



УДК 577.164.187+577.112.4

СИНТЕЗ N-ОКСИСУКЦИНИМИДНЫХ ЭФИРОВ БИОТИНА  
И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ДИСУКЦИНИМИДИЛСУЛЬФИТА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ  
ДЛЯ БИОТИНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

Ильина А. В.\*, Рабинков А. Г., Вихрева Е. В.,  
Габибов А. Г.

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта  
Академии наук СССР, Москва;

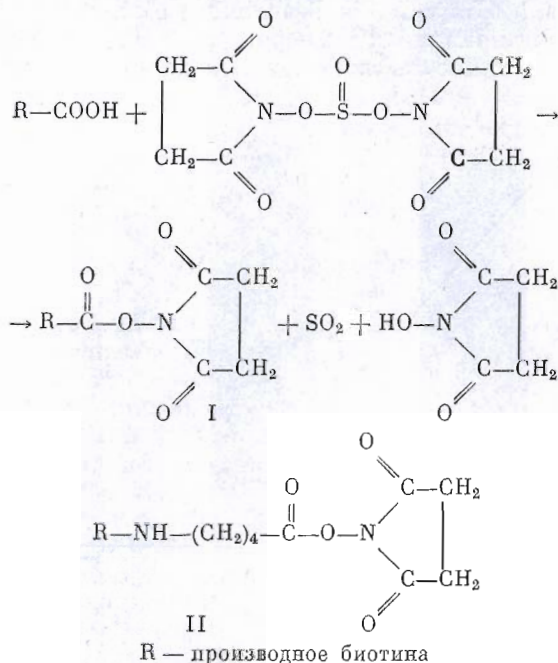
\*Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмелова  
Академии наук СССР, Москва

Предложен новый метод синтеза широко используемого для биотинилирования биологических макромолекул агента — N-оксисукцинимидного эфира биотина и его производных. Используемый для этих целей эффективный трансэтерифицирующий агент — дисукцинимидилсульфит обеспечивает быструю процедуру синтеза с высоким выходом. Получены биологически активные биотинилированные белки. Отработан метод определения микроколичеств биотина в твердой фазе.

Авидин-биотиновая система получила в последнее время широкое распространение в аффинной хроматографии, гистохимии, иммуноанализе, пейзотопной детекции гибридизации нуклеиновых кислот [1–3]. В основе функционирования этой системы лежит чрезвычайно высокое сродство водорастворимого витамина биотина к белку из куриных яиц авидину или его аналогу микробного происхождения стрептавидину ( $K_a=10^{-15}$  M) [4]. Роль авидина (тетрамера с четырьмя идентичными субъединицами) заключается в формировании прочного и специфичного мостика между макромолекулами, в состав которых предварительно введен биотин. Важнейшее условие эффективного применения авидин-биотиновой системы — сохранение биологической активности биотинилированных макромолекул. В настоящее время синтезированы биотинилирующие агенты, селективно взаимодействующие с  $\text{NH}_2$ -,  $\text{SH}$ -,  $\text{C}=\text{O}$  и другими функциональными группами макромолекул [1, 5]. Наиболее распространенным методом биотинилирования является модификация аминогрупп. Для этого чаще всего применяется относительно хорошо растворимый в воде N-оксисукцинимидный эфир биотина. Обычно для его синтеза используется традиционный дициклогексилкарбодиимидный метод [1, 6], имеющий, однако, ряд недостатков. К ним относятся длительность синтеза, трудность отделения от побочного продукта — дициклогексилмочевины, относительно низкий выход.

Предлагаемый в настоящей работе способ синтеза N-оксисукцинимидных эфиров биотина и его производных с использованием трансэтерифицирующего агента дисукцинимидилсульфита [7, 8] обеспечивает быструю процедуру получения целевых продуктов с высоким выходом согласно схеме

Использованные сокращения: DMSO — диметилсульфоксид, DMF — диметилформамид, BSA — бычий сывороточный альбумин, b-BSA — биотинилированный BSA.



Синтез соединений типа (I) проводится в органическом растворителе в присутствии третичного основания с использованием небольшого избытка дисукцинимидилсульфата в течение 1 ч при 20° С. Полученный продукт использован для биотинилирования бычьего сывороточного альбумина (BSA) и  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты. Образующаяся в последнем случае N-биотинил- $\epsilon$ -аминокапроновая кислота превращается затем с помощью дисукцинимидилсульфата в соответствующий N-оксисукцинимидный эфир (II). Полученное соединение по существу является спейсированным аналогом соединения (I). Будучи введенным в состав белков, оно зачастую обеспечивает большую доступность остатков биотина для связывания с авидином, что существенно повышает эффективность функционирования авидин-биотиновой системы. Данный эфир (II) использован для получения биотинилированной щелочной фосфатазы из кишечника тюленя. Об эффективности эфиров (I) и (II) судили по включению биотиновых остатков в молекулы белков.

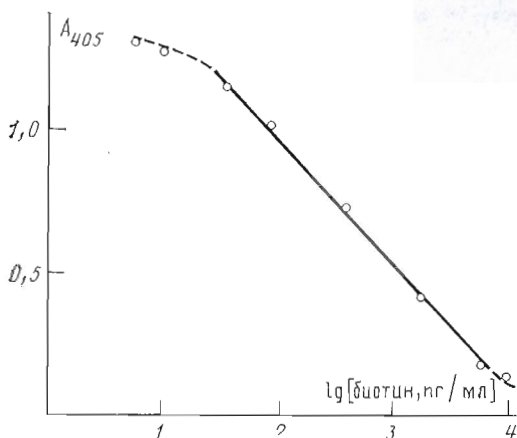
Биотинилированные производные BSA и щелочной фосфатазы с успехом использованы в твердофазном микрометоде определения биотина, основанном на конкуренции биотина, содержащегося в исследуемом материале, с биотинилированным ферментом за связывание с авидином. Последний фиксируется на стандартном планшете для иммуноферментного анализа с помощью предварительно сорбированного на пластик биотинилированного BSA. Метод позволяет определить пикограммовые количества биотина по реакции гидролиза *n*-нитрофенилфосфата связанной щелочной фосфатазой (рисунок).

### Экспериментальная часть

В работе использованы *D*-биотин, BSA (Sigma, США),  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота, *N*-гидроксиукцинимид (Serva, ФРГ), пиридин (Fluka, Швейцария), *N*-метилморфолин (Pierce, США), щелочная фосфатаза кишечника тюленя (Биолар, СССР). Растворители очищали по методам [9];  $\text{SOCl}_2$  перегоняли с трифенилфосфитом [10]. Температуру плавления определяли на столбике Кюфлера, ИК-спектры веществ в вазелиновом масле снимали на приборе Hitachi 260-10 (Япония).

*Дисукцинимидилсульфат.* К охлажденному до -30° С раствору 3 г (26,1 ммоль) *N*-гидроксиукцинимид и 2,6 г (26,1 ммоль) триэтиламина в 20 мл  $\text{CHCl}_3$  прибавляли по каплям при перемешивании раствор 1,6 г

(13,2 ммоль)  $\text{SOCl}_2$  в 5 мл  $\text{CHCl}_3$ . Реакционную смесь выдерживали 30 мин при перемешивании, повышая температуру до  $0^\circ$ . Белый кристаллический осадок дисукцинимидилсульфита отделяли на фильтре, промывали  $\text{CHCl}_3$



Калибровочная кривая определения биотина твердофазным методом

( $3 \times 5$  мл). Выход 3,2 г (88%),  $t_{\text{пл}}$   $140-142^\circ\text{C}$  (с разложением при  $121^\circ\text{C}$ ). ИК-спектр ( $\text{см}^{-1}$ ): 1750, 1730 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1240–1170 ( $\text{S}=\text{O}$ ). УФ-спектр в  $\text{CH}_2\text{CN}$ :  $\lambda_{\text{max}}$  217 нм. Спектр ПМР в DMSO 2,68 м. д. (с, 8 H).

*N*-Оксисукцинимидный эфир биотина. К раствору 500 мг (2 ммоль) *D*-биотина в 5 мл DMF (стандартный раствор) добавляли 0,3 мл (4 моль) пиридина и 690 мг (2,5 ммоль) дисукцинимидилсульфита. Реакционную смесь перемешивали 30 мин, добавляли 1 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и эфиром, высушивали в вакууме. Выход 560 мг (81%),  $t_{\text{пл}}$   $207-$

$209^\circ\text{C}$  (эфир). ИК-спектр ( $\text{см}^{-1}$ ): 1810 (COOR), 1780, 1720, 1210 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

*N*-Биотинил- $\epsilon$ -аминокапроновая кислота. К раствору 167 мг (0,48 ммоль) *N*-оксисукцинимидного эфира биотина в 3 мл DMF, содержащему 140 мкл (1 ммоль) триэтиламина, прибавляли 100 мг (0,53 ммоль)  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты. Реакционную массу перемешивали 1 ч до просветления раствора. Через 3 ч выпавший осадок отфильтровывали, промывали DMF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и эфиром, высушивали в вакууме. Выход 180 мг (100%),  $t_{\text{пл}}$   $216-218$  (DMF),  $213-215^\circ\text{C}$  (вода). ИК-спектр ( $\text{см}^{-1}$ ): 1700, 1630 (COOH).

*N*-Оксисукцинимидный эфир *N*-биотинил- $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты. К суспензии 240 мг (0,7 ммоль) *N*-биотинил- $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты в 7 мл DMF, содержащей 0,2 мл (2 ммоль) *N*-метилморфолина, прибавляли 300 мг (1,1 ммоль) дисукцинимидилсульфита. Реакционную смесь перемешивали 16 ч при  $20^\circ\text{C}$ , затем добавляли 2 мл этилацетата, выдерживали 30 мин при  $20^\circ\text{C}$  и 2 ч при  $4^\circ\text{C}$ . Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали холодным этилацетатом, эфиром, высушивали в вакууме. Выход 237 мг (75%),  $t_{\text{пл}}$   $145-148^\circ\text{C}$  (эфир). ИК-спектр ( $\text{см}^{-1}$ ): 1810 (COOR), 1780, 1730, 1200 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

Биотинилированный бычий сывороточный альбумин (*b*-BSA). 10 мг (0,15 мкмоль) BSA растворяли в 1 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, содержащего 0,85% NaCl, pH 7,5 (буфер А), добавляли 100 мкл 0,05 М раствора *N*-оксисукцинимидного эфира биотина в DMF. Инкубировали 4 ч при  $20^\circ\text{C}$ , затем диализовали против буфера А.

Биотинилированная щелочная фосфатаза. К 1 мл раствора щелочной фосфатазы (1 мг/мл) в 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$  прибавляли 4 мкл 0,1 М раствора *N*-оксисукцинимидного эфира биотина в DMF. Инкубировали 2 ч при  $25^\circ\text{C}$ , затем диализовали против буфера А. Содержание биотина в конъюгате, определяемое с помощью 2-(4-гидроксибензола)бензойной кислоты после обработки проназой методом [11], составляло 40 моль/моль фермента.

Определение биотина твердофазным методом. Определение пикограммовых количеств биотина в биотинилированных образцах ДНК, РНК и белков проводили в планшетах модифицированным методом [12]. В каждую лунку вносили 200 мкл раствора *b*-BSA (20 мкг/мл) в 15 мМ Na-карбонатном буфере, pH 9,6, инкубировали 2 ч при  $37^\circ\text{C}$ , промывали буфером А и инкубировали 1 ч при  $37^\circ\text{C}$  с 300 мкл 0,3% раствора BSA в буфере А, помывали лунки буфером А, содержащим 0,05% тритона X-100. В лунки приготовленного таким образом планшета добавляли по 200 мкл



раствора авидина (2,5 мкг/мл), инкубировали 1 ч при 37°С и промывали буфером А. В каждую лунку вносили по 200 мкл стандартного раствора биотина (0,001–20 нг/мл), затем прибавляли по 50 мкл раствора биотинилированной щелочной фосфатазы (1 мг/мл). Инкубировали 16 ч при 20°С и промывали буфером А, содержащим 0,05% тритон Х-100. Через 2 ч после внесения 200 мкл 5 мМ раствора *n*-нитрофенилфосфата в 20 мМ диэтаноламиновом буфере, рН 9,8, регистрировали поглощение при 405 нм (рисунок). Измерения проводили на спектрофотометре Multiskan (Titertek, США).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bayer E. A., Wilchek M. // *Methods Biochem. Anal.* 1980. V. 26. P. 1–45.
2. Kendall C., Ionescu-Matiu I., Dreesman G. R. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 56. № 3. P. 329–339.
3. Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. № 5. P. 6633–6637.
4. Green N. M. // *Adv. Prot. Chem.* 1975. V. 29. P. 85–133.
5. Bayer E. A., Zalis M. G., Wilchek M. // *Anal. Biochem.* 1985. V. 149. № 4. P. 529–536.
6. May I. M., Williamz R. H., De Haen C. // *J. Mol. Chem.* 1978. V. 253. № 3. P. 686–690.
7. Ильина А. В., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1984. Т. 5. С. 1163–1167.
8. Ильина А. В., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. Дисукцинимидилсульфат в качестве реагента для синтеза *N*-оксисукцинимидных эфиров замещенных аминокислот и пептидов. А.с. 1068428 СССР // *Б. П.* 1984, № 3, с. 78.
9. Гордон А., Форд Р. *Спутник химика.* М.: Мир, 1976. С. 437.
10. Физер Л., Физер М. *Реагенты для органического синтеза.* М.: Мир, 1970. Т. 3. С. 329.
11. Green N. M. // *Meth. Enzymol.* 1970. V. 18 A. P. 418–424.
12. Bayer E. A., Ben-Hur H., Wilchek M. // *Anal. Biochem.* 1986. V. 154. № 2. P. 367–370.

Поступила в редакцию  
23.VI.1988  
После доработки  
23.VIII.1988

#### SYNTHESIS OF *N*-HYDROXY-SUCCINIMIDE ESTERS OF BIOTIN AND ITS DERIVATIVES USING DISUCCINIMIDYLSULFITE AND THEIR APPLICATION FOR BIOTINYLATION OF PROTEINS

IL'YINA A. V., RABINKOV A. G.\*, VIKHREVA E. V.\*, GABIBOV A. G.\*

*A. N. Nesmeyanov Institute of Organo-Element Compounds,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*

*\* V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow*

A new method of synthesis of a widely used biotinylating agent, *N*-hydroxysuccinimide ester of biotin, is proposed. Disuccinimidylsulfite as an effective transesterifying agent provides a fast procedure of the synthesis with high yield. Biologically active biotinylated proteins were thus obtained and the biotin microassay was developed.