

УДК 577.112.4:547-386

О. С. ГАРБУЗ, И. И. ВАШКЕВИЧ, О. В. СВИРИДОВ

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ПОЛИКАРБОКСИЛАТНЫМ КОМПЛЕКСОНАТОМ ЕВРОПИЯ

Институт биоорганической химии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 17.05.2013)

Лантанидный иммунофлуориметрический анализ (ЛИФМА) относится к числу высокочувствительных неізотопных методов анализа. Тест-системы на его основе используются в биохимических исследованиях и в клинической лабораторной практике в тех случаях, когда чувствительность анализа, воспроизводимость и достоверность получаемых результатов имеют первостепенное значение [1].

В ЛИФМА в качестве детектирующих молекул чаще всего используют конъюгаты белков (например, иммуноглобулинов) с комплексоном Eu^{3+} . Все реагенты для модификации полипептидов комплексами редкоземельных элементов объединяют в себе две главные функции: прочное связывание ионов Eu^{3+} и наличие реакционноспособной группы для ацилирования белков. На практике для модификации белков в целях ЛИФМА с использованием диссоциативно усиливающего раствора часто используют комплекс 1-(4-изотиоцианобензил)-диэтилентриаминтетрауксусной кислоты (ДТТК) с Eu^{3+} [2] или диангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПК) [3]. В результате взаимодействия изотиоцианатной группы с ϵ -аминогруппой остатка лизина полипептидной цепи образуется тиокарбаматная связь, которая, однако, не относится к числу самых устойчивых, и получаемый конъюгат металлохелатной метки и белка является весьма лабильным соединением. Использование диангидрида ДТПК – распространенный и широко используемый подход к введению в структуру белка ионов металлов. Взаимодействие ангидридной группы с первичными аминогруппами полипептида приводит к образованию прочной амидной связи. Основные недостатки применения этого реагента – образование димеров (олигомеров) модифицированного белка и меньшая по сравнению с изотиоцианобензильным производным ДТТК удельная флуоресцентная активность меченого полипептида [2].

Нами предложена новая методика модификации белков с целью введения в их структуру ионов Eu^{3+} , синтезированы конъюгаты антител и микробного белка стрептавидина с комплексонатом европия и изучены некоторые их свойства.

Материалы и методы. Использовали ДМСО фирмы «Applichem» (Германия), N-Вос-1,2-этилендиамин, диизопропилкарбодимид, N-гидроксисукцинимид, бычий сывороточный альбумин (БСА), триэтиламин фирмы «Sigma» (США), усиливающий раствор фирмы «Wallac Oy» (Финляндия). Все препараты очищенных белков, использованных для химической модификации или покрытия планшетов в ЛИФМА, получены в лаборатории химии белковых гормонов нашего института. Гель-фильтрацию проводили на колонке PD-10, заполненной Sephadex G-25, фирмы «General Electric» (Великобритания). На всех стадиях синтеза применяли деионизованную воду с удельным сопротивлением не ниже 16 МОм·см. Для проведения анионообменной хроматографии использовали сорбент Amberlite CG-400 I фирмы «Serva» (Германия).

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C записывали на приборе фирмы «Bruker BioSpin» AVANCE 500 с рабочими частотами 500 и 125 МГц в d_6 -ДМСО и D_2O . Химические сдвиги определяли относительно сигналов ДМСО (δ_{H} 2.54 м. д. и δ_{C} 40.45 м. д.) и внутреннего стандарта ацетона (δ_{H} 2.22 м. д. и δ_{C} 30.89 м. д.). Масс-спектры получали на приборе LCQ Fleet фирмы «Thermo Electron».

Получение 2-аминоэтиламида ДТПК. 2-аминоэтиламид ДТПК синтезировали по методике, подробно описанной для соответствующего 6-аминогексиламида [4]. Выход: 45 %. Масс-спектр, m/z : 434 [M]⁺. Спектр ЯМР ¹H (D₂O, δ, м. д.): 3.20 (т, 2H), 3.27-3.36 (м, 4H), 3.46 (т, 2H), 3.58 (т, 2H), 3.64 (т, 2H), 3.67 (с, 2H), 3.76 (с, 2H), 3.83 (с, 2H), 3.92 (с, 4H). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O, δ, м. д.): 37.5, 39.6, 51.2, 52.0, 52.5, 52.9, 55.1, 56.7, 58.1, 58.3, 171.1, 171.4, 173.1, 174.0.

Синтез ди-N-оксисукуцинимидного эфира адипиновой кислоты. Использовали метод, предложенный в работе [5]. 0,44 г (3 ммоль) адипиновой кислоты растворяли в 15 мл диоксана. Добавляли 0,73 г (6,3 ммоль) N-гидроксисукуцинимид. При охлаждении на ледяной бане и перемешивании вносили 0,97 мл (6,3 ммоль) диизопропилкарбодиимида. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 10–15 °С и 20 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок диизопропилмочевины отфильтровали, из фильтрата отгоняли значительную часть растворителя, продукт высаждали диэтиловым эфиром. Очищали диэфир адипиновой кислоты повторным растворением в диоксане с последующим высаждением диэтиловым эфиром. Выход 56 %. Масс-спектр, m/z : 341 [M]⁺. Спектр ЯМР ¹H (d₆-DMCO, δ, м. д.): 1.68–1.74 (4H, м, -CH₂-), 2.74 (4H, т, -OOC-CH₂-), 2.81 (8H, с, -OC-CH₂-CH₂-CO-). Спектр ЯМР ¹³C (d₆-DMCO, δ, м. д.): 24.2, 26.4, 30.6, 169.7, 171.2.

Получение моно-N-оксисукуцинимидного эфира комплексоната Eu³⁺. 0,042 г (0,096 ммоль) 2-аминоэтиламида ДТПК при нагревании до 60 °С растворяли в 1,0 мл ДМСО и добавляли 0,050 мл (0,36 ммоль) триэтиламина. Отдельно 0,040 г (0,117 ммоль) ди-N-оксисукуцинимидного эфира адипиновой кислоты растворяли в 0,55 мл ДМСО. Охлажденный до комнатной температуры раствор 2-аминоэтиламида ДТПК при интенсивном перемешивании приливали к раствору диэфира. За ходом реакции следили по ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля фирмы «Sorbfil» (Россия) в системе 10 %-ный ацетат аммония : метанол, 1:3. R_f продукта реакции 0,55.

Через 1 ч перемешивания к реакционной среде добавляли 1,5 мл 0,1 М раствора муравьиной кислоты с pH 4,4, доведенного с помощью 0,1 М NaOH. Выпавший осадок избытка ди-N-оксисукуцинимидного эфира удаляли после центрифугирования, а надосадочную жидкость наносили на колонку с Amberlite в форме формиата (1,7×1,7 см), уравновешенную смесью вода : ДМСО (1:1). Колонку промывали сначала водой, затем 10 мл 5 М муравьиной кислоты. Фракции, собранные при элюировании кислотой, объединяли и лиофилизировали. Лиофилизированный моно-N-оксисукуцинимидный эфир растворяли в метаноле. Добавлением этилацетата высаждали продукт в виде белого кристаллического вещества. 0,010 г высушенного активированного эфира ДТПК растворяли в 0,2 мл воды. 0,020 мл раствора вносили в полипропиленовую пробирку вместимостью 4 мл, добавляли 0,014 мл 0,1 М раствора хлорида европия, перемешивали и приливали 2 мл ацетона. Образовавшийся осадок поликарбоксилатного комплексоната Eu³⁺ центрифугировали, супернатант удаляли. Осадок промывали 2 мл ацетона и сушили в вакуум-эксикаторе над P₂O₅.

Синтез конъюгатов белков с использованием моно-N-оксисукуцинимидного эфира комплексоната Eu³⁺. 0,1 мл раствора (1 г/л) антител барана к иммуноглобулинам мыши или 0,1 мл раствора (3,3 г/л) микробного белка стрептавидина в 0,1 М NaHCO₃, pH 8,3, вносили в полипропиленовую пробирку, содержащую моно-N-оксисукуцинимидный эфир комплексоната Eu³⁺. Встряхивали 3 ч при комнатной температуре, затем выдерживали при 4 °С в течение ночи. Добавлением 0,05 М Трис-HCl буфера, pH 7,8, содержащего 0,15 М NaCl и 0,05 % NaN₃ (раствор А) доводили объем раствора конъюгата до 2,5 мл для дальнейшей процедуры обессоливания.

Получение конъюгатов белков с Eu³⁺ с использованием диангидрида ДТПК. К 0,1 мл раствора (5,8 г/л) антител барана к иммуноглобулинам мыши в 0,1 М NaHCO₃, pH 8,3, при интенсивном перемешивании добавляли диангидрид ДТПК в ДМСО (объем вносимого ДМСО не превышал 5% от объема раствора антител). Количество диангидрида ДТПК рассчитывали таким образом, чтобы мольное соотношение диангидрид : белок составляло 2, 20, 50 или 100. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 мин, затем инкубировали 1 ч при комнатной температуре с периодическим встряхиванием. Добавляли 0,1 мл раствора EuCl₃ в 0,1 М уксусной кислоте (соотношение Eu³⁺ : ДТПК 1 : 1) и выдерживали конъюгат при комнатной температуре в течение 1 ч, при периодическом встряхивании. Раствором А доводили объем конъюгата до 2,5 мл.

Очистка конъюгатов. На колонку с Sephadex G-25 наносили 2,5 мл раствора конъюгата и проводили удаление низкомолекулярных примесей в соответствии с инструкцией производи-

теля. Для элюирования использовали раствор А. Аликвоту модифицированных комплексонатом Eu^{3+} белков отбирали для проведения электрофореза. К остальному объему обессоленного конъюгата добавляли БСА до конечной концентрации 2 г/л и хранили растворы при 4 °С.

Изготовление иммуносорбента, покрытого иммуноглобулинами мыши и проведение ЛИФМА. В лунки полистирольного планшета вносили 0,1 мл раствора иммуноглобулинов мыши в концентрациях 0, 0,1, 1 и 5 мг/л в 0,1 М NaHCO_3 , pH 8,3. Инкубировали планшет при комнатной температуре в течение ночи. Содержимое лунок удаляли, промывали дважды по 0,35 мл 0,05 М Трис-НСI буфером, pH 7,8, содержащим 0,15 М NaCl , 0,02 % Tween и 0,01 % NaN_3 (раствор Б). Затем в каждую лунку вносили 0,35 мл 0,05 М Трис-НСI буфера pH 7,8, содержащего 0,15 М NaCl , 2 г/л БСА, 0,01 % Tween и 0,02 % NaN_3 , и инкубировали в течение 3 ч при 37 °С. Раствор из лунок удаляли, планшет сразу использовали для проведения анализа.

В лунки планшета вносили по 0,1 мл растворов (0,2 мг/л) конъюгатов, полученных при помощи N-оксисукцинимидного эфира комплексоната Eu^{3+} и диангирида ДТПК. Инкубировали 30 мин при 37 °С. Лунки промывали раствором Б 6 раз по 0,35 мл. Вносили 0,1 мл усиливающего раствора. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре со встряхиванием. Измеряли флуоресцентный сигнал при длине волны возбуждения и регистрации 320 и 615 нм соответственно с временной задержкой 400 мкс во флуориметре DELFIA 1234 фирмы «Wallac Oy» (Финляндия).

Изготовление иммуносорбента, покрытого тироглобулином, и проведение ЛИФМА сэндвич-типа. Иммунизацию белка и блокирование поверхности лунок планшета проводили по схеме, описанной выше. Раствор тироглобулина вносили в концентрации 3 мг/л. ЛИФМА проводили в две стадии. В лунки планшета добавляли по 0,1 мл моноклонального антитела (МАт) мыши к тироглобулину в различных концентрациях, инкубировали 1 ч при 37 °С. Тремя порциями по 0,35 мл промывали лунки и вносили в них по 0,1 мл раствора (1 мг/л) конъюгатов антимышинных антител с комплексонатом Eu^{3+} . Проводили инкубацию в течение 30 мин при 37 °С. Лунки промывали и вносили 0,1 мл усиливающего раствора. Измеряли сигнал, как описано выше.

Изготовление иммуносорбента, покрытого конъюгатом биотин-БСА, и проведение конкурентного анализа. Иммунизацию конъюгата биотин-БСА в концентрации 0,1 мг/л проводили по описанной выше схеме. Затем в лунки планшета вносили 0,05 мл раствора конъюгата стрептавидина с Eu^{3+} (0,1 мг/л) и 0,05 мл растворов стрептавидина (от 0 до 0,8 мг/л) или биотина (от 0 до 16 мкг/л). Проводили инкубацию в течение 30 мин при 37 °С. Лунки промывали и вносили 0,1 мл усиливающего раствора. Измеряли флуоресцентный сигнал, как описано выше.

Результаты исследований и их обсуждение. N-оксисукцинимидные эфиры карбоновых кислот являются хорошо известными и широко используемыми для модификации белков ацилирующими реагентами. Эфирная группа также, как и ангидридная, взаимодействует с первичными аминогруппами с образованием амидной связи. Введение в структуру белка комплексов [^{111}In] с помощью N-оксисукцинимидных эфиров ДТПК уже было предложено рядом исследователей. Использовали пента-N-оксисукцинимидный эфир ДТПК, который не лишен главного недостатка диангирида ДТПК, т. е. остается поперечно сшивающей молекулой [6]. Также была сделана попытка получения моно-N-оксисукцинимидного эфира, который авторы вводили в реакцию с белком в составе реакционной смеси [7]. Оба предложенных подхода к модификации полипептидов с помощью N-оксисукцинимидных эфиров ДТПК также, как и в случае с диангиридом ДТПК, предполагают проведение дополнительной стадии хелатирования иона металла модифицированным белком, приводящей к формированию комплекса белок-ДТПК- Me^{3+} .

Предложенная нами методика модификации белков удобна и эффективна. В ее основу положен метод моно-N-оксисукцинимидных эфиров и при синтезе конъюгатов она не требует дополнительной стадии образования металлохелата белка.

Взаимодействие 2-аминоэтиламида ДТПК с избытком ди-N-оксисукцинимидного эфира адипиновой кислоты приводит к образованию моно-N-оксисукцинимидного эфира производного ДТПК. Очистка на анионообменной колонке позволяет отделить целевое соединение, которое элюируется с колонки муравьиной кислотой, от побочных продуктов реакции. Хроматография, проводимая в водном растворе, а также комплексообразование из водной среды могут привести к ча-

стичному разложению активированного эфира поликарбоксилатного комплексоната Eu^{3+} . Однако, как будет показано далее, белки после введения их в реакцию с образующимся хелатом представляют собой конъюгаты с Eu^{3+} .

Электрофоретические характеристики конъюгатам давали по результатам электрофореза в восстанавливающих условиях, проведенного в 10 %-ном полиакриламидном геле. Сравнение электрофореграмм конъюгатов, синтезированных с помощью диангирида ДТПК и моно-N-оксисукцинимидного эфира комплексоната Eu^{3+} , позволяет выделить преимущество предложенной методики модификации белков. Из рис. 1, *а* видно, что при соотношении диангидрид:белок 20:1 наблюдается частичная сшивка полипептидных цепей иммуноглобулинов барана, а при соотношении 100:1 практически весь белок находится в виде олигомеров. По литературным данным возможными последствиями сшивания цепей может быть неконтролируемое увеличение сигнала в виде неспецифического связывания при проведении ЛИФМА или потеря антителом антигенсвязывающей активности [8], хотя в наших экспериментах этого не наблюдалось (таблица). Синтез конъюгата по предложенной нами методике не приводит к видимым структурным изменениям молекулы иммуноглобулина (рис. 1, *б*). Следовательно, при использовании такого подхода можно повышать степень модификации белка и его удельную активность за счет увеличения количества вносимого реагента, что не будет приводить к нежелательной сшивке белка.

Биоспецифическую активность антител определяли в ходе диссоциативно усиленного ЛИФМА с использованием иммуносорбента с адсорбированными мышинными иммуноглобулинами. Коэффициент вариации результатов измерений в ЛИФМА не превысил 10 %, фоновые значения оказались в пределах нормы, что говорит об отсутствии неспецифической адсорбции при проведении анализа. Наблюдалось ожидаемое возрастание сигнала при увеличении количества адсорбированных иммуноглобулинов мыши (таблица). Однако из таблицы видно, что в случае конъюгата, полученного при использовании диангирида ДТПК, ответ выше в 2–3 раза по сравнению с конъюгатом, синтезированным с помощью моно-N-оксисукцинимидного эфира поликарбоксилатного комплексоната Eu^{3+} . Такие результаты могут быть следствием получения модифицированных белков с более высокой активностью при проведении синтеза из более концентрированных растворов белков. Данные, приведенные в таблице, также позволяют сделать вывод о возможности использования модифицированных органическим комплексом Eu^{3+} антител барана при количественной оценке степени покрытия твердой фазы мышинным МАт.

С использованием белковых конъюгатов с комплексономатом Eu^{3+} построена модельная система, которая нашла применение в гибридных технологиях при определении количества мышинных МАт в культуральной жидкости субклонов гибридомы к тироглобулину 5Н8. В лунках по-

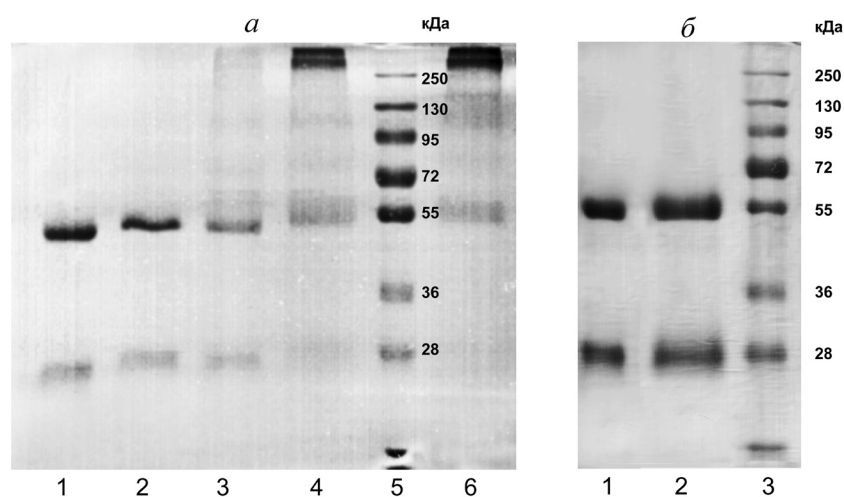


Рис. 1. Электрофорез в 10 %-ном ПААГ в восстанавливающих условиях: *а*) конъюгаты, полученные при использовании диангирида ДТПК (1 – исходное антитело, 2 – соотношение диангидрид ДТПК : белок 2:1, 3 – соотношение 20:1, 4 – соотношение 50:1, 5 – стандарты молекулярных масс, *б*) конъюгаты, полученные при использовании моно-N-оксисукцинимидного эфира ДТПК (1 – исходное антитело, 2 – конъюгат антитела с комплексономатом Eu^{3+} , 3 – стандарты молекулярных масс)

листриольного планшета иммобилизовали антиген тироглобулин. Затем добавляли растворы с известной концентрацией мышинных МАт к адсорбированному антигену или растворы с неизвестным содержанием целевых иммуноглобулинов в составе проверяемой культуральной жидкости. Детектирующим агентом являлось поликлональное антитело к иммуноглобулинам мыши, модифицированное Eu^{3+} . В такой системе удалось зафиксировать в растворе 6 фемоль МАт к тироглобулину, при этом диапазон измеряемых концентраций составил от 0,01 до 5 мг/л (рис. 2), что существенно превышает концентрационный «размах» любого типа иммуноферментного анализа.

Влияние концентрации иммобилизованных в лунках микропланшета мышинных МАт на сигнал, полученный в результате ЛИФМА

Концентрация МАт, мг/л	Интенсивность флуоресценции F , отн. ед.	
	дДТПК	N-OSu
0	1 583	1 564
0,1	19 473	15 682
1	302 384	139 955
5	910 247	327 042

Примечание. 1) дДТПК – конъюгат, полученный с использованием диангидрида ДТПК при исходной концентрации белка 5,8 г/л и соотношении диангидрид:белок 100:1; 2) N-OSu – конъюгат, полученный с использованием моно-N-оксисукцинимидного эфира комплексоната Eu^{3+} при исходной концентрации белка 1 г/л.

Вторым объектом при проверке предложенной методики модификации полипептидов хелатным комплексом Eu^{3+} мы выбрали микробный белок стрептавидин. Стрептавидин (также, как и его аналог, авидин) обладает уникальным свойством образовывать прочные комплексы ($K_a \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$) с биотином (витамин Н) [9]. Конъюгат стрептавидина с комплексономатом европия является универсальной белково-лантанидной меткой и может использоваться для детектирования любых биотинилированных молекул. Сохранившаяся функциональная активность стрептавидина, химически модифицированного металлхелатом, установлена в лантанидном анализе по связыванию с твердофазным конъюгатом биотин-БСА. Результаты конкурентного белково-связывающего анализа с использованием немодифицированного стрептавидина показали возможность применения конъюгата в анализе при определении в растворе количества стрептавидина или другого биотинсвязывающего белка, например авидина куриных яиц, при их получении и очистке (рис. 3, а).

В лантанидном лигандсвязывающем анализе, когда использовался немодифицированный биотин, было установлено, что добавление к конъюгату стрептавидин- Eu^{3+} биотина приводит к снижению связывания стрептавидина с иммобилизованным биотином (рис. 3, б). В диапазоне концентраций биотина от 0 до 3,2 мкг/л наблюдается практически линейное уменьшение сигнала. При большей концентрации лиганда в растворе значения сигнала практически равны фоновым, что, скорее всего, связано с блокированием биотином из раствора всех четырех сайтов ми-

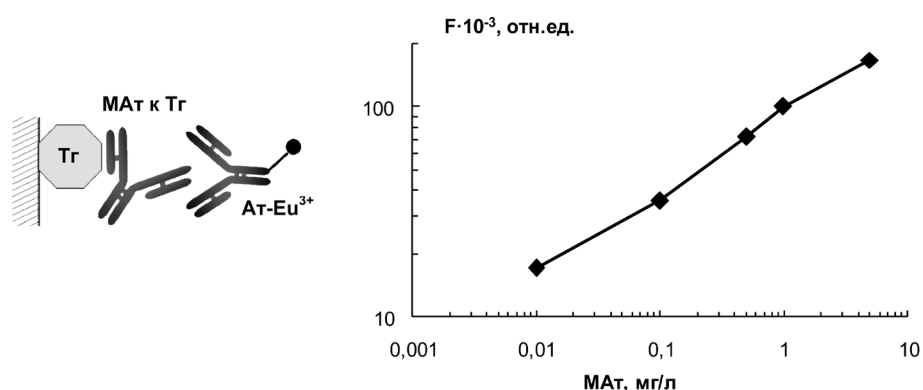


Рис. 2. Схема и калибровочный график ЛИФМА для определения количества мышинных моноклональных антител в культуральной жидкости субклонов гибридомы к тироглобулину. Тг – тироглобулин, Ат – антитела барана к иммуноглобулинам мыши

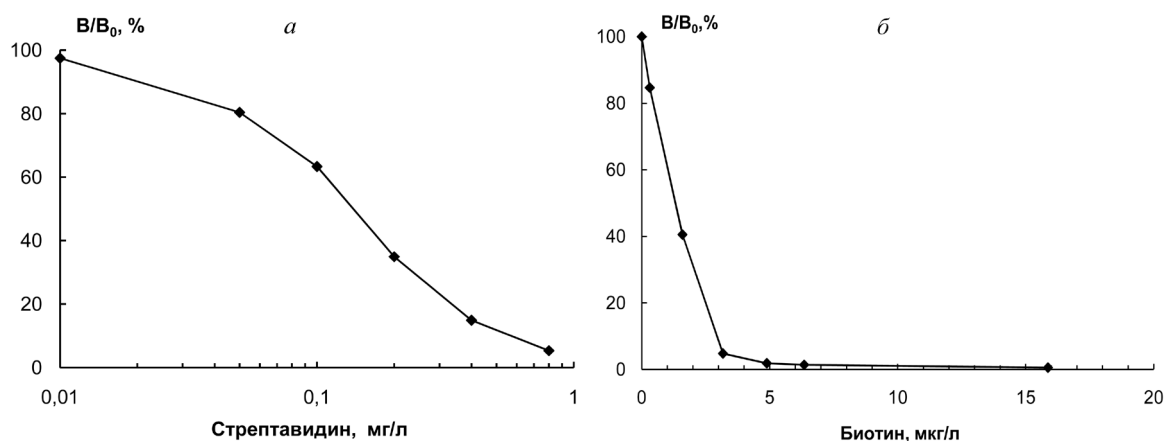


Рис. 3. Конкурентный белково-связывающий анализ с использованием конъюгата стрептавидина с комплексонатом Eu^{3+} и немодифицированного стрептавидина (а) и биотина (б). B/B_0 – относительная флуоресценция в лунках, содержащих возрастающие количества немодифицированного стрептавидина или биотина

кробного белка. Полученные результаты хорошо согласуются с представлениями о структуре и лигандсвязывающей активности стрептавидина и являются одним из доказательств сохранения модифицированным белком своей биотинсвязывающей активности.

Результаты электрофореза, ЛИФМА и белково-связывающего анализа, проведенных с использованием синтезированных по предложенной методике конъюгатов, позволили сделать вывод о сохранности структур и функциональных свойств конъюгатов, полученных с использованием моно-N-оксисукцинимидного эфира поликарбоксилатного комплексоната Eu^{3+} .

Следует отметить, что очистка конъюгатов с помощью гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25 не обеспечивает отделения от белка всего количества химически не связанного комплексоната Eu^{3+} . Поэтому определение степени включения Eu^{3+} в молекулу белка, а также оптимизация условий синтеза и доказательство структуры моно-N-оксисукцинимидного эфира комплексоната Eu^{3+} составляют задачу текущего исследования.

Коллектив авторов выражает благодарность кандидату химических наук В. П. Мартинович за консультации при проведении эксперимента и участие в обсуждении результатов.

Литература

1. Hemmila I., Dakubu S., Mikkala V.-M. et al. // Anal. Biochem. 1984. Vol. 137, N 2. P. 335–343.
2. Mikkala V. M., Mikola H., Hemmila I. // Anal. Biochem. 1989. Vol. 176, N 2. P. 319–325.
3. Соколова М. В., Помелова В. Г., Чудинов А. В. и др. // Вопросы вирусологии. 1991. № 2. С. 140–142.
4. Гарбуз О. С. // Молодежь в науке – 2012: прил. к журн. «Весті НАН Беларусі». Сер. хім. навук. Ч. 1. 2012. С. 15–18.
5. Pilch P. F., Czech M. P. // J. Biol. Chem. 1979. Vol. 254, N 9. P. 3375–3381.
6. Najafi A., Childs R. L., Hnatowich D. J. // Int. J. Appl. Radiat. Isot. 1984. Vol. 35, N 6. P. 554–557.
7. Paxton R. J., Jakowatz J. G., Beatty J. D. et al. // Cancer Res. 1985. Vol. 45. P. 5694–5699.
8. Paik C. H., Ebbert M. A., Murphy P. R. et al. // J. Nucl. Med. 1983. Vol. 24, N 12. P. 1158–1163.
9. Green N. M. // Adv. Prot. Chem. 1975. Vol. 29. P. 85–133.

O. S. GARBUZ, I. I. VASHKEVICH, O. V. SVIRIDOV

CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEIN WITH EUROPIUM POLYCARBOXYLATE COMPLEXONATES

Summary

A new technique for chemical modification of proteins with polycarboxylate metalochelates has been proposed. The conjugates of immunoglobulin and streptavidin, a bacterial protein, with Eu^{3+} complexonates have been synthesized. Protein metallochelate complexes prepared using diethylenetriaminepentaacetic acid dianhydride have been compared to those prepared from mono-N-hydroxysuccinimide ester of Eu^{3+} polycarboxylate complexonate, using dissociation-based time-resolved fluoroimmunoassay systems.