

Adaptacja metody western-blottingu do badania antygenów larw L1 *Hypoderma bovis*

Adaptation of Western-blott method for examination of *Hypoderma bovis* larvae antigen

Tomasz Cencek

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; E-mail: tcencek@piwet.pulawy.pl

Proteolityczne enzymy trawienne larw gzów z gatunku *Hypoderma bovis* są najsilniejszymi antygenami tych pasożytów, a jednocześnie bardzo silnymi immunosupresorami. W badaniach nad właściwościami tych białek i ich wpływem na układ odpornościowy żywicieli szeroko wykorzystywane są techniki elektroforetyczne. Szczególnie przydatną jest metoda elektroforezy natywnej umożliwiającą rozdział białek wydzielniczych larw gzów na 6-8 głównych frakcji. Elektrotransfer na membranę nitrocelulozową tak rozdzielonych białek stwarza jednak trudności i część białek antygeny w ogóle nie ulega przeniesieniu na membranę lub przenoszona jest w stopniu niewystarczającym. W odczynie westernblottingu (WB) brak jest wówczas pełnej reakcji, a uzyskiwane wyniki analizy densytometrycznej są niedokładne i niepowtarzalne. Celem pracy była taka modyfikacja metody WB, która pozwoliłaby na uzyskiwanie skutecznego transferu białek antygeny *H. bovis*, nieprzenoszonych na membranę metodą klasyczną oraz uzyskiwanie powtarzalnych wyników w reakcjach z surowicą. Dla osiągnięcia tego efektu postanowiono białka antygeny *H. bovis* rozdzielone metodą elektroforezy natywnej opłaszczyc SDS-em bezpośrednio w żelu (przed transferem) poprzez jego inkubację w roztworze zawierającym ten związek. W efekcie przeprowadzonych doświadczeń określono, że optymalna temperatura wiązania SDS z cząsteczkami białek wydzielniczych larw *H. bovis* wynosi ok. 70°C. Stwierdzono, że inkubacja żelu uzyskanego po elektroforezie natywnej w roztworze SDS w takiej temperaturze nie wpływa deformująco na ten żel, a skuteczność transferu rozdzielonych białek na membranę nitrocelulozową znacznie wzrasta. W wyniku analizy densytometrycznej odczynu WB (przeprowadzonego z surowicami królików immunizowanych enzymami trawiennymi larw *H. bovis*) stwierdzono, że tak opracowana metoda charakteryzuje się niskimi błędami powtarzalności (CV% < 10%).