

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 5×10^{-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

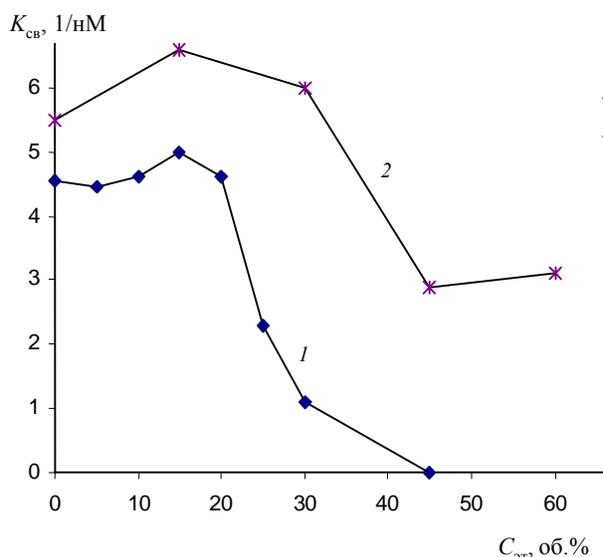


Рис. 1. Зависимость K_{cb} At от концентрации этанола в системе: 1 – свободные At, 2 – комплекс At – гепарин

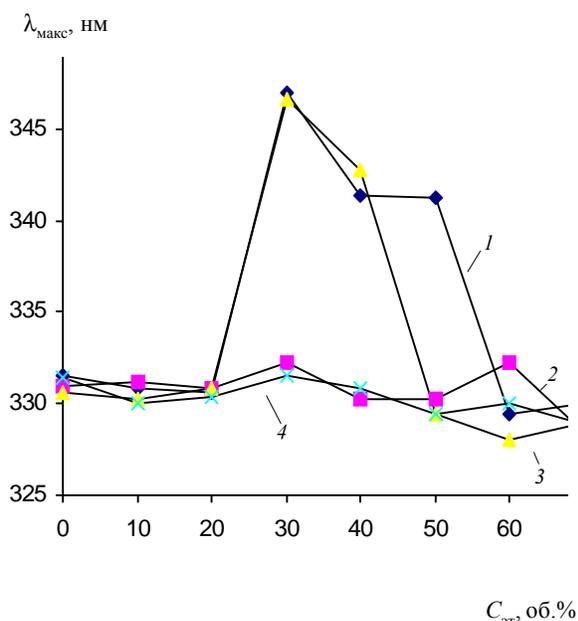


Рис. 2. Зависимость длины волны максимума флуоресценции (λ_{max}) от концентрации этанола в системе для препаратов At: 1 – свободные At, 2 – комплекс At–гепарин, 3 – комплекс At–Ag, 4 – комплекс At–Ag–гепарин

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 (λ_{max}) в спектрах флуоресценции свободных At в водно-этанольных смесях представлена на рис. 2, где показано, что при низком содержании этанола (до 20 об.%) λ_{max} 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 λ_{max} . Подобное уменьшение λ_{max} 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 λ_{max} 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.%).

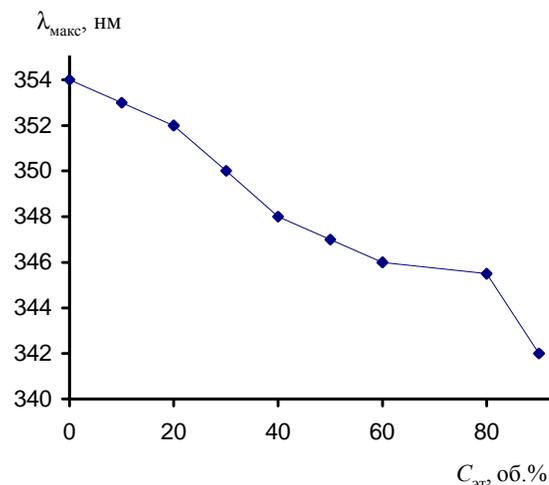


Рис. 3. Зависимость длины волны максимума флуоресценции (λ_{max}) от концентрации этанола в системе для N–Ac–L–Trp

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