



УДК 577.112.4

© 1990 г.

*Е. В. Дикова, Е. М. Гаврилова, А. М. Егоров***ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДНОГО КОМПОНЕНТА  
ПЕРОКСИДАЗЫ НА СОСТАВ И СВОЙСТВА КОНЬЮГАТА  
ИНСУЛИН—ПЕРОКСИДАЗА***Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет*

Изучено влияние концентрации метапериодата натрия на кинетику и глубину протекания процесса окисления углеводного компонента пероксидазы, а также влияние степени окисления углеводного компонента пероксидазы на состав и свойства получаемых конъюгатов.

В практике иммуноферментного анализа широкое распространение в качестве маркера получила пероксидаза хрена [ПХ]. Изофермент С пероксидазы хрена представляет собой гликопротеин, имеющий 8 углеводных цепей, общее содержание которых составляет 21%. Предполагаемый состав одной углеводной цепи пероксидазы соответствует формуле (N-ацетилглюкозамин)<sub>2</sub>-манноза<sub>3</sub>-фукоза<sub>1</sub>-ксилоза<sub>1</sub> [1].

Наиболее часто встречающийся метод получения конъюгатов пероксидазы с антителами (антигенами) — периодатное окисление углеводного компонента пероксидазы метапериодатом натрия [2] с последующим взаимодействием образующихся альдегидных групп с аминоклуппами белков, приводящим к основаниям Шиффа. Преимущество данного метода заключается в высокой реакционной способности образующихся альдегидных групп по сравнению с имеющимися в пероксидазе аминоклуппами лизина и гидроксигруппами серина, недостаток — в образовании в результате сшивок высокополимерных форм конъюгатов, характеризующихся различным мольным составом компонентов [3].

Реакция периодатного окисления углеводных цепей пероксидазы — сложный процесс, зависящий от внешних условий, в частности от концентрации периодата натрия, времени окисления, температуры реакционной смеси, pH и других факторов [4]. Процесс усложняется возможным протеканием фотохимического окисления углеводов озоном, образующимся при разложении периодата натрия на свету, а также их переокислением [5].

Начальная скорость окисления пероксидазы при постоянной ее концентрации прямо пропорциональна используемой концентрации метапериодата натрия, и константа скорости окисления углеводного компонента пероксидазы составляет  $1,23 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$  (рис. 1). Максимально возможное число образовавшихся альдегидных групп на молекулу пероксидазы достигается при мольном соотношении белок :  $\text{NaIO}_4$ , равном 1 : 400, и составляет  $62 \pm 2$ . Дальнейшее повышение избытка  $\text{NaIO}_4$  относительно фермента не приводит к увеличению количества альдегидных групп. Поскольку молекула пероксидазы содержит 8 углеводных цепей, можно полагать, что каждая из них окисляется с образованием 8 альдегидных групп. Использование 4—8-кратных мольных избытков  $\text{NaIO}_4$  по отношению к белку не дает заметного окисления пероксидазы. Время полного окисления углеводных компонентов пероксидазы зависит от соотношения концентрации реагентов и при 250-кратном избытке  $\text{NaIO}_4$  составляет 20 мин.

Пероксидаза с различной степенью окисления углеводного компонента была использована для получения конъюгатов с инсулином, взятым в 10-кратном мольном избытке по отношению к пероксидазе.

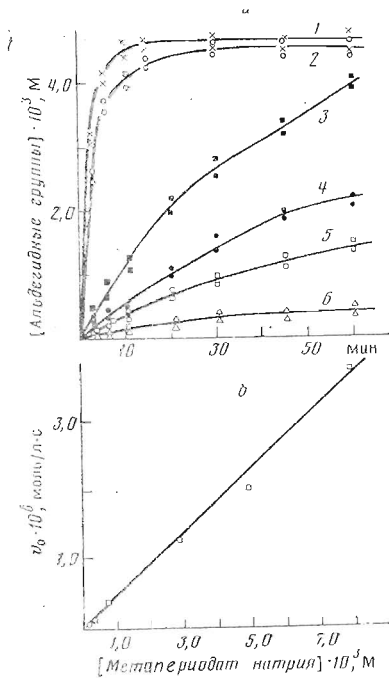


Рис. 1

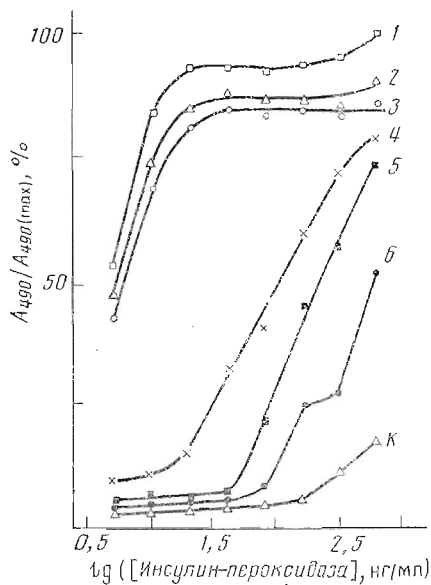


Рис. 3

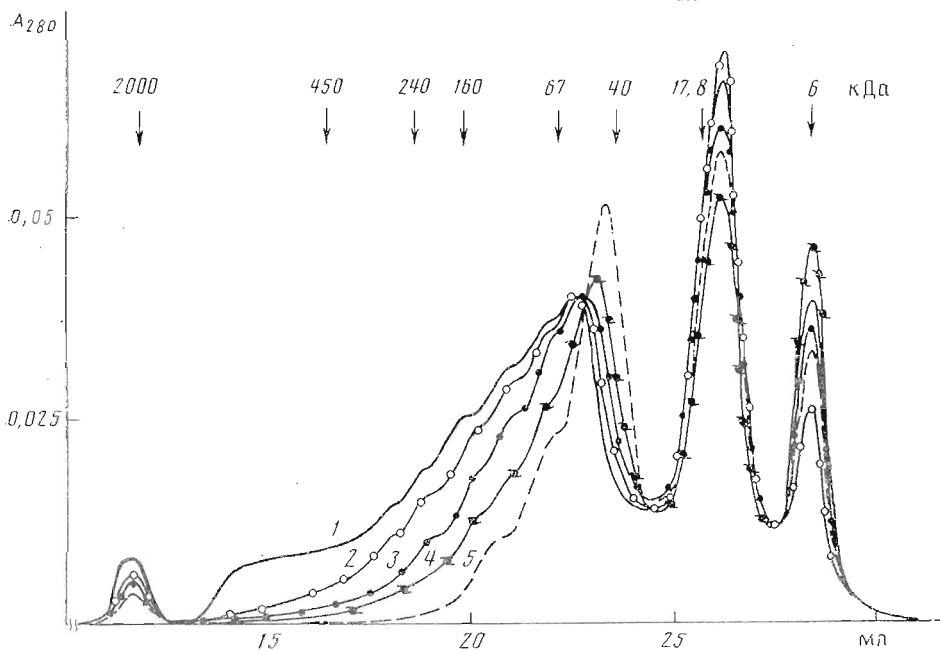


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика окисления углеводного компонента пероксидазы метаперодатом натрия: *a* — кинетические кривые образования альдегидных групп при 400 (1), 250 (2), 155 (3), 88 (4), 20 (5), 8-кратных (6) мольных избытках метаперодата натрия. Концентрация пероксидазы  $7,5 \cdot 10^{-5}$  М; *b* — зависимость начальной скорости образования альдегидных групп ( $v_0$ ) от концентрации метаперодата натрия

Рис. 2. ВЭЖХ конъюгатов, полученных с пероксидазой со степенью окисления 100 (1), 96,8 (2), 91,9 (3), 45,4 (4), 32,3% (5), что соответствует 400, 250, 155, 88 и 40-кратным избыткам метаперодата натрия по отношению к пероксидазе и времени окисления 60 мин. Стрелками обозначен объем выхода маркеров и их молекулярные массы

Рис. 3. Кривые взаимодействия с иммобилизованными антителами к инсулину конъюгатов инсулин—пероксидаза, полученных при степени окисления пероксидазы 100 (1), 91,9 (2), 45,4 (3), 32,3 (4), 30,6 (5), 9,6% (6)

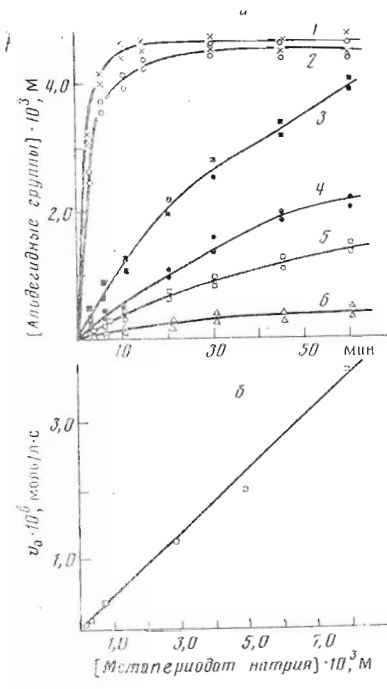


Рис. 1

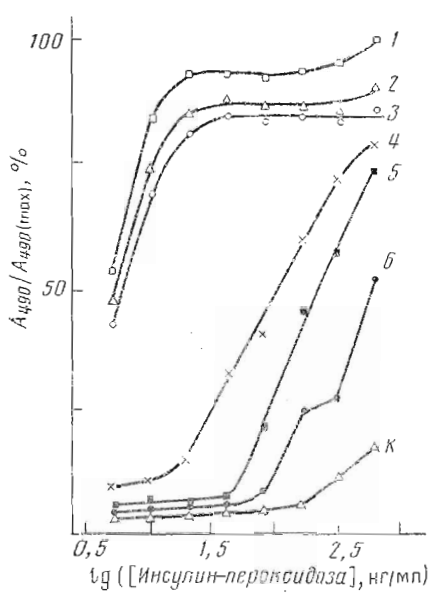


Рис. 3

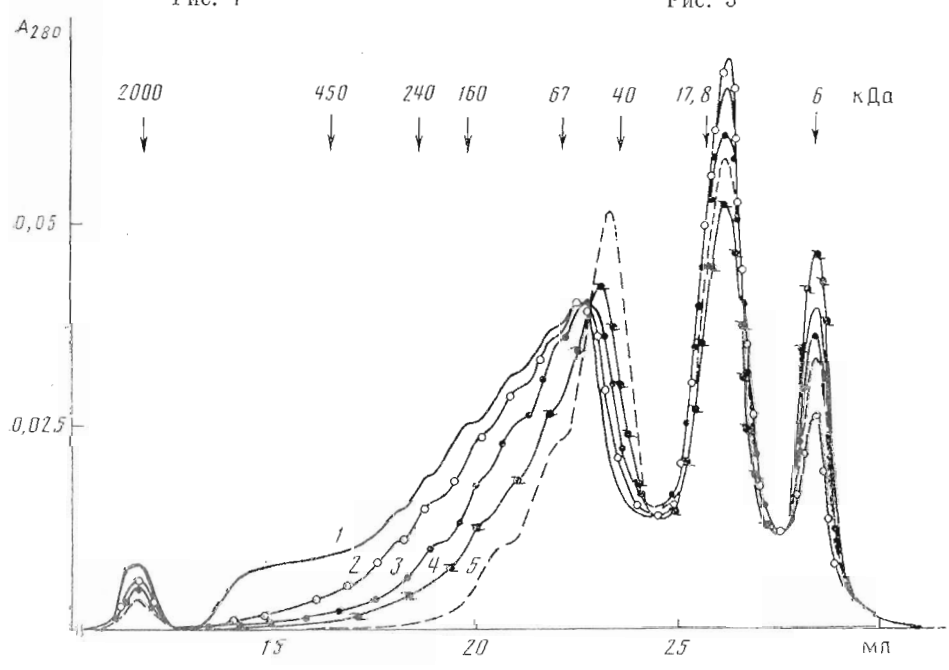


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика окисления углеводного компонента пероксидазы метапериодатом натрия: *a* — кинетические кривые образования альдегидных групп при 400 (1), 250 (2), 155 (3), 88 (4), 20 (5), 8-кратных (6) молярных избытках метапериодата натрия. Концентрация пероксидазы  $7,5 \cdot 10^{-3}$  М; *b* — зависимость начальной скорости образования альдегидных групп ( $v_0$ ) от концентрации метапериодата натрия

Рис. 2. ВЭЖХ конъюгатов, полученных с пероксидазой со степенью окисления 100 (1), 96,8 (2), 91,9 (3), 45,1 (4), 32,3% (5), что соответствует 400, 250, 155, 88 и 40-кратным избыткам метапериодата натрия по отношению к пероксидазе и времени окисления 60 мин. Стрелками обозначен объем выхода маркеров и их молекулярные массы

Рис. 3. Кривые взаимодействия с иммобилизованными антителами к инсулину конъюгатов инсулин—пероксидаза, полученных при степени окисления пероксидазы 100 (1), 91,9 (2), 45,1 (3), 32,3 (4), 30,6 (5), 9,6% (6)

Определение мольного соотношения инсулин : пероксидаза в конъюгатах  
инсулин-пероксидаза различной молекулярной массы \*

Время окисления, мин	Мол. масса фракции, кДа		Мольное соотношение [инсулин] : [ИХ]		Расчитанная мол. масса, кДа		Степень полимеризации конъюгат-мономера	
	экспер.	усредн.	экспер.	усредненное	мономера	полимера		
6	56,0	54±3	2,1 : 1	(2,2±0,4) : 1 **	52	52	1	
11	54,6		2,6 : 1					
15	50,8		1,9 : 1	2 : 1 ***				
6	75,8	88±10	7,8 : 1	(7,1±2,0) : 1 **	88	88	1	
11	79,0		10,4 : 1					
15	83,2		5,8 : 1					
30	87,1		5,0 : 1					
70	100,0		5,6 : 1					8 : 1 ***
90	100,0		6,0 : 1					
6	138,0	172±10	10,7 : 1	(8,5±2,1) : 1 **	88	176	2	
11	170,0		10,4 : 1					
15	158,0		7,9 : 1					
30	158,0		6,1 : 1					
70	178,0		6,5 : 1					8 : 1 ***
90	170,0		6,9 : 1					
15	274,0	275±10	7,8 : 1	(7,8±0,6) : 1 **	88	264	3	
30	288,0		7,7 : 1					
70	263,0		7,3 : 1					
90	275,0		8,5 : 1					8 : 1 ***
70	440,0		8,7 : 1					(7,5±1,8) : 1 **
90	440,0		6,2 : 1					8 : 1 ***

\* Для получения конъюгатов использовали пероксидазу, окисленную при 250-кратном избытке метаперодата натрия в течение различных временных интервалов.

\*\* Экспериментально полученная величина.

\*\*\* Принятое мольное соотношение инсулин : пероксидаза.

Таблица 2

Зависимость количества альдегидных групп в молекуле пероксидазы  
после окисления ее углеводного компонента и после связывания окисленной  
пероксидазы с инсулином

Мольное соотношение [ИХ] : [NaIO <sub>4</sub> ] в реакционной смеси	Время реакции, мин.	Количество альдегидных групп, приходящихся на молекулу пероксидазы		Количество альдегидных групп, вступивших в реакцию с инсулином
		после окисления пероксидазы	после связывания с инсулином	
1 : 400	60	62±2	—	—
1 : 250	60	60±3	—	—
1 : 155	60	57±2	35±2	22
1 : 88	4	3±1	3	0
	10	6±1	1	5
	30	19±3	1	18
1 : 20	60	28±4	2	26
	30	13±2	10±2	3
	45	17±2	13±3	4
1 : 8	60	20±2	10±1	10
	60	6±1	6±1	0

В ряде работ отмечалось, что конъюгаты окисленной пероксидазы с антителами представляют собой смесь полимерных форм с различным мольным соотношением антитело — фермент [3, 6]. В настоящей работе состав конъюгатов инсулин — пероксидаза по молекулярным массам изучали методом ВЭЖХ. Конъюгаты, образующиеся с пероксидазой различной степени окисления (рис. 2), представляют собой многокомпонентную смесь олигомеров различной молекулярной массы: основные компоненты соответствуют 57, 88, 128, 172, 275, 440 кДа и выше. Во фракциях конъюгатов с этими молекулярными массами было определено мольное

Процентный состав конъюгатов инсулина—пероксидазы в зависимости от степени окисления пероксидазы

Степень окисления пероксидазы *, %	Соотношение [PX] : [NaIO <sub>4</sub> ] в реакционной смеси	Количество свободной пероксидазы, %	Содержание конъюгатов различной молекулярной массы (кДа), %						
			57	83	128	176	264	352	>440
100	1 : 400	9,78	19,37	14,40	14,00	10,52	7,93	5,72	18,78
96,8	1 : 250	11,30	19,47	18,99	15,38	12,74	7,22	5,29	9,64
91,9	1 : 155	16,34	20,10	20,22	15,27	10,96	5,86	3,01	4,30
45,2	1 : 80	25,45	30,06	24,17	12,58	6,44	2,76	—	2,15
32,0	1 : 40	48,89	19,68	17,80	8,33	2,65	—	—	2,65

\* При расчете степени окисления пероксидазы за 100% принимали максимально достигнутое количество альдегидных групп на молекулу пероксидазы, равное 62.

соотношение инсулин — фермент. Результаты анализа, а также значения молекулярных масс, рассчитанных по установленному мольному соотношению, приведены в табл. 1. Во фракциях конъюгата с молекулярной массой выше 88 кДа соотношение инсулин — пероксидазы составляет 8 : 1, что соответствует молекулярной массе 88 кДа. Появление в конъюгате фракций с молекулярными массами 172, 275, 440 кДа можно объяснить ковалентным связыванием между собой двух и более структур, состоящих из восьми молекул инсулина и одной молекулы пероксидазы.

При этом определяли количество альдегидных групп в молекуле фермента до проведения реакции взаимодействия с инсулином и после ее завершения. В тех случаях, когда количество образовавшихся альдегидных групп в молекуле пероксидазы не превышает 20—25, в реакцию с инсулином вступают практически все окисленные группы (табл. 2). При более высоких степенях окисления фермента максимальное число альдегидных групп, вступивших в реакцию с инсулином, составляет 22—26. Учитывая это, можно предположить, что при взаимодействии одной молекулы инсулина с одной углеводной цепью пероксидазы в среднем образуются три ковалентные связи.

Анализ хроматограмм (табл. 3) показывает, что при повышении концентрации метапериодата натрия, используемой для окисления пероксидазы, увеличивается содержание высокомолекулярных форм конъюгата с одновременным увеличением степени превращения пероксидазы. Так, при соотношении пероксидазы — NaIO<sub>4</sub> меньше 1 : 40 практически 50% пероксидазы остается в свободном виде, а при соотношении 1 : 150 выход конъюгата увеличивается до 84%. Дальнейшее увеличение концентрации метапериодата натрия повышает степень превращения окисленной пероксидазы в конъюгат до 90%.

В случае использования для окисления пероксидазы незначительных избытков метапериодата натрия (1 : 40, 1 : 80) практически не наблюдается образования высокополимерных конъюгатов с молекулярными массами выше 200 кДа, тогда как при 400-кратном избытке периодата натрия выход полимерных форм с молекулярной массой выше 200 кДа достигает 32%.

Критерием возможности использования получаемых конъюгатов в качестве реагентов в иммуноферментном анализе являются их иммунохимические характеристики. Было проведено изучение взаимодействия конъюгатов, полученных при различных условиях, с антителами к инсулину, иммобилизованными на стенках полистиролевого планшета. Степень сродства конъюгатов инсулина—пероксидазы к антителам зависит от степени окисления пероксидазы, использованной для получения конъюгата (рис. 3). При использовании для получения конъюгата пероксидазы с максимальной степенью окисления 100—92% кривые титрования конъюгатов практически совпадают. При этом увеличение соотношения NaIO — пероксидазы в реакционной смеси выше 150 : 1 не вызывает заметного изменения сред-

ства конъюгатов к антителам. Ранее отмечалось, что использование для окисления пероксидазы высоких избытков  $\text{NaIO}_4$  существенно уменьшает активность фермента и снижает его стабильность [7]. Уменьшение степени окисления пероксидазы, используемой для получения конъюгата, приводит к образованию конъюгатов с меньшим сродством к антителам против инсулина.

Таким образом, в зависимости от условий получения конъюгатов изменяется выход конъюгата, его состав по молекулярным массам и иммунохимические характеристики. В соответствии со структурой и свойствами анализируемого антигена, требованиями, предъявляемыми к анализу, возникает необходимость использования конъюгатов с различными иммунохимическими свойствами. Проведенные исследования позволяют стандартизировать условия получения конъюгатов для ИФА, основанного на использовании пероксидазы в качестве маркера, в зависимости от целей и задач анализа.

### Экспериментальная часть

В работе использовали пероксидазу хрена марки А (НПО «Биолар») ( $M_r$  40 000), свиной монопиковый инсулин (ВНИИКГП), метапериодат натрия, *o*-фенилендиамин, боргидрид натрия (Sigma, США), тритон X-100 (Serva, ФРГ), остальные реактивы — препараты фирмы «Союзреактив», х. ч. и ч. д. а.

Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Du-8B (Beckman, Австрия), иммуноферментный анализ — в полистирольных планшетах (MikroELISA, Dinattech, США), фотометрирование и обработку микропланшетов — на приборе ELISA-Processor II (Hoechst, ФРГ).

*Кинетика окисления углеводного компонента пероксидазы.* К 10 мл раствора пероксидазы (6 мг/мл) добавляли равный объем раствора метапериодата натрия различной концентрации. Реакцию останавливали, перенося аликвоты реакционной смеси объемом 1,0 мл, отобранные через различные промежутки времени, в пробирки, содержащие 0,2 мл 1 М этиленгликоля. Избыток низкомолекулярных компонентов из реакционной смеси удаляли диализом против дистиллированной воды в течение ночи при 4° С.

*Количество альдегидных групп* в окисленной пероксидазе и оставшихся свободными после связывания с инсулином определяли с использованием 2, 4-динитрофенилгидразина по следующей методике: 0,2 мл анализируемого раствора смешивали с 0,3 мл 0,01 М карбонатного буфера, pH 9,5, и с 0,25 мл насыщенного раствора 2,4-динитрофенилгидразина, инкубировали 1,5 ч при 37° С, затем приливали 1,75 мл 1 М раствора КОН и измеряли оптическое поглощение при 450 нм. Насыщенный раствор 2,4-динитрофенилгидразина готовили следующим образом: 4 г гидразина растворяли в 25 мл 2 н. HCl, приливали 20 мл конц. HCl, осадок отделяли на стеклянном фильтре, часть его растворяли в 50 мл 2 н. HCl. Насыщенный раствор 2,4-динитрофенилгидразина хранили в холодильнике. Калибровочную кривую зависимости оптического поглощения от концентрации альдегидных групп строили, используя в качестве стандарта раствор формальдегида известной концентрации.

*Конъюгат инсулин — пероксидаза* получали, смешивая раствор окисленной пероксидазы после диализа с 1 мл раствора инсулина (10 мг/мл) в 0,05 М карбонатном буфере, pH 9,5. Реакционную смесь инкубировали в течение ночи при 4° С, затем проводили диализ против 0,02 М калий-фосфатного буфера, pH 7,2, и определяли количество свободных альдегидных групп. Образовавшийся конъюгат обрабатывали раствором боргидрида натрия (4 мг/мл) в 0,1 М NaOH.

*Распределение конъюгатов по молекулярной массе* изучали методом ВЭЖХ с использованием колонок (7,5 × 600 мм) с TSK SW-4000 (LKB, Швеция) на приборе FPLC (Pharmacia, Швеция). Колонку калибровали с помощью набора маркеров (Pharmacia, Швеция) для определения молекулярной массы методом гель-фильтрации. Хроматографию проводили в 0,02 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,15 М NaCl (ФСБ). Скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Регистрацию осуществляли при

длине волны 403 и 280 нм на проточных спектрофотометрах Pharmacia и Du Pont, соединенных последовательно.

Мольное соотношение пероксидаза — инсулин во фракциях конъюгатов различной молекулярной массы определяли, используя метод пиридингем-хромогена [8] (для определения пероксидазы) и методом Бредфорда [9] (для установления суммарной концентрации белка).

*Иммунохимические свойства конъюгатов инсулин—пероксидаза* исследовали методом твердофазного ИФА, используя IgG-фракцию антисывороток морских свинок к инсулину, полученных по методике [10]. Активацию полистирольных микропланшетов проводили путем физической адсорбции на них антител против инсулина. С этой целью в лунку микропланшета вносили по 0,2 мл раствора антител в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали 1,5 ч при 37° С. После отмывки несвязанных иммуноглобулинов в лунки микропланшета вносили по 0,2 мл раствора конъюгатов в различных разведениях, инкубировали 15 мин при 37° С и промывали ФСБ, содержащим 0,05% тритона X-100. Количество конъюгата, связавшегося с антителами, определяли по ферментативной реакции окисления *o*-фенилендиамина перекисью водорода, внося в лунки микропланшета 0,2 мл субстратной смеси (4 мг *o*-фенилендиамина и 10 мкл конц. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 10 мл фосфат-цитратного буфера, рН 5,0). Ферментативную реакцию останавливали, внося 50 мкл 4 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. За глубиной протекания реакции следили спектрофотометрически при длине волны 490 нм.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Welinder K. G. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 96. P. 483—509.
2. Nakane P. K., Kawaoi A. // J. Histochem. and Cytochem. 1974. V. 22. № 12. P. 1084—1091.
3. Nygren H. // J. Histochem. and Cytochem. 1982. V. 30. № 5. P. 407—412.
4. Dyer J. R. // Meth. Biochem. Anal. 1956. V. 3. P. 111—152.
5. Tijssen P., Kurstak E. // Anal. Biochem. 1984. V. 136. № 2. P. 451—457.
6. Butler J. E. // Methods Enzymol. 1981. V. 73. P. 482.
7. Гаврилова Е. М., Дзантисев Б. В., Егоров А. М. // Биохимия. 1979. Т. 44. № 9. С. 1614—1621.
8. Угарова И. Н., Рожкова Г. Д., Васильева Т. Е., Березин И. В. // Биохимия. 1978. Т. 43. № 5. С. 790—797.
9. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248—254.
10. Сорокина Н. В., Гаврилова Е. М., Егоров А. М., Дюнецкий И. А. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. 1985. № 4. С. 73—76.

Поступила в редакцию  
30.VI.1989

После доработки  
4.IX.1989

Е. В. ДИКОВА, Е. М. ГАВРИЛОВА, А. М. ЕГОРОВ

#### INFLUENCE OF THE PEROXIDASE CARBOHYDRATE MOIETY'S OXIDATION CONDITIONS ON COMPOSITION AND PROPERTIES OF INSULIN—PEROXIDASE CONJUGATES

*Chemical Department, M. V. Lomonosov Moscow State University*

The influence of sodium metaperiodate concentration on kinetics and conversion degree of peroxidase carbohydrate moiety as well as the effect of the oxidation degree of the carbohydrate moiety on the composition, structure and properties of insulin—peroxidase conjugates were studied. The initial rate of peroxidase's oxidation is directly proportional to the periodate concentration; the oxidation rate constant of peroxidase carbohydrate moiety is  $1,23 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . At the molar ratio of metaperiodate to peroxidase 150 : 1 or higher, the maximal quantity of aldehyde groups ( $62 \pm 2$ ) in the peroxidase molecule is formed and the oxidation of each carbohydrate chain leads to the formation of eight aldehyde groups. The molecular mass composition of the insulin—peroxidase conjugates was studied by HPLC. The conjugates proved to be multicomponent mixtures of oligomers (53, 83, 128, 174, 268, 440 kD and higher). The insulin—peroxidase molar ratio in the fractions of the conjugates with molecular masses higher than 83 kD is 8 : 1. It was shown that the affinity of insulin—peroxidase conjugates to antibodies depends on the oxidation degree of peroxidase used for production of conjugates.