

УДК 577.152

СИНТЕЗ И ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ С АНТИТЕЛАМИ В БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОМ ИММУНОАНАЛИЗЕ КЛЕТОК *Salmonella*

Г.Ю. Ломакина¹, Е.Н. Истрате¹, Н.В. Руденко², Н.Н. Угарова¹

(¹кафедра химической энзимологии, ²Филиал Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; e-mail: nugarova@gmail.com)

Разработан метод синтеза стабильных и высокоактивных конъюгатов люциферазы светляков с антителами с использованием гетеробифункционального сшивающего агента N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио) пропионата (SPDP) в качестве линкера NH₂-групп антител со свободными SH-группами термостабильной *Luciola mingrelica* люциферазы (Luc). Разработана новая специфическая матрица для сорбции клеток *Salmonella*: монодисперсные полистирольные микрочастицы (φ 240 нм) покрывали Плуороником F108-PDS, с которым затем ковалентно связывали моноклональные антитела к клеткам *Salmonella* (Sal). Конъюгаты Luc-Sal применяли как детектирующие агенты в биолюминесцентном иммуноанализе клеток *Salmonella*. Использование новой матрицы и высокоактивных конъюгатов Luc-Sal позволило повысить чувствительность метода в ~100 раз по сравнению со стандартным «сэндвич»-методом.

Ключевые слова: люцифераза светляков, *Luciola mingrelica*, моноклональное антитело, конъюгация, детекция клеток, *Salmonella*, биолюминесцентный иммуноферментный анализ, Плуороник F10

Одна из важных задач биотехнологии и биоаналитической химии – развитие новых эффективных методов детекции микроорганизмов. Существует много методов селективного определения микроорганизмов: микроскопические, микробиологические [1], молекулярно-генетические [2, 3], иммунохимические [4]. Наиболее широко используется гетерогенный иммуноанализ, в частности «сэндвич»-тип анализа, при котором антитела или другие биоспецифические молекулы иммобилизованы на полистирольных микроплашках. Такой анализ занимает 1–3 ч и позволяет определять минимальную концентрацию клеток ~5×10⁵ КОЕ/мл [1, 5]. Для определения более низких концентраций требуется предварительное культивирование клеток, что значительно увеличивает длительность анализа. Сравнение разных методов детекции (микробиологический, ПЦР и иммуноферментный) для 215 образцов пищевых продуктов показало, что хотя иммуноферментный метод менее чувствителен, чем ПЦР, однако он более удобный и быстрый [6]. Таким образом, весьма важной задачей является увеличение чувствительности иммуноанализа. Основной элемент в этом анализе – детекция специфических взаимодействий между антителом и определяемым антигеном. Системы детекции должны быть доступными, стабильными и высокочувствительными. Этим требованиям вполне отвечают методы детекции с использованием люциферазы светляков, которая катализирует

окисление D-люциферина светляков кислородом воздуха в присутствии АТФ и Mg²⁺. Реакция сопровождается эмиссией видимого света (540–620 нм) с квантовым выходом, наиболее высоким среди всех известных биолюминесцентных систем [7]. Даже очень низкие концентрации люциферазы можно детектировать с использованием относительно простых приборов [8]. Преимуществом биолюминесцентных методов является возможность проводить измерения для суспензий и мутных сред. Предложено много методов, основанных на использовании люциферазы светляков как прямой метки [9, 10]. Впервые такой метод предложили Ванлунд и др. [11] для иммуноферментного определения пикомольных количеств метотрексата. Авторы использовали конъюгаты люцифераза-метотрексат, которые содержали по два моля метотрексата на один моль люциферазы и проявляли активность, составляющую ~60% от активности исходной люциферазы. К сожалению, активные конъюгаты были получены только для низкомолекулярных антигенов. Попытки получить конъюгаты люциферазы с антителами до сих пор были неудачны, поскольку фермент обычно терял почти всю активность при конъюгации через его NH₂-группы [12]. Гомо- и бифункциональные сшивающие агенты быстро и необратимо ингибировали активность люциферазы. Субстраты люциферазы (D-люциферин, АТФ и Mg²⁺) частично защищали фермент от ингибирования, что было использовано при получении конъюга-

тов *Photinus pyralis* люциферазы с иммуноглобулином. Тем не менее предварительная активация люциферазы с сульфо-SMCC в присутствии Mg^{2+} и АТФ приводила к потере 80% активности фермента, а полученный конъюгат сохранял только 13% от исходной активности люциферазы [13]. Было предложено [14] защищать фермент от инактивации путем обратимой химической модификации NH_2 -групп люциферазы, однако активность фермента также значительно снижалась. Предложено несколько подходов для преодоления этих трудностей. Получена биотинилированная люцифераза как гибрид люцифераза-биотин, связывающий белок [15]. Биотинилированная люцифераза образует прочные комплексы с авидином или стрептавидином, предварительно конъюгированными с антителами [16,17]. Такие комплексы получены для рекомбинантной термостабильной люциферазы *Luciola lateralis* и использованы в биолюминесцентном «сэндвич»-иммуноанализе микроорганизмов [16–18]. Фукуда и др [16] могли детектировать присутствие в образце ~50 КОЕ/мл клеток *Staphylococcus aureus* уже через 7 ч, включая предварительное подращивание клеток. Авторы работы [17] разработали метод 24-часового биолюминесцентного иммуноанализа клеток *Salmonella* в смывах тушек цыплят, однако предел обнаружения оставался довольно высоким (5×10^5 КОЕ/мл) [18]. Поэтому требовалось развитие новых методов биолюминесцентной детекции для уменьшения длительности анализа и увеличения его чувствительности.

Возможность получения активных конъюгатов люциферазы с олигонуклеотидами с использованием SH-групп остатков цистеина люциферазы *Photinus pyralis* была показана в [19]. Цель нашего исследования – разработка метода синтеза активных и стабильных конъюгатов люцифераза-антитело с использованием SH-групп фермента. В нашей лаборатории была выделена и изучена люцифераза (Luc) светляков *Luciola mingrelica* [20]. Этот фермент имеет 67% гомологии аминокислотной последовательности с *Photinus pyralis* люциферазой и более 80% с люциферазами из японских светляков *L. cruciata* и *L. lateralis* [21]. 3D-структура *L. mingrelica* люциферазы, полученная гомологичным моделированием [22] с использованием структур комплексов *L. cruciata* люциферазы с аналогами субстратов [23], показывает, что три консервативных Cys-остатка (82, 260 и 393) локализованы внутри белковой глобулы, и имеются еще пять неконсервативных Cys-остатков (62, 86, 146, 164, 284) [21]. Единичные мутации консервативных Cys-остатков на Ala [24] и неконсервативных Cys-остатков на Ser [25] не оказывают заметного влияния на активность фермента. Мы использовали для конъюгации термостабильную высокоактивную мутантную *L. mingrelica* лю-

циферазу с His₆-таг на С-конце фермента, полученную методом направленной эволюции [25]. Этот фермент имел в 1,9 раза более высокую активность, более высокотемпературный оптимум активности по сравнению с WT-люциферазой и сохранял 70% активности после двух дней инкубации при 37°C. Использование высокоэффективной рЕТ-системы экспрессии и одностадийная очистка данной мутантной люциферазы методом металло-хелатной хроматографии позволили нарабатывать высококонцентрированные растворы фермента [26]. Титрованием свободных SH-групп было показано, что термостабильный мутант содержал два доступных поверхностных Cys-остатка (62 и 164), т.е. на один остаток меньше, чем WT-люцифераза [27]. Эти остатки – наиболее вероятные точки для конъюгации, поскольку они локализованы на расстоянии 20 Å от активного центра, и их единичные замены на Ser не снижают активности и стабильности люциферазы [25, 27].

В работе были использованы два разных иммуноглобулина. При разработке метода синтеза конъюгатов Luc-антитела в качестве модельного антитела мы применили поликлональные антимышинные антитела кролика (RAM) и выяснили влияние конъюгации на люциферазную активность, стабильность и связывание с моноклональными антителами к клеткам *Salmonella* (Sal). Разработанный метод был применен для синтеза конъюгатов Luc-Sal, которые были использованы затем в биолюминесцентном иммуноанализе клеток *Salmonella*. Для сорбции клеток мы разработали новую матрицу на основе полистирольных микрочастиц, которые покрывали Плюронином F108, содержащим на концах молекулы пиридилдисульфидные группы, через которые ковалентно иммобилизовали антитела Sal. Конъюгаты Luc-Sal были использованы для детекции клеток, сорбированных на данной специфической матрице.

Материал и методы

Использованные вещества. Термоинактивированные клетки *Salmonella paratyphi* A и моноклональные антитела к внешнему углеводному антигену (O-антиген) липополисахаридов *Salmonella* SA:5D12A (Sal) получены, как описано в работе [28]. Поликлональные антимышинные антитела кролика (RAM), бычий сывороточный альбумин (BSA), дитиотреитол (DTT), Na-АТФ, дрожжевой экстракт (кат. № Y-0500), Тритон X-100 (все фирмы «Sigma Aldrich», США). Другие реагенты включали N-сукцинимидил 3-(2-пиридилтио)пропионат (SPDP) («Pie-rce», США), бактотриптон («Becton Dickinson», США), Трис («ICN», США), Твин-20 («Ferak», Германия), D-люциферин («Люмтек», Россия). Все реагенты «х.ч.» Растворы готовили с использованием очищенной деионизирован-

ной воды на установке «WaterPro Plus» («LabConco», США). Хроматографию белков проводили, используя Sephadex G-25, на колонках PD SpinTrap G-25, а также на колонках объемом 1 и 5 мл Ni-IDA HisTrap HPFF («Amersham», Швеция). Полистирольные микрочастицы диаметром 240 нм («Bangs Laboratories», США) хранили в виде 10%-й суспензии в деионизированной воде. Плотность твердой фазы составляла 1,05 г/мл. 1 мл содержал $1,322 \times 10^{13}$ частиц. Площадь поверхности 1 г сухих микрочастиц составляла $2,381 \times 10^{13}$ мкм². Плюроник F108 (молекулярный вес ~14600) с введенными на концах молекул пиридилдисульфидными группами (Плюроник F108-PDS) был любезно предоставлен фирмой «Allvivo», США.

Оборудование. Интенсивность биолюминесценции измеряли на люминометрах «FB 12» («Zyflux», США) или «ЛЮМ-1» («Люмтек», Россия), используя ячейки разделяемых полистирольных микропланшет (со средней адсорбционной способностью), и выражали в относительных световых единицах (RLU/c). Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре «UV-1202» («Shimadzu», Япония). Величины pH измеряли на pH-метре GLP-21 («Crison», Испания) с точностью 0,01 единиц pH. Электрофорез белков выполняли на приборе «Mini-Protean II Cell» («BioRad», Австрия). Растворы в микропробирках перемешивали на мультиротаторе Bio RS-24 («BioSan», Латвия), центрифугировали на центрифугах «5415C» и «MiniSpin» («Eppendorf», Германия). Размер микрочастиц определяли на анализаторе частиц «Zetasizer Nano ZS» («Malvern Instruments», Великобритания).

Получение фермента. Термостабильная мутантная люцифераза (Luc) была получена, как описано ранее [26]. Экспрессию белка проводили по методу аутоиндукции с лактозой [29] в клетках *E. coli* BL21(DE3), несущих плазмиду pETL7 с геном термостабильной люциферазы. Получаемый белок содержал His₆-таг, поэтому его очищали методом аффинной хроматографии на Ni-сефарозе, получая раствор люциферазы с концентрацией 25–30 мг/мл в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,5), содержащем 0,5 М NaCl и 0,3 М имидазола. В полученный раствор фермента добавляли раствор ЭДТА (pH 8,0) до концентрации 2 мМ.

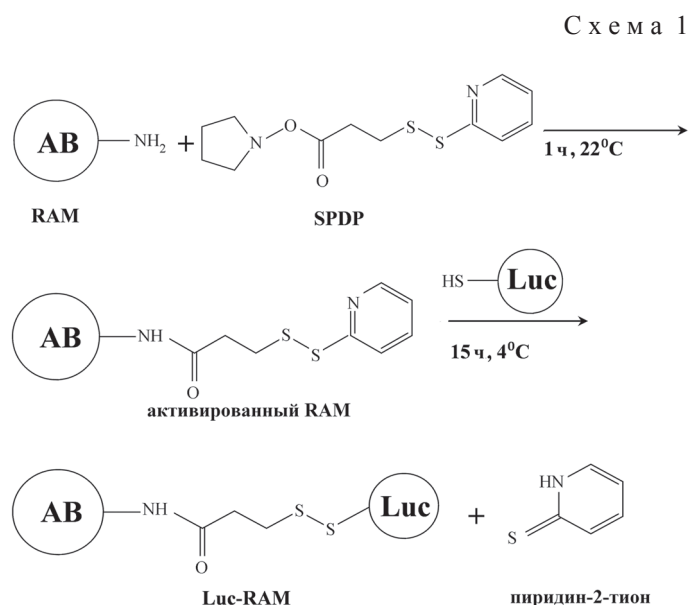
Люциферазную активность люциферазы и ее конъюгатов с антителами определяли, используя субстратную смесь, которая включала 0,1 М Трис-ацетат (pH 7,8) содержащий 60 мМ MgSO₄, 2 мМ ЭДТА, 10% глицерина, 0,1 мМ Na₄P₂O₇, 4 мМ АТФ, 0,3 мМ люциферин. Для определения активности 50 мкл фермента или конъюгата и 50 мкл субстратной смеси вносили в ячейку, быстро перемешивали, измеряли интенсивность биолюминесценции в трех повторах и

рассчитывали среднее значение. Ошибка измерения не превышала 5% от средней величины.

Концентрацию люциферазы определяли по поглощению при 280 нм, используя коэффициент экстинкции, равный $A^{1\text{ см}} = 0,75$ для раствора люциферазы с концентрацией 1 мг/мл [30]. Молекулярный вес и чистоту белков определяли методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле по методу Леммли [31], используя 4%-й концентрирующий и 12%-й (для фермента) или 7%-й (для конъюгатов люциферазы) разделяющий гели.

Получение конъюгатов люциферазы с антителами. 5 мг RAM в 1 мл 20 мМ Na-фосфатного буферного раствора (pH 7,4), содержащего 0,15 М NaCl и 1 мМ ЭДТА (PBS-ЭДТА) смешивали с 25 мкл раствора SPDP (20 мМ в ДМСО) и инкубировали 1 ч при 22°C (схема 1). Затем смесь хроматографировали на колонке объемом 10 мл с сефадексом G-25, уравновешенным тем же буфером. Собирали фракции по 0,5 мл, содержащие больше 2,5 мг/мл белка. Концентрацию активированных RAM определяли по поглощению при 280 нм, используя $A^{1\text{ см}} = 1,4$ для раствора RAM с концентрацией 1 мг/мл [32]. Для определения среднего числа остатков SPDP, связавшихся с RAM, порцию активированных RAM восстанавливали с помощью DTT и определяли концентрацию продукта реакции (пиридин-2-тиона) по поглощению при 343 нм, используя коэффициент экстинкции $8080\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$ [33]. Затем 10 мкл раствора люциферазы (6 мг/мл) в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,5), содержащем 0,5 М NaCl, 0,3 М имидазол и 2 мМ ЭДТА добавляли к 50, 100 или 150 мкл раствора активированных RAM (3 мг/мл), чтобы получить реакционные смеси с разным молярным соотношением Luc/RAM (1:1, 1:2, 1:3). Растворы инкубировали от 1 до 15 ч при 4 или 22°C, отделяли конъюгаты Luc-RAM методом аффинной хроматографии на Ni-сефарозе (колонка 1 мл) при 4°C. Собирали фракции с люциферазной активностью и хранили при 0°C до использования.

При синтезе конъюгатов Luc-Sal 0,9 мг Sal в 0,2 мл буфера PBS-ЭДТА смешивали с 7 мкл раствора SPDP (20 мМ в ДМСО), инкубировали 1 ч при 22°C, наносили на колонку PD SpinTrap G-25, уравновешенную тем же буфером, для отделения избытка реагентов. Очищенный раствор активированных Sal (4 мг/мл) элюировали центрифугированием (3500 об/мин, 2 мин). Затем 10 мкл раствора люциферазы (6 мг/мл) в буфере, указанном выше, добавляли к 0,1 мл раствора активированных Sal, инкубировали 15 ч при 4°C. Конъюгаты Luc-Sal очищали хроматографией на Ni-сефарозе, как описано выше, и хранили при 0°C до использования.



Связывание Luc-RAM с моноклональными антителами, Sal. Сначала определяли оптимальную концентрацию Luc-RAM конъюгата для связывания с Sal. По 50 мкл раствора Sal (10 мкг/мл) в 10 мМ Na-карбонатном буфере (pH 9,6) вносили в ячейки микропланшета, инкубировали при 4°C в течение ночи, промывали 4 раза PBST-буфером (PBS-буфер, содержащий 0,05% Твин-20), блокировали 200 мкл буфера PBS-BSA (1% BSA в PBS буфере, 1 ч, 37°C) и снова промывали. В каждую из подготовленных ячеек вносили по 50 мкл раствора Luc-RAM (0,5–25 мкг/мл) в буфере PBS, инкубировали 1 ч при 37°C и снова промывали. Затем по 50 мкл субстратной смеси вводили в каждую ячейку и измеряли интенсивность биолюминесценции. Чтобы оценить способность конъюгата Luc-RAM связывать Sal, по 50 мкл раствора Sal (1,25–80 мкг/мл) в 10 мМ Na-карбонатном буфере (pH 9,6) вводили в ячейки планшета, инкубировали при 4°C в течение ночи и промывали, как описано выше. Затем по 50 мкл раствора Luc-RAM конъюгата (12,5 мкг/мл) добавляли в каждую ячейку, инкубировали 1 ч при 37°C, промывали, добавляли по 50 мкл субстратной смеси и измеряли интенсивность биолюминесценции.

Гетерогенный биолюминесцентный иммуноанализ клеток *Salmonella* с использованием PS-F108-PDS микрочастиц, ковалентно связанных с антителами Sal. 10 мг Плуороника F108-PDS растворяли в 0,8 мл деионизированной воды, добавляли 0,2 мл суспензии, содержащей 10% полистирольных микрочастиц (PS) ($2,6 \times 10^{12}$ частиц) и инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. Модифицированные микрочастицы (PS-F108-PDS) отделяли от избытка ПАВ центрифугированием (13400 об/мин,

20 мин). Супернатант удаляли, а PS-F108-PDS ресуспендировали в PBS-буфере. Эту процедуру повторяли три раза. Антитела Sal активировали с помощью SPDP, как описано выше. В Плуоронике F108-PDS восстанавливали S–S-связи, используя смесь 0,5 мл 0,15 М раствора DTT и 0,5 мл суспензии PS-F108-PDS ($\sim 1,3 \times 10^{12}$ частиц) в буфере PBS, которую инкубировали 30 мин при 24°C с осторожным перемешиванием. Избыток DTT удаляли центрифугированием и промыванием. Затем к суспензии PS-F108-PDS немедленно прибавляли 0,5 мл раствора активированных Sal (4 мкг/мл) в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,15 М NaCl и 1 мМ ЭДТА, инкубировали 2 ч при 24°C. Несвязавшиеся антитела удаляли центрифугированием (13400 об/мин, 20 мин), осадок ресуспендировали в буфере PBS. Процедуру повторяли три раза. Меченые микрочастицы (PS-F108-Sal) ресуспендировали в буфере PBS и хранили при 0°C.

Для определения размера микрочастиц 1 мл суспензии разбавляли деионизированной водой до концентрации $\sim 10^8$ частиц/мл и анализировали на анализаторе «Zetasizer Nano ZS». Для определения содержания клеток *Salmonella* 50 мкл суспензии термоинактивированных клеток (10^3 – 10^6 КОЕ/мл) в буфере PBS добавляли к 30 мкл суспензии PS-F108-Sal ($\sim 7 \times 10^{10}$ частиц) в буфере PBS, инкубировали 1 ч при комнатной температуре при перемешивании и промывали буфером PBS, как описано выше. Затем объем суспензии доводили до 100 мкл, добавляли 100 мкл раствора Luc-Sal конъюгата (10 мкг/мл) в буфере PBS, инкубировали 30 мин при комнатной температуре при перемешивании и промывали суспензию, как описано выше. После чего микрочастицы ресуспендировали в 50 мкл буфера PBS, переносили в кювету люминометра, добавляли 50 мкл субстратной смеси и измеряли интенсивность биолюминесценции.

Результаты и обсуждение

Синтез и свойства конъюгатов Luc-RAM. Возможность получения стабильных и активных конъюгатов люциферазы светлячков с антителами имеет важное значение для развития биолюминесцентного иммуноанализа. Согласно литературным данным [12–14], конъюгирование люциферазы с антителами обычно приводит к сильному падению активности фермента. Ранее мы показали, что замена поверхностных SH-групп у *Luciola mingrelica* люциферазы не уменьшает активности фермента [25, 27]. Именно поэтому мы использовали свободные SH-группы фермента для конъюгации с антителами. В качестве модельного антитела мы применяли поликлональные антимишьяные антитела кролика (RAM), чтобы разработать метод синтеза конъюгатов Luc-антитела. Антитела RAM были моди-

фицированы бифункциональным сшивающим агентом SPDP, в то время как люцифераза была использована в немодифицированной форме. Пиридилдисульфидные группы были введены в молекулы RAM по методу Карлсона и др. [33], несколько модифицированному нами. Одна молекула активированного RAM, как было показано, содержала в среднем по три пиридилдисульфидные группы. Реакция активированных RAM с люциферазой протекала в 20 мМ Na-фосфате (рН 7,4), содержащем 0,15 М NaCl. Для измерения активности люциферазы и ее конъюгатов с антителами мы разработали субстратную смесь, использование которой позволило регистрировать высокий и постоянный сигнал биолюминесценции. Линейная зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации люциферазы наблюдалась в интервале от 10^{-14} до 10^{-7} М люциферазы. Состав продуктов реакции был определен методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле.

Если реакцию конъюгации проводили при комнатной температуре, фермент терял 90% активности после 3 ч инкубации. Поэтому мы выполняли синтез при 4°C, а длительность инкубации увеличили до 15 ч. При выбранных условиях инкубации (15 ч, 4°C) активность и состав конъюгатов, как мы показали, сильно зависят от молярного соотношения Luc:RAM в реакционной смеси (таблица). При молярном соотношении 1:1 около 10% люциферазы остается в неизменной форме. При соотношении Luc:RAM = 1:2 весь фермент включается в конъюгаты, а люциферазная активность составляет 80% от исходной. При соотношении Luc:RAM = 1:3 значительно возрастает содержание побочных олигомерных продуктов, а люциферазная активность конъюгатов снижается до 61%. Таким образом, оптимальное соотношение Luc:RAM = 1:2. Согласно данным электрофореза, молекулярный вес конъюгата Luc-RAM составляет ~210 кДа, что соответствует конъюгатам состава 1:1. Можно предположить, что полученный продукт содержит смесь конъюгатов Luc-RAM, в которых ковалентная связь образована через SH-группы остатка Cys62 или Cys164.

Поскольку молекула люциферазы содержит His₆-таг, то конъюгаты легко отделяли от избытка антител с помощью металло-хелатной хроматографии. Известно [34], что Fc-фрагмент иммуноглобулинов может связываться с ионами металлов при металло-хелатной хроматографии. Мы проверили эту возможность для RAM и показали, что в использованных нами условиях антитела не связываются с носителем. Полученные растворы конъюгатов хранили при 0°C в 20 мМ Na-фосфате (рН 7,5), содержащем 0,5 М NaCl, 0,3 М имидазол и 2 мМ ЭДТА. После двух месяцев хранения конъюгаты имели 90% активности люциферазы. При

инкубации в течение двух часов при 37°C уменьшение люциферазной активности конъюгатов не превышало 5%. Следовательно, конъюгаты Luc-RAM имеют высокую люциферазную активность и стабильность и могут быть использованы как при комнатной, так и при повышенной температуре. Разработанный нами метод получения конъюгатов люциферазы с антителами не требует предварительной модификации фермента в отличие от методов, описанных ранее [13, 14].

Мы оценили связывающую активность конъюгатов Luc-RAM по отношению к моноклональным антителам Sal. Сначала мы определили концентрацию конъюгатов Luc-RAM, оптимальную для детекции Sal, которые были взяты в постоянной концентрации (10 мкг/мл) и сорбированы на поверхности ячеек микропланшет. Высокую интенсивность биолюминесценции (более 6×10^5 RLU/c) регистрировали при концентрации Luc-RAM выше 10 мкг/мл (рис. 1, а). Для дальнейших экспериментов была выбрана оптимальная концентрация Luc-RAM, равная 12,5 мкг/мл, при этом неспецифическое связывание конъюгатов Luc-RAM составляло всего 3–4%. Далее моноклональные антитела Sal в разной концентрации (1,25–80 мкг/мл) сорбировали на поверхность ячеек и детектировали их, используя постоянную концентрацию Luc-RAM (12,5 мкг/мл). Зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации иммобилизованных Sal описывается типичной кривой с насыщением (рис. 1, б). Максимальная интенсивность биолюминесценции составила $1,2 \times 10^6$ RLU/c, что должно обеспечить достаточную чувствительность детекции. Следовательно, конъюгаты Luc-RAM обладали высокой связывающей способностью по отношению к моноклональным антителам Sal.

Синтез конъюгатов Luc-Sal и их использование в биолюминесцентном иммуноанализе клеток *Salmonella*. Конъюгация люциферазы с Sal-антителами была выполнена по методике, описанной выше для конъюгатов Luc-RAM. Полученные конъюгаты Luc-Sal демонстрировали $71 \pm 3\%$ от исходной активности люциферазы. Согласно данным SDS-электрофореза, молекулярный вес конъюгатов Luc-Sal составил ~230 кДа, что соответствует конъюгату состава 1:1. Конъюгаты Luc-Sal имели более 90% люциферазной активности после двух месяцев хранения при 0°C. Их операционная стабильность при 37°C не отличалась от таковой для конъюгатов Luc-RAM. Конъюгаты Luc-Sal были использованы для биолюминесцентной детекции клеток *Salmonella*.

По данным литературы [18] предел обнаружения клеток *Salmonella* «сэндвич»-методом биолюминесцентного иммуноанализа составляет 5×10^5 КОЕ/мл, если не проводить предварительного подрачивания клеток. Для улучшения аналитических характеристик

Синтез и характеристики конъюгатов Luc-RAM

| Условия синтеза | | | Характеристики продуктов реакции | | |
|-----------------|----------|-------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------|
| температура, °С | время, ч | молярное соотношение, Luc:RAM | относительная люциферазная активность, % | состав по данным SDS-электрофореза | |
| | | | | доля немодифицированной люциферазы, % | доля олигомерных продуктов, % |
| 22 | 1 | 1:1 | 95±3% | ~90 | – |
| | 3 | 1:1 | 10±2% | 0 | – |
| 4 | 15 | 1:1 | 96±2% | 10 | – |
| | | 1:2 | 79±3% | 0 | 17±2 |
| | | 1:3 | 61±2% | 0 | 38±2 |

биолюминесцентной детекции клеток мы использовали в качестве матрицы для специфической сорбции клеток монодисперсные полистирольные микрочастицы (PS) (φ 240 нм), рабочая поверхность которых была выше примерно в 100 раз, чем поверхность полистирольных ячеек микропланшетов. Антитела Sal эффективно сорбировались на поверхности PS. При этом радиус микрочастиц увеличился на $\sim 17 \pm 1$ нм

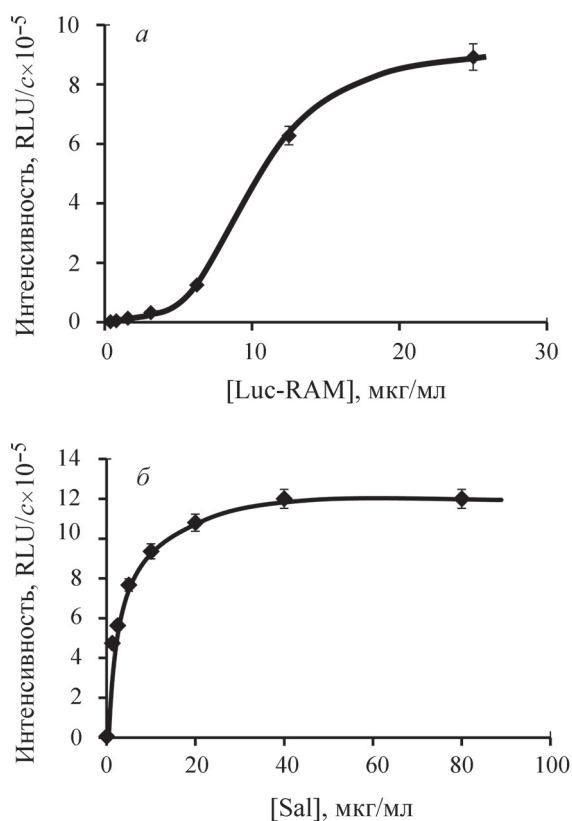
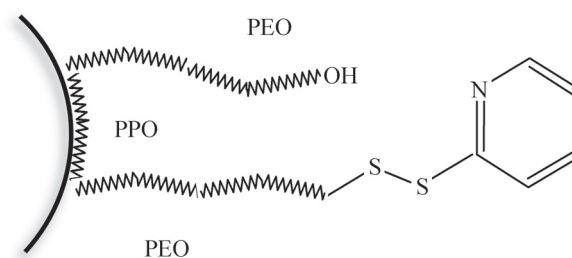


Рис. 1. Связывающая активность конъюгата люциферазы с поликлональными антимышиными антителами (Luc-RAM) по отношению к моноклональным антителам к клеткам *Salmonella* (Sal). Интенсивность биолюминесценции как функция: *a* – концентрации Luc-RAM при постоянной концентрации Sal (10 мкг/мл), сорбированных на поверхности полистирольных ячеек; *б* – концентрации Sal, сорбированных на поверхности полистирольных ячеек, при постоянной концентрации детектирующих Luc-RAM (12,5 мкг/мл). Каждое измерение повторяли по три раза

после инкубации в растворе антител Sal, что соответствует размеру молекул антител (10–20 нм) [35]. Следовательно, микрочастицы были покрыты монослоем антител. Однако при этом наблюдалась очень высокая неспецифическая сорбция конъюгатов Luc-Sal на поверхности микрочастиц (результаты не показаны), так что их использование в анализе оказалось невозможным. Для снижения неспецифической сорбции за счет гидрофобных взаимодействий между молекулой люциферазы и полистирольной поверхностью использовали Плюроник F108-PDS, который представляет собой тройной блок-сополимер с двумя концевыми относительно гидрофильными полиоксиэтиленовыми блоками и гидрофобным полиоксипропиленовым блоком (схема 2). Преимущество данного Плюроника заключается в том, что при его сорбции на микрочастицах центральный гидрофобный блок покрывает собой гидрофобную поверхность микрочастиц, на которой формируется щеткоподобная структура. При этом предотвращается неспецифическая сорбция белков, а также их денатурация и инактивация, что наблюдается при прямой сорбции молекул белков на гидрофобной поверхности микрочастиц [36–38]. Боковые цепи Плюроника F108-PDS содержат пиридилдисульфидные группы, к которым могут быть ковалентно присоединены тиол-содержащие молекулы. Более того, наличие длинных боковых цепей, включающих до 265 полиоксиэтиленовых единиц, сохраняло подвижность в пространстве для молекул, ковалентно связанных с концевыми группами Плюроника. Радиус микрочастиц, покрытых Плюроником F108-PDS (PS-F108-PDS), уве-

Схема 2



Схематическое изображение Плюроника F108-PDS

личился до 272 ± 1 нм, что согласуется с результатами, полученными ранее [38]. Для иммобилизации антител Sal на поверхности PS-F108-PDS NH_2 -группы антител активировали с помощью SPDP по методу, описанному выше, а пиридилдисульфидные группы на PS-F108-PDS восстанавливали до SH-групп. При взаимодействии восстановленных SH-групп на поверхности с активированными антителами Sal были получены микрочастицы с иммобилизованными на них антителами Sal (PS-F108-Sal). Диаметр частиц PS-F108-Sal возрос до 294 ± 7 нм в соответствии с размерами конъюгированных молекул. Следует подчеркнуть, что после месяца хранения при 4°C размер частиц не изменился, а это свидетельствует о том, что десорбции Плуороника с поверхности микрочастиц не происходит.

Мы использовали микрочастицы PS-F108-Sal как «улавливающий» агент, а конъюгаты Luc-Sal как детектирующий агент в биолюминесцентном иммуноанализе клеток *Salmonella*. Зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации клеток *Salmonella* показана на рис. 2 (кривая 1). Предел обнаружения составил $2,7 \times 10^3$ КОЕ/мл, что в ~ 100 раз ниже предела

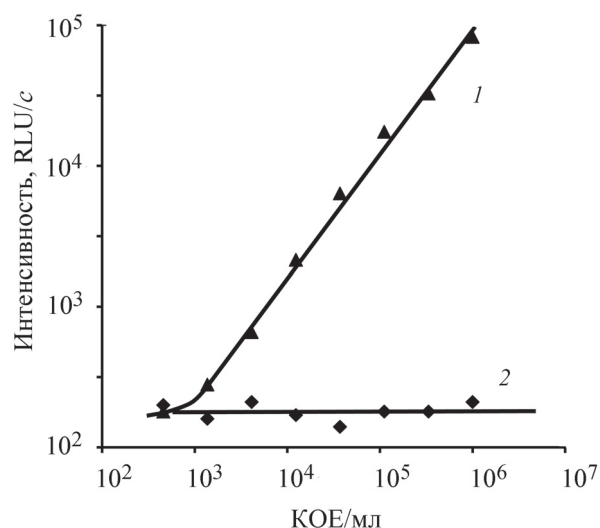


Рис. 2. Интенсивность биолюминесценции как функция концентрации клеток *Salmonella* (1) и *E. coli* (2). Клетки сорбировали на полистирольных частицах, обработанных Плуороником F108-PDS, к которому затем ковалентно были присоединены антитела Sal. Связавшиеся клетки детектировали, используя конъюгаты Luc-Sal. Каждое измерение повторяли по три раза

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 08-04-00624 и № 11-04-00698).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mandal P.K., Biswas A.K., Choi K., Pal U.K. // Amer. J. Food Technol. 2011. **6**. P. 87.
- Ferretti R., Mannazzu I., Coccolin L., Comi G., Clementi F. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. **67**. P. 977.
- Sibley C.D., Peirano G., Church D.L. // Infect. Gen. Evol. 2012. **12**. P. 505.
- Uyttendaele M., Vanwildemeersch K., Debevere J. // Lett. Appl. Microbiol. 2003. **37**. P. 386.

обнаружения клеток *Salmonella* биолюминесцентным методом с использованием полистирольных микропланшет [18]. Существенное снижение предела обнаружения объясняется не только увеличением площади поверхности для связывания клеток. Антитела Sal связаны с полистирольной поверхностью через длинный спейсер, который позволяет им сохранять подвижность в пространстве и делает антитела более доступными для взаимодействия с микробными клетками. На это указывает и тот факт, что быстрое и эффективное связывание клеток *Salmonella* с микрочастицами PS-F108-Sal наблюдается после 1 ч инкубации при комнатной температуре, в то время как при использовании микропланшет для подобного связывания необходима инкубация при 37°C . Кроме того, подвижные полиоксипропиленовые цепи Плуороника закрывают гидрофобную поверхность микрочастиц и предотвращают взаимодействие с ней белков. Именно этим объясняется очень низкая неспецифическая сорбция конъюгатов Luc-Sal на PS-F108-Sal (менее 0,5%). Важно подчеркнуть, что интенсивность биолюминесценции линейно зависит от концентрации клеток в широком интервале (от 10^3 до 10^6 КОЕ/мл). Для проверки специфичности метода мы использовали клетки *E. coli* (штамм K12). Клетки *Salmonella* и *E. coli* имеют сходную структуру клеточной стенки. Однако при использовании клеток *E. coli* в данной системе биолюминесцентный сигнал близок к фоновому значению во всем интервале концентрации клеток (рис. 2, кривая 2). Это подтверждает высокую специфичность использованных моноклональных антител Sal.

Таким образом, мы разработали простой и эффективный метод получения конъюгатов люциферазы светлячков с антителами с использованием поверхностных SH-групп фермента, который впервые позволил получить стабильные конъюгаты, сохраняющие высокую люциферазную активность (70–90%) и высокую способность к связыванию антигена (микробных клеток). Для специфической сорбции детектируемых клеток *Salmonella* была синтезирована новая матрица на основе полистирольных микрочастиц. Поверхность микрочастиц была обработана Плуороником F108-PDS, с которым затем были ковалентно связаны антитела к клеткам *Salmonella*. Использование данной матрицы позволило снизить предел обнаружения клеток в ~ 100 раз без предварительного концентрирования или подрачивания образца.

5. Jasson V., Jacxsens L., Luning P., Rajkovic A., Uyttendaele M. // *Food Microbiol.* 2010. **27**. P. 710.
6. Kumar R., Surendran P.K., Thampuran N. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2008. **46**. P. 221.
7. Fraga H. // *Photochem. Photobiol. Sc.* 2008. **7**. P. 146.
8. Lundin A. // *Methods Enzymol.* 2000. **305**. P. 346.
9. Murakami S., Nakjima M., Ito S., Kamada S., Maeda M., Tsuji A. // In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Status report*/ Eds. A.A. Szalay, L.J. Kricka, P.E. Stanley. Chichester, 1993. P. 296.
10. Fromell K., Hulting G., Ilichev A., Larsson A., Caldwell K. // *Anal. Chem.* 2007. **79**. P. 8601.
11. Wannlund J., Azari J., Levine L., DeLuca M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980. **96**. P. 440.
12. Kricka L.J. // *Clin. Chem.* 1991. **37**. P. 1472.
13. Murphy M.J., Squirrell D.J. // In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and applied aspects*/ Eds. A.K. Campbell, L.J. Kricka, P.E. Stanley. Chichester, 1994. P. 301.
14. Alagic A., Zhelev P., Gawad Y.A. // US Patent application 2010. 0003701 A.
15. Tatsumi H., Fukuda S., Kikuchi M., Koyama Y. // *Anal. Biochem.* 1996. **243**. P. 176.
16. Fukuda S., Tatsumi H., Igarashi H., Igimi S. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2000. **31**. P. 134.
17. Valdivieso-Garcia A., Desruisseau A., Riche E., Fukuda S., Tatsumi H. // *J. Food Prot.* 2003. **66**. P. 1996.
18. Fukuda S., Tatsumi H., Igimi S., Yamamoto S. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2005. **41**. P. 379.
19. Nagatsugi F., Nakahara R., Inoue K., Sasaki S. // *Archiv. Pharmazie.* 2008. **341**. P. 562.
20. Ugarova N.N. // *J. Biolum. Chemilum.* 1989. **4**. P. 406.
21. Devine J.H., Kutuzova G.D., Green V.A., Ugarova N.N., Baldwin T.O. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. **1173**. P. 121.
22. Кокишаров М.И., Угарова Н.Н. // *Биохимия.* 2008. **73**. С. 1071.
23. Nakatsu T., Ichiyama S., Hiratake J., Saldanha A., Kobashi N., Sakata K., Kato H. // *Nature.* 2006. **440**. P. 372.
24. Дементьева Е.И., Железнова Е. Е., Кутузова Г.Д., Лундовских И.А., Угарова Н.Н. // *Биохимия.* 1996. **62**. С. 152.
25. Модестова Ю.А., Ломакина Г.Ю., Угарова Н.Н. // *Биохимия.* 2011. **76**. С. 1407.
26. Koksharov M.I., Ugarova N.N. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2011. **24**. P. 835.
27. Ломакина Г. Ю., Модестова Ю.А., Угарова Н.Н. // *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия.* 2008. **49**. С. 81.
28. Merkulova T.I., Abbasova S.G., Moshnikova A.B. // *Hybridoma.* 1995. **14**. P. 557.
29. Studier F.W. // *Protein Expres. Purif.* 2000. **41**. P. 207.
30. Green A.A., McElroy W.D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1956. **20**. P. 170.
31. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. **227**. 680.
32. Hay F.C., Westwood O.M.R. // *Practical Immunology.* 4th ed., Blackwell Science. 2002.
33. Carlsson J., Drevin H., Axen R. // *Biochem. J.* 1978. **173**. P. 723.
34. Sorensen K., Roscoe I. // US Patent 5,266,686. 1993.
35. Hermanson G.T. // In *Bioconjugate Techniques*/ Ed. G.T. Hermanson. 2nd ed. N.Y., 2008. P. 961.
36. Fromell K., Anderson M., Elihn K., Caldwell K.D. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2005. **46**. P. 84.
37. Basinska T., Caldwell K.D. // In *Chromatography of Polymers.* Ed. T. Provder. American Chemical Society. 1999. P. 162.
38. Fry A.K., Schilke K.F., McGuire J., Bird K.E. // *J. Biomed. Mater. Research. Part B: Appl. Biomater.* 2010. **94B**. P. 187.

Поступила в редакцию 11.11.13

SYNTHESIS AND ASSESSMENT OF FIREFLY LUCIFERASE–ANTIBODY CONJUGATES FOR BIOLUMINESCENT ENZYME IMMUNOASSAY OF *SALMONELLA* CELLS

G.Yu. Lomakina, E.N. Istrate, N.V. Rudenko, N.N. Ugarova*

(Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia; Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Moscow Region, Russia)

A method was developed for synthesis of stable and highly active firefly luciferase–antibody conjugates using heterobifunctional agent – N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) – as a linker between NH₂-groups of antibodies and free SH-groups of a thermostable *Luciola mingrelica* firefly luciferase (Luc). A new specific matrix to capture *Salmonella* cells was developed: monodisperse polystyrene microparticles were coated with Pluronic F108-PDS which was then covalently labeled with monoclonal anti-*Salmonella* antibodies (Sal). Luc-Sal conjugates were used as detection agents in bioluminescent immunoassay of *Salmonella* cells. The use of this matrix and highly active Luc-Sal conjugates permitted to extend the method sensitivity by ~100 times as compared to the standard «sandwich»-type immunoassay of *Salmonella*.

Key words: firefly luciferase; *Luciola mingrelica*; monoclonal antibody to *Salmonella*; conjugation; bioluminescent enzyme immunoassay for *Salmonella*; polystyrene microparticles; Pluronic F108-PDS.

Сведения об авторах: Ломакина Галина Юрьевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (lomakinagalina@yahoo.com); Иstrate Елена Николаевна – выпускница кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (alena.istrate@gmail.com); Руденко Наталья Васильевна – ст. науч. сотр. Филиала Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, канд. биол. наук (nrudkova@rambler.ru); Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (nugarova@gmail.com).