяжести заболевания или прогнозировать его дальнейшее течение на основе уровня свободной ДНК и антител к ДНК в крови, хотя найдены корреляции с достаточно редкими осложнениями. Необходимо также отметить, что гепатиты и некоторые аутоиммунные заболевания, как например, ревматоидный артрит и рассеянный склероз характеризуются наличием ДНК-связывающих антител [5].

Вопрос о нормальной концентрации нуклеиновых кислот в крови человека до сих пор остаётся спорным в основном из-за недостаточной чувствительности и точности существующих методов. Наличие специфических антител к ДНК позволяет предположить участие свободной или связанной ДНК в индукции этих антител [6]. Следовательно, определение уровня свободной и связанной с клетками ДНК, а также исследование состава и свойств ДНК-белковых комплексов необходимо для понимания патогенеза приведённых выше заболеваний и может оказаться перспективным прогностическим критерием. Целью данной работы была разработка высокочувствительного количественного метода анализа ДНК в сыворотке крови человека.

Флуоресцентные методы анализа, в которых в качестве метки используются хелаты редкоземельных элементов, в последние годы получают всё более широкое распространение [7]. Флуоресценция большинства белков и органических соединений имеет время релаксации в диапазоне 10^{-8} — 10^{-9} с [7], при этом время релаксации возбуждённого состояния лантаноидов находится в пределах 10^{-3} — 10^{-6} с. Эта разница позволяет полностью устранить фоновую флуоресценцию присутствующих в образце органических соединений если использовать времяразрешённую детекцию. Поскольку времяразрешённые флуоресцентные методы позволяют определять концентрации европия до 5×10^{-14} М [7], чувствительность таких методов анализа как правило превышает чувствительность радиоизотопных методов на несколько порядков.

Оптимальным для исследования концентрации ДНК в биологических жидкостях было бы применение времяразрешённой флуороиммунометрии в виде конкурентного либо сэндвич-анализа. Однако, основным препятствием при разработке иммуноаналитической системы такого рода является получение антител к нативной ДНК. Из существующих методов было бы целесообразно

выделять антитела из высокотитражной сыворотки больного СКВ либо воспользоваться одним из экзотических способов индукции антител к нативной ДНК у животных [8,9].

МЕТОДИКА. Образцы сыворотки крови больных и здоровых доноров были получены в 333 Окружном военном клиническом госпитале (Новосибирск) и хранились при -20° .

Фрагментация ДНК. 15 мл раствора ДНК из тимуса телёнка («Sigma», США) 10 мг/мл в буфере TE (0,01 М трис-НСl рН 7,8, 0,01 М ЭДТА) обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДНТТ (Москва) на ледяной бане в течение 100 минут при 44 кГц.

Иммунизация животных. Полученный по методу [10] метилированный бычий сывороточный альбумин (мБСА) растворяли в дистиллированной воде (2 мг/мл). Для приготовления комплекса мБСА с ДНК, раствор фрагментированной ДНК 2 мг/мл в дистиллированной воде денатурировали добавлением 19 М NaOH до 1 М, затем быстро нейтрализовали добавлением эквимолярного количества концентрированной HCl, смешивали с равным объёмом раствора мБСА и инкубировали 3 часа при 4° . Полученным комплексом мБСА с одноцепочечной ДНК (оц-ДНК) иммунизировали кроликов (возраст 6 мес., самцы породы шиншилла, виварий ИЦиГ, Новосибирск) по обычной схеме. Животным вводили 0,5 мг комплекса в виде эмульсии с полным адьювантом Фрейнда («Sigma», США) подкожно. Эмульсия состояла из равных объёмов адьюванта Фрейнда и раствора конъюгата 1 мг/мл в буфере PBS (0,15 М NaCl, 0,01 М натрий-фосфат рН 7,5). Инъекции в неполном адьюванте Фрейнда проводили на 14-й, 21-й, 28-й, 35-й, 42-й и 49-й дни, а забор крови у животных проводили на 40-й, 47-й и 54-й дни.

Исследование специфичности антисывороток. Специфичность полученных антисывороток была исследована при помощи пятенного иммуноанализа [12]. Конъюгат пероксидазы хрена с козьими антителами к кроличьему иммуноглобулину G (ТОО Биосан, Новосибирск) был изготовлен по методу [11] и хранился в виде взвеси в растворе сульфата аммония 50% от насыщения при 4° . Аналогичным образом исследовали специфичность сывороток больных СКВ (получены в Кемеровском онкологическом центре) с той разницей, что на последней стадии инкубации вместо конъюгата козьих антител против кроличьего иммуноглобулина G использовали конъюгат козьих антител против иммуноглобулина G человека, также полученный согласно [11].

Иммобилизация ДНК на Ультрагеле. Для выделения антител к двухцепочечной ДНК (дц-ДНК) готовили аффинные сорбенты по модифицированному методу [13] на основе Ультрагеля А2 («Pharmacia», Швеция).

Выделение антител к ДНК на ДНК-Ультрагеле. Суммарную фракцию иммуноглобулинов из кроличьей антисыворотки (25 мл раствора с 2 мМ ЭДТА («Sigma»)) наносили на колонку, содержащую 5 мл ДНК-Сефарозы, в течение 2 часов. Затем промывали колонку десятью объёмами (70 мл) буфера PBS с 0,05% Tween - 20 («Serva», Германия) и 2 мМ ЭДТА, потом десятью объёмами буфера PBS с 2 мМ ЭДТА и смывали специфические антитела буфером 0,1 М глицин-НСl рН 2,5, 0,5 М NaCl. Для нейтрализации рН раствора элюат собирали в буфер 1 М натрий-борат рН 7,5. Далее спектрофотометрически измеряли количество белка и диализовали элюат против трёх смен буфера PBS. Содержание классов

антител исследовали при помощи градиентного электрофореза в 10-20% ПААГ. Иммуноглобулины класса G были выделены при помощи гель-фильтрации на колонке (1 x 40 см) с Сефакрилом S-300 («Pharmacia»), уравновешенной в буфере 0,01 М натрий-фосфат pH 7,5, 0,5 М NaCl, 0,02% NaN₃ при скорости элюции 2,4 мл/ч. Антитела из фракций в объеме удержания 32-34 мл осаждали 40% нас. сульфатом аммония и дважды диализовали осадок против буфера PBS.

Мечение Fab₂ фрагментов европием. Fab₂ фрагменты антител к ДНК были выделены по методу [14]. Раствор изотиоцианофенилкомплексоната европия (НИБХ СО РАН) в дистиллированной воде добавляли из молярного соотношения реагента к белку 30:1 к раствору полученных Fab₂ фрагментов 0,22 мг/мл в 0,2 М натрий-боратном буфере pH 9 и инкубировали смесь 18 часов при 4°. Затем при помощи гель-фильтрации на колонке объемом 300 мкл с Сефадексом G-25 (superfine) («Pharmacia») отделяли меченые Fab₂ фрагменты от непрореагировавшего изотиоцианофенилкомплексоната [7].

Времяразрешенный сэндвич-анализ на ДНК. Состав рабочего буфера: 0,01 М трис-HCl pH 7,5, 0,15 М NaCl, 0,02% Tween 20. Состав усиливающего раствора: 0,1 М уксусная кислота, 0,1% Тритон X-100 («Serva»), 0,0068 М бифталат калия, 15 мкМ 2-нафтоилтрифторацетон (НИБХ СО РАН), 50 мкМ оксид три-*n*-октилфосфина («Reanal», Венгрия). Стадии инкубации проводились на встряхивателе «Elpan» 358S (Польша) при комнатной температуре. Из маточного раствора фрагментированной дц-ДНК из тимуса теленка (10 мкг/мл) готовили стандарты (10, 100, 1000, 10 000, 100 000, 1000 000 пкг/мл) на рабочем буфере. Fab₂ фрагменты анти-ДНК антител сорбировали из раствора с концентрацией 30 мкг/мл в буфере PBS (100 мкл на лунку) на стенках 96-луночных планшетов Titertek («Flow Laboratories», Англия) в течение 16 ч при 4°. Лунки трижды промывали рабочим буфером, после чего вносили по 100 мкл исследуемых образцов (в разведении 1:30) или стандартных растворов ДНК и инкубировали 1 ч. Далее лунки промывали 100 мкл рабочего буфера пять раз с промежуточной инкубацией 1 мин, вносили в них по 100 мкл раствора меченых европием Fab₂ фрагментов анти-ДНК антител 200 нг/мл в рабочем буфере и инкубировали 1 ч. Затем промывали лунки 100 мкл рабочего буфера четыре раза с промежуточной инкубацией в течение 1 мин, добавляли 100 мкл усиливающего раствора, инкубировали 5 мин с перемешиванием и 15 мин без перемешивания. Далее переносили образцы в полистирольные кюветы, измеряли времяразрешенную флуоресценцию при помощи флуориметра Argus 1230 (США), для каждого планшета строили калибровочную кривую и определяли концентрацию ДНК в исследуемых образцах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В литературе встречается много успешных случаев индукции антител против одноцепочечной, но не двухцепочечной ДНК у животных при помощи нерастворимого комплекса нуклеиновой кислоты с мБСА [15,16]. Исходя из этого, для иммунизации был использован комплекс мБСА с одноцепочечными полинуклеотидами. Многократные попытки индуцировать иммунный ответ у животных при помощи ковалентных конъюгатов дц-ДНК с БСА или гемоцианом по методу [17], как описано ниже, оказались безуспешными. Двух животных иммунизировали ковалентным конъюгатом оц-ДНК с БСА, модифицированным при помощи янтарного ангидрида (яБСА) [17] (кролики 1 и 2, и двух других животных

иммунизировали комплексом оц-ДНК с мБСА (кролики 3 и 4). Пятенный иммуноанализ (рис. 1) показал, что в антисыворотке кроликов 1 и 2 антитела к ДНК отсутствуют. У кролика 3 антитела к дц-ДНК также отсутствовали, но присутствовали антитела к оц-ДНК (титр 10^{-2}), а у кролика 4 присутствовал примерно одинаковый титр (10^{-3}) антител к оц- и дц-ДНК (рис. 1). Здесь необходимо заметить, что при иммунизации комплексом мБСА с денатурированной (оц-) ДНК у одного из животных были получены антитела специфичные к нативной дц-ДНК. Одним из возможных объяснений могло бы послужить то, что при тепловой или щелочной денатурации ДНК остаётся значительное количество (до 20%) двухцепочечных участков и их количество увеличивается при хранении [17]. Однако, в литературе существуют многочисленные данные о невозможности получения таким способом антител к нативной ДНК [15,16], и в течение долгого времени неиммуногенность нативной ДНК млекопитающих остаётся необъяснённой [8]. Тот факт, что в редких случаях все же можно индуцировать иммунный ответ против дц-ДНК говорит о том, что среди десятков возможных вариантов белков МНС II на антиген-представляющих клетках животных существуют лишь единичные варианты МНС II, которые способны эффективно представлять Т лимфоцитам фрагменты ДНК [18]. Поскольку в литературе описано присутствие в биологических жидкостях двухцепочечной, но не одноцепочечной ДНК [2,6], для разработки иммуноаналитической системы были использованы кроличьи антитела к дц-ДНК. Антитела к дц-ДНК были также обнаружены в сыворотке больных СКВ (рис. 1), но электрофоретический анализ выявил их принадлежность к классу М, который непригоден для разработки иммуноанализа [14].

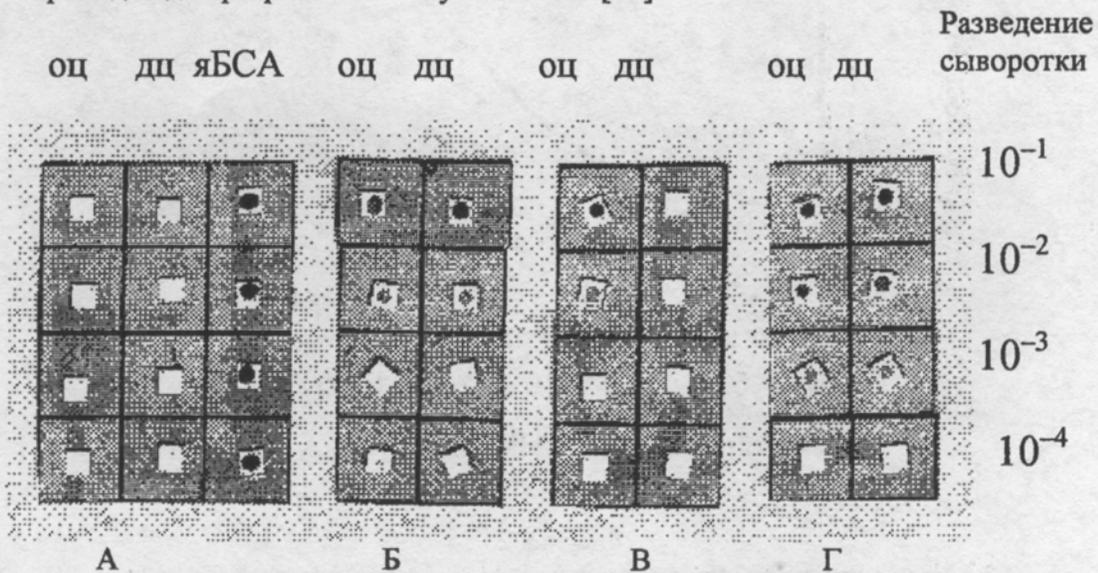


Рисунок 1.

Исследование специфичности кроличьих антисывороток и сыворотки больного СКВ при помощи пятенного иммуноанализа. Наличие различного пятна на нитроцеллюлозном фильтре говорит о присутствии антител к соответствующему антигену. Оц – одноцепочечная ДНК, дц – двухцепочечная ДНК, яБСА – БСА, модифицированный янтарным ангидридом. А – кролики 1 и 2, иммунизированные ковалентным конъюгатом оц-ДНК с яБСА; Б – сыворотка больного СКВ; В, Г – кролики 3 и 4, иммунизированные комплексом мБСА с денатурированной ДНК.

Сэндвич-анализ на ДНК. Полученные кроличьи анти-ДНК антитела класса G, как выяснилось, также малопригодны для использования в сэндвич-анализе, поскольку меченые европием антитела эффективно связывались с идентичными антителами, сорбированными на твёрдую фазу в отсутствие ДНК (данные не представлены). В литературе [18] есть данные, что этот эффект может быть вызван связыванием антител через Fc фрагменты с компонентами комплемента. Чтобы устранить агрегацию антител, были выделены Fab₂ фрагменты аффинно очищенных кроличьих анти-ДНК антител. В сэндвич-анализе полученные Fab₂ фрагменты использовались для сорбции на твёрдую фазу (после введения европиевой метки) также в качестве "вторых" антител. Минимальная концентрация антигена, обнаруживаемая с вероятностью не менее 95% (чувствительность анализа) составляла 8 пкг/мл, при этом рабочий диапазон сэндвич-анализа находился в пределах 10-1000 000 пкг/мл (рис. 2). Коэффициент вариации (точность анализа) составлял 15% для концентрации 50 пкг/мл, 8% для $m = 1000$ пкг/мл и 10% для $m = 500\ 000$ пкг/мл при определении образца сыворотки в нескольких повторах ($n = 10$) в одной постановке.

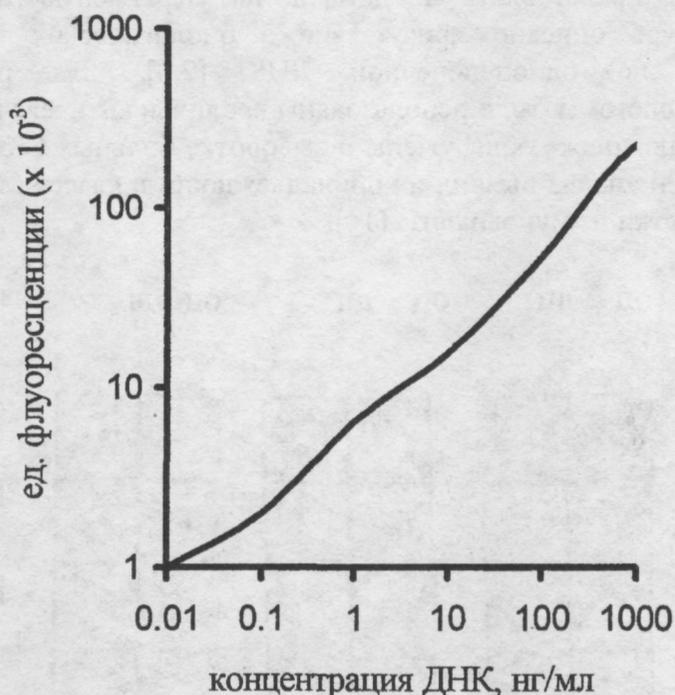


Рисунок 2.
Калибровочная кривая времяразрешённого иммунофлуоресцентного сэндвич-анализа на ДНК.

Времяразрешённый сэндвич-анализ был использован для исследования сыворотки крови здоровых доноров (рис. 3). У 38 доноров мужского пола сывороточный уровень ДНК составлял $0,62 \pm 0,49$ нг/мл (среднее \pm среднеквадратическое отклонение). Эти данные почти на три порядка ниже приводимых отдельными авторами цифр — 250 ± 50 нг/мл [2], что можно объяснить более высокой чувствительностью и специфичностью нашего метода.

В целом, в ранее опубликованных работах отмечалось либо отсутствие свободной ДНК в сыворотке крови здоровых доноров [19], либо приводился верхний предел нормального уровня ДНК [20,4] из-за низкой чувствительности методов анализа (встречный иммуноэлектрофорез 50 нг/мл [19], фенольная экстракция с радиоактивным мечением 10 нг/мл [20] и радиоиммуноанализ 25 нг/мл [4]). С этой точки зрения, наши значения нормального уровня ДНК в сыворотке, $0,62 \pm 0,49$ нг/мл, коррелируют с литературными данными.

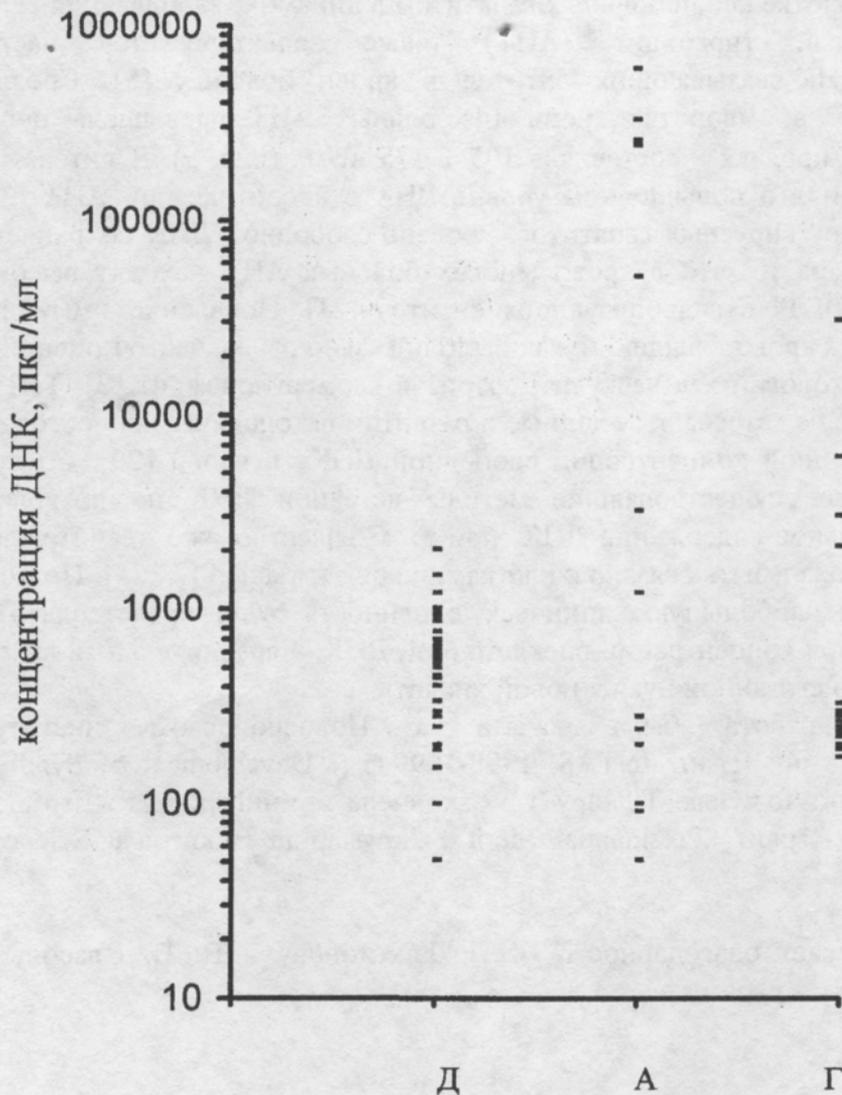


Рисунок 3.

Распределение концентраций ДНК в сыворотке крови здоровых доноров, больных аутоиммунным тиреоидитом и вирусными гепатитами. По оси абсцисс: Д – здоровые доноры ($n = 38$, $X = 0,62 \pm 0,49$ нг/мл), А – больные аутоиммунным тиреоидитом ($n = 14$, $X = 105 \pm 175$ нг/мл), Г – больные гепатитом В или С ($n = 19$, $X = 2,3 \pm 6,6$ нг/мл).

Также было исследовано содержание ДНК в сыворотке крови больных вирусным гепатитом и больных аутоиммунным тиреоидитом (АИТ). Эти заболевания представляют интерес, так как при них часто обнаруживают связывающие ДНК антитела в крови [21]. У 19 больных гепатитом В или С в

период разгара заболевания уровень ДНК составляет $2,3 \pm 6,6$ нг/мл (рис. 3). Эти значения достоверно выше среднего уровня ДНК у здоровых доноров ($p = 0,01$), но едва ли достаточны для индукции ДНК-гидролизующих антител, либо анти-ДНК антител [21]. С другой стороны, появление ДНК-связывающих антител, образующих иммунные комплексы с ДНК в желтушной фазе заболевания, может быть причиной относительно невысокого уровня свободной ДНК в сыворотке крови. Судя по всему, прогностическую значимость могло бы иметь измерение уровня ДНК в сыворотке крови больных гепатитом в динамике заболевания.

Аутоиммунный тиреозит (АИТ) также характеризуется частой встречаемостью ДНК-связывающих антител в крови больных [5]. Средняя концентрация ДНК в сыворотке крови 14 больных АИТ превышала норму больше чем на два порядка и составляла 105 ± 175 нг/мл (рис. 3). В литературе также есть сообщения о повышенном уровне ДНК в кровотоке при АИТ [22]. Однако в отличие от вирусных гепатитов, уровень свободной ДНК сохраняется высоким несмотря на то, что в крови многих больных АИТ находят высокое содержание ДНК- и РНК-гидролизующих антител [23]. Появление иммунных комплексов с ДНК в кровообращении, как было показано ранее, часто приводит к развитию таких патологий как васкулит, артрит и гломерулонефрит [2]. Тем не менее, в литературе не встречаются данные о развитии патологических состояний вследствие повышенной концентрации свободной ДНК в крови [20]. Следует отметить, что ранее существовавшие методы детекции ДНК не позволяли определять нормальное содержание ДНК, при этом известно, что значительное количество ДНК может быть связано с клетками крови и тканей [24,25]. Поэтому не исключено, что наибольшую клиническую ценность будут представлять не абсолютные значения концентрации внеклеточной ДНК, а сравнительный анализ уровня свободной и связанной нуклеиновой кислоты.

Настоящая работа была начата в Новосибирском институте биоорганической химии (грант INTAS, 1998-1999 гг., "Development of Synthetic Gene Transfer Vectors for Gene Therapy") и закончена в Университете Джорджа Вашингтона, США (грант "Presidential Merit Fellowship in Biomedical Sciences" 1999-2001).

Автор выражает благодарность П. П. Лактионову и В. В. Власову за помощь и поддержку в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Teare J. M., Islam R., Flanagan R.*, (1997) *Biotechniques*, **22**, 1170-1174.
2. *Raptis L., Menard H.*, (1980) *J. Clin. Invest.*, **66**, 1391-1399.
3. *Vladimirov V. G., Belokhvostov A. S., Sherlina S. S.*, (1992) *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 667-671.
4. *Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E. M., Leon S. A.*, (1983) *Cancer*, **51**, 2116-2120.

5. Андреевская О. А., (1998) РНК-гидролизующие антитела из сыворотки крови больных системной красной волчанкой: дисс. канд. хим. наук. Новосибирск: НИБХ, 126 с.
6. Smeenk R. J. T., (1994) Manual of Biological Markers of Disease, **B2.1**, 1-15.
7. Hemmilä I., Dakubu S., Mukkala V., Siitari H., Lövgren T., (1984) Anal. Biochem., **137**, 335-343.
8. Fredriksen K., Brammsether B., Traavik T., Rekvig O.P., (1991) Scand. J. Immunol., **34**, 109-119.
9. Borel H., Sasaki T., Stollar D., Borel Y., (1984) J. Immunol. Methods, **67**, 289-302.
10. Mandell J. D., Hershey A. D., (1960) Anal. Biochem., **1**, 66-77.
11. Wilson M. B., Nakane P. K., (1978) Immunofluorescence and related staining techniques. London, p. 215-224.
12. Hawker R., Niday E., Gordon J., (1982) Anal. Biochem., **119**, 142-147.
13. Nagasawa J., Suehiro T., Yamauchi A., (1985) J. Applied Biochem., **7**, 296-302.
14. Фримель Х. (ред.) (1979) Иммунологические методы. М.: Мир.
15. Stollar B. D., (1980) Methods Enzymol., **70**, 70-85.
16. Gilkeson G. S., Grudier J. P., Karounos D. G., Pisetsky D. S., (1989) J. Immunol., **142**, 1482-1486.
17. Jones D. S., Hachmann J. P., Osgood S. A., Hayag M. S., Barstad P. A., Iverson G. M., Coutts S. M., (1994) Bioconjugate Chem., **5**, 390-399.
18. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Capra J. D., (1999) Immunobiology. 4th edition, Garland Publishing.
19. Steinman C. R., (1979) Am. J. Med., **67**, 429-435.
20. Rumore P., Muralidhar B., Lin M., Lai C., Steinman C. R., (1992) Clin. Exp. Immunol., **90**, 56-62.
21. Барановский А. Г., Матюшин В. Г., Власов А. В., Забара В. Г., Наумов В. А., Жьеже Р., Бунева В. Н., Невинский Г. А., (1997) Биохимия, **62**, 1590-1598.
22. Shoenfeld Y., Ben-Ehuda O., Messinger J., Bentwithc Z., Rauch J., Isenberg D. I., Gado N., (1988) Immunol. Lett., **17**, 285-291.
23. Власов А. В., Барановский А. Г., Каньшкова Т. Г., Принц А. В., Забара В. Г., Наумов В. А., Бреусов А. А., Жьеже Р., Бунева В. Н., Невинский Г. А., (1997) Мол. Биология, **31**, 1117-1127.
24. Dorsch C. A., (1981) Thromb. Res., **24**, 119-129.
25. Emlen W., Rifai A., Magilavy D., Mannik M., (1988) Am. J. Pathol., **133**, 54-60.

Поступила 16.10.00.

TIME-RESOLVED IMMUNOFLUORIMETRIC ASSAY FOR DNA AND STUDY OF SERUM DNA CONTENT IN HUMANS

N. A. SHEVCHUK

Institute of Bioorganic Chemistry, Pr. Lavrentjeva 8, Novosibirsk 630090, Russia.
(Present address: Center II, CRI, 111 Michigan Ave, NW, Washington, DC 20010, USA.
Phone: +1 (202) 861-0596, fax: +1 (202) 884-3929, e-mail: niash@gwu.edu)

It is widely accepted that normal levels of extracellular DNA in the blood are quite low and can be elevated in systemic lupus erythematosus, some cancers, and after irradiation. The goal of this work was the development of a quantitative assay for DNA measurement in serum of healthy donors as well as in patients. Several approaches to IgG antibody induction against native mammalian DNA were tested. Antiserum containing such antibodies was obtained following immunization of rabbits with denatured DNA complexed to methylated BSA (in one of six animals). A time-resolved immunofluorimetric sandwich assay for DNA was developed using the rabbit antibodies. Sensitivity of the assay is 8 pcg/ml and the range 10-1000000 pcg/ml DNA. The assay was employed for determination of DNA serum content in normals, viral hepatitis patients, and autoimmune thyroiditis patients. Serum DNA concentration in 38 healthy males was 0.62 ± 0.49 ng/ml (medium \pm SD), as opposed to 2.3 ± 6.6 и 105 ± 175 ng/ml in 19 hepatitis (B and C) patients and 14 autoimmune thyroiditis patients respectively. The high levels of extracellular DNA in circulation may contribute to induction of DNA-hydrolyzing antibodies often found in these disorders. The assay can also be used for measurement of low DNA concentrations against high protein background in other biological fluids.

Key words: time-resolved immunoassay, anti-DNA antibody, serum DNA, autoimmune thyroiditis, viral hepatitis