



УДК 578.85/86.083.3

© 1993 С. Н. Еременко, И. Е. Сухов, А. И. Мирошников

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРДЕНОЛИДОВ В *Digitalis lanata*  
ТВЕРДОФАЗНЫМ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМИнститут биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН, МоскваКлючевые слова: иммуноферментный анализ; дигоксин;  
карденолиды; моноклональные антитела

Разработан твердофазный иммуноферментный метод определения дигоксина и родственных соединений в экстрактах *Digitalis lanata* на основе дигоксинспецифичных моноклональных антител ( $K_a = 5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ ). Предлагаемый метод позволяет определять дигоксин и близкородственные соединения в концентрациях 0,1 нмоль/мл. Данные содержания дигоксина и родственных соединений в образцах, полученные при использовании иммуноферментного метода, хорошо коррелируют с данными ВЭЖХ-анализа.

Единственным источником таких наиболее широко применяемых в медицинской практике сердечных гликозидов, как дигоксин и ланатозид С, является двухлетнее растение наперстянка шерстистая (*Digitalis lanata* Ehrh. (Scrophulariaceae)). Из-за сложного химического состава, лабильности соединений количественное определение содержания карденолидов в растении достаточно трудная задача. Были предложены варианты определения данных соединений в различных экстрактах наперстянки с помощью ВЭЖХ [1, 2], однако разработка способа наращивания растительных клеток *D. lanata* в культуре требует наличия высокочувствительного метода экспресс-анализа. Для этих целей разными группами исследователей были предложены иммунологические методы анализа карденолидов: РИА [3, 4], ИФА [5].

Целью настоящей работы была разработка твердофазного иммуноферментного метода определения дигоксина и родственных соединений, доступного для использования в клеточной биотехнологии при селекции клеточных клонов *D. lanata*.

В качестве реагентов в предлагаемом методе использовали конъюгат ланатозид-С—гемоцианин, содержащий 420 моль ланатозида С на 1 моль белка (защещение рассчитывали по методу, описанному в работе [6]), и меченные пероксидазой из корней хрена дигоксинспецифичные моноклональные антитела, подробное описание способа получения которых можно найти в работе [7]. Предлагаемый нами метод основан на ингибировании антигеном связывания стандартных меченых антител с сорбированным на твердой фазе конъюгированным антигеном (ланатозид-С—гемоцианин). Метод с использованием меченых антител был выбран по следующим соображениям: работа в режиме избытка меченых

Сокращения: МА — моноклональные антитела; PBS — фосфатно-солевой буфер, BSA — бычий сывороточный альбумин, PBS-BSA-Tween — фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,2% BSA и 0,05% Tween-20; FCS — сыворотка плода коровы.

## Специфичность моноклональных антител D18

Соединение	Перекрестные реакции, %
Дигоксин	100
Деацетилланатозид С	89
Ланатозид С	97
Метилдигоксин*	46
Дигоксигенин	10
Дигитоксин	48
Деацетилланатозид А	7
Ланатозид А	10
Дигитоксигенин	1,5
Гитоксин	0,07
Ланатозид В	0,01
Гитоксигенин	<0,01
Строфантин К	<0,001

\* Синтетическое производное.

Таблица 2

Соотношение суммы дигоксигениновых гликозидов в образцах *D. lanata*, собранных в Ботаническом саду НПО ВИЛР\*

Сравниваемые образцы	ВЭЖХ-анализ с расчетом по методу внешнего стандарта	Твердофазный ИФА
1/3	1,26	1,25
1/2	1,028	1,05
2/3	1,2	1,2
4/5	1,15	1,3

\* 1—3 — номера образцов лиофильно высушенных свежих листьев *Digitalis lanata*; 4, 5 — номера образцов сухой ткани.

моноклональных антител позволяет использовать тестируемый антиген в более широком диапазоне концентраций, чем в системах, основанных на применении меченого антигена [8], что существенно при анализе экстрактов растений и клеточных культур, где содержание карденолидов в различных образцах может отличаться в несколько раз. Другое преимущество метода меченых антител заключается в практически полном исключении матричных эффектов [9]. Кроме того, методики получения конъюгатов антител с ферментами отработаны и хорошо воспроизводимы в отличие от методик получения конъюгатов низкомолекулярных соединений с ферментами; гаптены в конъюгатах с высокомолекулярными ферментами могут быть экранированы и, таким образом, недоступны для антител (что, например, мы наблюдали при получении конъюгата дигоксин—пероксидаза).

Специфичность используемых в методе моноклональных антител подкласса G1, секретируемых клоном D18, представлена в табл. 1. Антитела выделяли из асцитной жидкости осаждением сульфатом аммония с последующей хроматографией на DEAE-целлюлозе. Гомогенность полученных антител подтверждали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

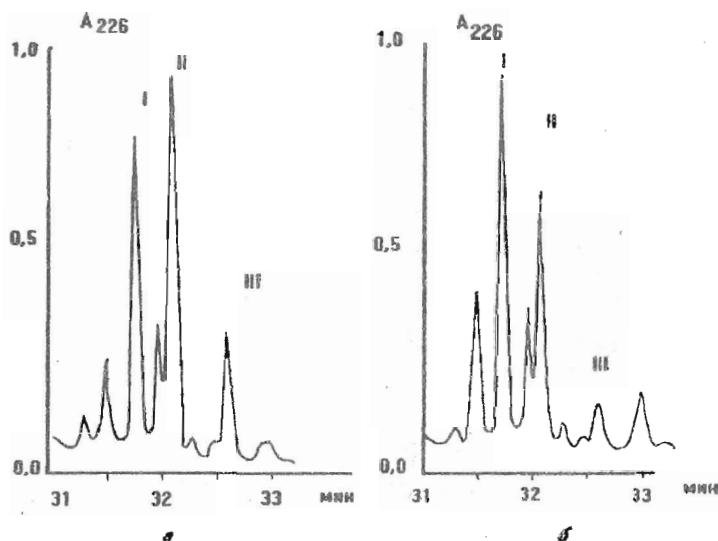


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ образцов (200 мкл) *D. lanata* 1 (а) и 3 (б); I — дезацетилланатозид С; II — ланатозид С; III — дигоксин

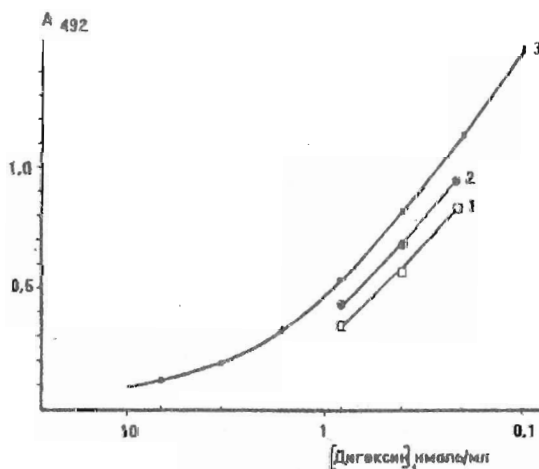


Рис. 2. Определение содержания карденолидов в образцах *D. lanata* 1 (1) и 3 (2) методом ИФА; 3 — калибровочный график

Для проведения анализа в лунки 96-луночных планшетов с сорбированным антигеном и измеряемыми пробами добавляли постоянное количество меченых антител, выбранное с таким расчетом, чтобы значение поглощения после окончания реакции составляло 1,5 — 1,7 в отсутствие определяемого образца. После 1 ч инкубации измеряли ферментативную активность, связанную с твердой фазой. По значениям поглощения, полученным для стандартных растворов дигоксина известной концентрации, строили калибровочный график, на основании которого определяли концентрацию дигоксина и родственных соединений в образцах.

Нами было проанализировано 14 различных образцов *D. lanata*. Результаты анализа хорошо коррелируют с данными суммарного содержания ланатозида С, дезацетилланатозида С и дигоксина, полученными с помощью ВЭЖХ. На рис. 1 и 2 приведены примеры определения суммарного содержания карденолидов в образцах 1 и 3 двумя методами. В табл. 2 представлены соотношения карденолидов в некоторых образцах, измеренные предлагаемым методом и методом ВЭЖХ.

Чувствительность созданной иммуноферментной тест-системы составляет 0,1 нмоль дигоксина/мл, что позволяет достоверно определять содержание карденолидов в 100 мкг влажной или 10 мкг сухой ткани, реально же нужно такое количество ткани, которое можно достаточно точно взвесить. Для проведения анализа не требуется сложная предварительная обработка образца, связанная с риском потери части определяемых веществ, как в случае ВЭЖХ-анализа; кроме того, предлагаемая тест-система позволяет анализировать большое число образцов одновременно.

Таким образом, применение твердофазного иммуноферментного метода определения дигоксигениновых гликозидов позволит значительно облегчить работу по выбору высокопродуктивных клонов *D. lanata* и даст возможность более детально изучить условия накопления этих гликозидов в растении.

### Экспериментальная часть

В работе использовали среду RPMI-1640, сыворотку плода коровы, растворы НАТ, НТ (Gibco, Великобритания), кроличьи антитела к IgG мыши, меченные пероксидазой из корней хрена (DAKO-Immunoglobulins, Дания), пероксидазу из корней хрена (Boehringer-Mannheim, ФРГ), полный и неполный адьюванты Фрейнда (Calbiochem, США), полиэтиленгликоль-6000, диметилсульфоксид (Merck, ФРГ), дигоксин, твин-20 (Sigma, США), набор для определения подклассов иммуноглобулинов (Calbiochem, США), бычий сывороточный альбумин, человеческий сывороточный альбумин (Serva, ФРГ), гемоцианин (Fluka, Швейцария), флаконы на 50 и 200 мл, 24- и 96-луночные планшеты для клеточных культур (Nunc, Дания), 96-луночные планшеты для иммуноанализа (Costar, США), гликозиды *D. lanata* (ВНИИХТЛС, Харьков).

*Синтез антигена дигоксин*—человечий сывороточный альбумин осуществляли по методу, описанному в работе [10]. Аналогично были получены конъюгаты дигоксин—бычий сывороточный альбумин и ланатозид-С—гемоцианин. Степень замещения полученных конъюгатов определяли способом, описанным в работе [6]. Эти значения составили соответственно 9 и 12 моль дигоксина/моль белка и 420 моль ланатозид-С/моль белка.

*Получение моноклональных антител к дигоксину*. Подробное описание получения моноклональных антидигоксиновых антител дано в работе [7]. Супернатанты растущих клонов анализировали на присутствие антител к дигоксину твердофазным ИФА, используя в качестве антигена конъюгат дигоксина с BSA. Клетки положительного клона клонировали методом предельных разведений [11] в 96-луночном планшете, содержащем фидерный слой макрофагов, из расчета 0,3 клетки на лунку. После появления клонов супернатанты тестировались на присутствие МА. Криоконсервирование гибридомы осуществляли в смеси равных объемов среды RPMI-1640 и FCS, содержащей 15% диметилсульфоксида по  $10^6$  клеток в ампуле.

*Получение моноклональных антител в препаративных количествах*. Гибридомы ( $3 \cdot 10^6$  клеток на мыш) вводили внутривентриально мышам линии BALB/c, которым за 7—10 сут до этого ввели по 0,5 мл пристана. После появления у мышей асцитных опухолей (через 5—14 сут) собирали асцитную жидкость, клетки удаляли центрифугированием, асцитную жидкость хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . Иммуноглобулиновую фракцию осаждали насыщенным раствором сульфата аммония, диализовали против PBS, хроматографировали на DEAE-целлюлозе с использованием градиента концентрации NaCl (0—0,5 М) в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,2. Концентрацию антител определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Ultrospec 4050 (LKB, Швеция). Гомогенность выделенных антител проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Полученные антидигоксиновые антитела относятся к подклассу G1, что было определено твердофазным ИФА с использованием меченных пероксидазой козьих антител к подклассам мышинного IgG. Константу

связывания антител с гаптеном  $5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  определяли по методу Бьюти [12]. Специфичность МА (процент перекреста с аналогами дигоксина) определяли методом ИФА, расчет проводили способом, описанным в работе [3].

Получение конъюгата моноклональных антител с пероксидазой из корней хрена. Конъюгат получали по методу [13], смешивали с равным объемом глицерина и хранили при  $-20^\circ \text{C}$ .

Определение содержания карденолидов в *Digitalis lanata* твердофазным ИФА. Конъюгированный антиген ланатозид С-гемоцианин в концентрации 10 мкг/мл сорбировали 2 ч при  $37^\circ \text{C}$  на полистироловых 96-луночных планшетах по 100 мкл на лунку в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9,6), затем твердую фазу 3 раза отмывали 0,05% тритоном X-100 и водой. В лунки планшета вносили по 50 мкл буфера PBS-BSA-Tween, содержащих известное количество дигоксина, или по 50 мкл того же буфера, содержащих 10 мкл 70%-ных этанольных экстрактов сухой ткани *D. lanata* (см. ниже). Туда же добавляли по 50 мкл антидигоксиновых антител, меченных пероксидазой, в PBS-BSA-Tween в разведении 1:1000. Смесь тщательно встряхивали, инкубировали 30 мин при  $37^\circ \text{C}$ , твердую фазу отмывали и вносили раствор субстрата (4 мкл 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 4 мкг орто-фенилендиамина на 10 мл 0,1 М цитрат-фосфатного буфера, рН 5,0), инкубировали 10 мин при  $20^\circ \text{C}$  в темноте, реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10% серной кислоты. Оптическое поглощение в лунках измеряли на приборе Titertek Multiskan (Flow, Великобритания) при 492 нм.

Подготовка образцов для ВЭЖХ-анализа. 100 мг сухой ткани *D. lanata* экстрагировали 3 мл 70% этанола 20 мин в ультразвуковой бане, затем прибавляли 1 мл 15% ацетата свинца, отфильтровывали, остаток промывали дважды 2 мл воды и 1 мл 10%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Фильтрат экстрагировали 3 мл хлороформа и дважды 2 мл смеси хлороформ — изопропанол (3:2) [5]. Упаренный досуха экстракт растворяли в 70% метаноле и анализировали методом ВЭЖХ.

Проведение ВЭЖХ-анализа. Разделение карденолидов и обработку данных осуществляли на хроматографической системе следующей комплектации: насосы 110 В (Beckman, США), градиентный смеситель (Beckman, США), инжектор Reodyne (США), детектор с фиксированной длиной волны  $\lambda$  226 нм Uvicord SII (ЛКВ, Швеция), аналоговый интерфейс 406 и система сбора и обработки данных System Gold (Beckman, США), предколонка Beckman Ultrasphere ODS (4,6×50 мм); колонка Nucleosil 5-C<sub>18</sub> (4,6×250 мм) (Macherey and Nagel, ФРГ), буфер А — 0,1% трифторуксусная кислота, буфер Б — 80% ацетонитрил в А. Разделение проводили в следующем градиенте — 5 мин при 5% Б, затем линейный градиент с 5 до 80% Б за 40 мин. Определение концентрации карденолидов (пики I, II, III рис. 1) в образце осуществляли с использованием молярных коэффициентов поглощения при 226 нм, полученных для соответствующих внешних стандартов.

Авторы выражают благодарность сотрудникам НПО ВИЛР Н. Т. Конон и М. В. Кирцовой за предоставленные образцы растительного сырья, а также лаборанту лаборатории биотехнологии ИБХ РАН А. А. Малышеву за помощь в проведении экспериментов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wichtl M., Mangkudidjojo M., Wichtl-Bleiner W.//J. Chromatogr. 1982. V. 234. No. 2. P. 503—509.
2. Stuhlfauth T., Klug K., Fock H. P.//Phytochemistry. 1987. V. 25. P. 2735—2741.
3. Wieler E. W., Zenk M. H.//Phytochemistry. 1976. V. 15. P. 1537—1545.
4. Vogel E., Luckner M.//Planta Med. 1981. V. 41. P. 161—165.
5. Yoshimatsu K., Satake M., Shimomura K., Sawada J., Terao T.//J. Natural Products. 1990. V. 53. № 6. P. 1498—1502.
6. Sedmak J. J., Grossberg S. E.// Anal. Biochem. 1977. V. 79. P. 544—552.
7. Данилова Н. П., Еременко С. Н., Язынин С. А., Васильев Р. Г.//Биотехнология (в печати).
8. Иммуноферментный анализ/Ред. Т. Т. Нго, Г. Ленхофф. М.: Мир, 1988.
9. Fritz T. J., Bunker D. M.//Clin. Chem. 1982. V. 28. P. 2325.

10. Smith T. W., Butler V. P., Haber E.//Biochemistry. 1970. V. 9. P. 331—337.
11. Lefkovits I., Waldmann S.//Limiting Dilution Analysis of Cell in the Immune System, Cambridge Univ. Press, London — New York, 1979.
12. Beatty J. D., Beatty G. B., Vlahos W. G.//J. Immunol. Meth. 1987. V. 100. № 1. P. 173—179.
13. Иммунологические методы//Ред. Г. Фримель. М.: Медицина, 1987. С. 438.

Поступила в редакцию  
26.II.1993

После доработки  
9.IV.1993

*S. N. Eremenko, I. E. Sukhov, A. I. Miroshnikov*

**DETERMINATION OF CARDENOLIDES IN *Digitalis lanata*  
BY SOLID-PHASE ENZYMOIMMUNOASSAY**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow*

A competitive solid-phase EIA technique using high-affinity digoxin-specific monoclonal antibodies has been developed to determine cardenolides in *Digitalis lanata*. The test-system can detect digoxin and closely related compounds in concentration of 0,1 nmol/ml. The content of cardenolides, tested by ELISA, correlated well with the total content of digoxin, deslanoside C and lanatoside C as analysed by HPLC. The test-system is useful in estimating the productivity of large series and samples of tissue clones of *Digitalis lanata*.