

УДК 577.15

## СТАБИЛИЗАЦИЯ АНТИТЕЛ В СМЕСЯХ “ВОДА–ЭТАНОЛ” КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕМ С ГЕПАРИНОМ

Е.В. Агеева, А.К. Гладилин, А.В. Левашов

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: zai@enz.chem.msu.ru)

Для стабилизации антител против инактивации под действием полярных органических растворителей предложено использовать комплексообразование с полиэлектролитами. Определены зависимости константы связывания препаратов антител против циклоспорина А от концентрации этанола при проведении иммунохимической реакции в гомогенной системе. Установлено, что стабилизация антител при комплексообразовании проявляется в расширении интервала концентраций органического растворителя, в котором антитела сохраняют иммунореактивность, по крайней мере на 30%. Показано, что основной физико-химической причиной стабилизации антител в водно-органических смесях является закрепление их нативной конформации в результате многоточечного взаимодействия с полиэлектролитом.

Имунохимические методы анализа (ИХА) наиболее перспективны для количественного определения разного рода соединений [1–4]. При анализе гидрофобных соединений последние экстрагируются из природных объектов органическими растворителями. Но анализ напрямую в экстрактах невозможен, так как антитела, как и многие белки, денатурируют уже при сравнительно низких концентрациях органического растворителя (от 30 до 50 об.%). Таким образом, существует необходимость разработки эффективного стабилизационного подхода для проведения ИХА в средах с высоким содержанием органического растворителя. Недавно был разработан ряд стабилизационных подходов для ряда белков [3, 5–8]. Наиболее эффективным является комплексообразование с полиэлектролитами (ПЭ) [5, 6, 8]. Данный подход основан на том, что многоточечное электростатическое взаимодействие с ПЭ стабилизирует каталитически активную конформацию белков. Мы предположили, что данный метод будет эффективен также и для стабилизации антител в водно-органических смесях.

### Материалы и методы

В работе использовали триоксиаминометан (гидрокси метиламинометан), *орто*-фенилендиамин (ОФД), циклоспорин А (CsA), (*Serva*, США), Tween-20, *pure*, (*Feprak*), бычий сывороточный альбумин (БСА) (*Fluka*, Швейцария), раствор моноклональных антител (Ат), выделенных из мыши, против циклоспорина в фосфатном буфере с 0,005% мертиолатом, конъюгат антител против IgG с пероксидазой хрена (АО ВНИИДМиЛ, Россия); конъюгат циклоспорин С–БСА. Хлорид натрия NaCl (“ос.ч.”), фосфат натрия  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (“ос.ч.”), перекись водорода (“ос.ч.”), цитрат калия, карбонат натрия (“ос.ч.”), этиловый спирт (“ос.ч.”), *Reaxim*, Россия); гепарин (*Sigma*, США).

**Имуноферментный анализ.** В ходе анализа использовали 2 планшета. На планшете 1 анализ проводили

по стандартной методике [1–4], реакционную смесь готовили на планшете 2. Типичный эксперимент проводили следующим образом: на планшете 2 с сорбированным БСА (10 мг/мл в 0,1 М карбонатном буфере) в дорожках с №3 по №12 включительно раститровывали раствор антигена в водно-органических смесях с разными концентрациями этанола. В каждую лунку дорожек №3–12 вносили по 5 мкл раствора Ат (60 мкг/мл) или комплекса Ат с ПЭ (Ат:ПЭ = 1:1000), инкубировали в течение 30 мин. Затем по 100 мкл реакционных смесей из планшета 1 переносили в планшет 2, инкубировали в течение 1 ч, промывали и добавляли раствор субстрата (по 100 мкл). Оптическую плотность продукта пероксидазного окисления ОФД регистрировали при 490 нм, используя планшетный спектрофотометр. Константы связывания Ат рассчитывали по методу Скотчарда.

**Флуоресцентная спектроскопия.** Эксперимент проводили для четырех образцов: Ат, Ат в комплексе с гепарином, иммунный комплекс Ат с CsA и комплекс Ат–гепарин с CsA. Концентрация в кювете Ат и CsA составляла  $5 \times 10^{-8}$  М, гепарин для образования комплекса белок–ПЭ брали в 1000-кратном избытке (М) по сравнению с концентрацией антител. В работе использовали спектрофлуориметр “Hitachi MPF-4” (Япония). Все измерения проводили при  $T = 22^\circ$ .

### Результаты и их обсуждение

**Влияние комплексообразования с ПЭ на  $K_{св}$  Ат в системе “вода–этанол”.** Зависимость  $K_{св}$  Ат против CsA от концентрации этанола в водно-органической системе представлена на рис. 1, где показано, что увеличение концентрации этанола приводит к снижению иммунореактивности Ат. Свободные Ат практически полностью теряют иммунореактивность при концентрации этанола 40 об.%. Комплексообразование с ПЭ

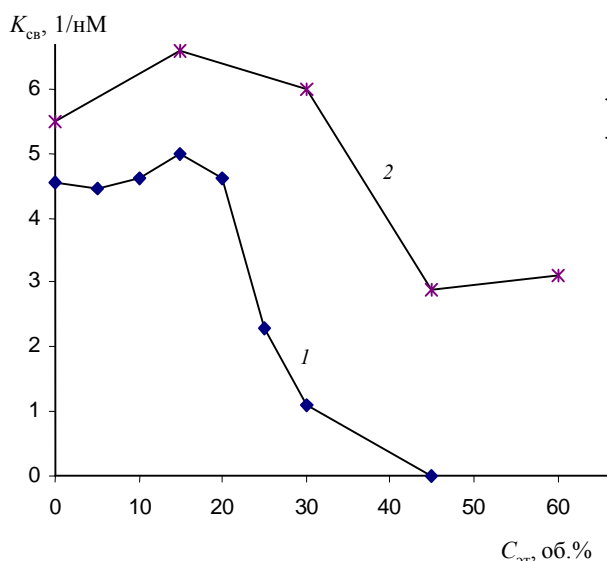


Рис. 1. Зависимость  $K_{св}$  At от концентрации этанола в системе: 1 – свободные At, 2 – комплекс At – гепарин

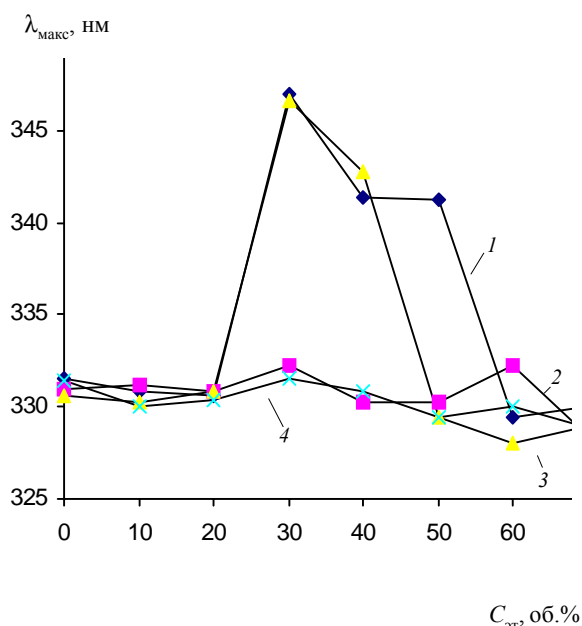


Рис. 2. Зависимость длины волны максимума флуоресценции ( $\lambda_{макс}$ ) от концентрации этанола в системе для препаратов At: 1 – свободные At, 2 – комплекс At–гепарин, 3 – комплекс At–Ag, 4 – комплекс At–Ag–гепарин

приводит к стабилизации At против инактивации под действием этанола. В комплексе с гепарином At сохраняют высокую иммунореактивность (50% от водного уровня) вплоть до 60 об.% органического компонента.

**Флуоресцентная спектроскопия препаратов антител в водно-органических смесях.** Для установления физико-химических причин стабилизации At в водно-органических смесях в результате комплексообразования с ПЭ был использован метод флуоресцентной спектроскопии. Зависимость длины волны максимума

испускания ( $\lambda_{макс}$ ) в спектрах флуоресценции свободных At в водно-этанольных смесях представлена на рис. 2, где показано, что при низком содержании этанола (до 20 об.%)  $\lambda_{макс}$  остается неизменной для всех изученных препаратов At. В случае свободных At в интервале концентраций этанола 30–40 об.% наблюдается сдвиг спектра флуоресценции в длинноволновую область. Такие существенные изменения в спектре флуоресценции отражают переход триптофановых остатков белка из внутренней области белковой глобулы на поверхность и свидетельствуют о конформационном переходе в At. Дальнейшее увеличение концентрации органического растворителя приводит к снижению  $\lambda_{макс}$ . Подобное уменьшение  $\lambda_{макс}$  при увеличении концентрации органического растворителя наблюдается для модельного соединения N-ацетил-L-триптофана (рис. 3). Таким образом, для свободных At конформационный переход наблюдается при уменьшении полярности среды в интервале концентраций этанола 20–50 об.%. В этом же интервале наблюдается снижение иммунореактивности At и происходит конформационный переход At в комплексе At–Ag, что указывает на взаимосвязь этих процессов. Комплексообразование с ПЭ оказывает значительное стабилизирующее воздействие на At. Значения  $\lambda_{макс}$  остаются постоянными во всем изученном интервале концентраций этанола в смеси с водой от 0 до 60 об.% (кривые 2, 4 на рис. 2), т.е. конформационный переход не наблюдается для At в комплексе с ПЭ и для комплекса At–Ag–ПЭ. Поэтому можно заключить, что основной причиной стабилизации At в водно-органических смесях является закрепление их нативной конформации в результате многоточечного взаимодействия с ПЭ. Таким образом, в данной работе разработан подход к стабилизации At в водно-органических смесях, основанный на комплексообразовании с ПЭ, показано проведение иммуноферментного анализа в средах с высоким содержанием этанола (до 60 об.%).

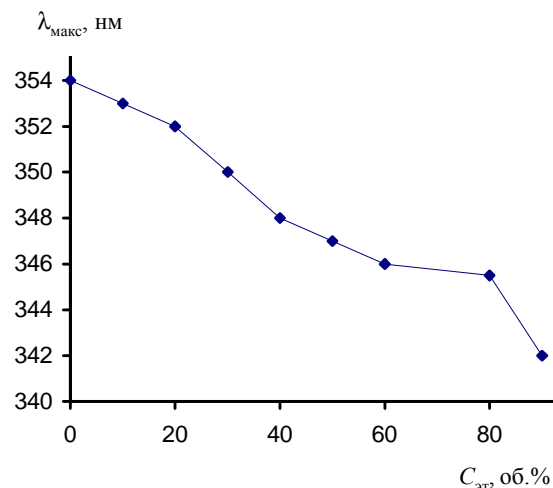


Рис. 3. Зависимость длины волны максимума флуоресценции ( $\lambda_{макс}$ ) от концентрации этанола в системе для N–Ac–L–Trp

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hennion M.C., Barcelo D.* // *Anal. Chim. Acta.* 1998. **362**. P. 3.
2. *Yazygina E.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Izumrudov V.A., Gee S.J., Hammock B.D.* // *Anal. Chim. Acta.* 1999. **399**. P. 151.
3. *Franek M., Kolar V., Eremin S.A.* // *Anal. Chim. Acta.* 1995. **311**. P. 349.
4. *Fenske M., Aerle R. van, Brack S., Tyler C.R., Segner H.* // *Comparative Biochemistry and Physiology.* 2001. **129**. P. 217.
5. *Gladilin A.K., Kudryashova E.V., Vakurov A.V., Izumrudov V.A., Mozhaev V.V., Levashov A.V.* // *Biotechnol. Lett.* 1995. **17**. P. 1329.
6. *Kudryashova E.V., Gladilin A.K., Vakurov A.V., Heitz F., Levashov A.V., Mozhaev V.V.* // *Biotechnol. Bioeng.* 1997. **55**. P. 267.
7. *Kudryashova E.V., Gladilin A.K., Izumrudov V.A., Hoek A. van, Viesser W.G., Lavashov A.V.* // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2001. **1550**. P. 129.
8. *Гладилин А.К., Левашов А.В.* // *Усп. биол. хим.* 1996. **36**. С. 141.

Поступила в редакцию 25.10.02