



УДК 576.8.094.7

АДСОРБЦИЯ НА СИНТЕТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ И ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА АПРОТИНИНА, КОНЪЮГИРОВАННОГО С ПОМОЩЬЮ ГЛУТАРОВОГО АЛЬДЕГИДА

© 1999 г. Т. А. Тимофеева, П. Б. Голяндю, О. П. Жирнов[#]

НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123098, Москва, Гамалеи, 16

Поступила в редакцию 22.07.98 г.

Принята к печати 30.11.98 г.

Предложена методика межмолекулярного конъюгирования молекул апротинина (природного полипептида – ингибитора сериновых протеиназ) с помощью глутарового альдегида. Аутоконъюгирование апротинина увеличивало его иммуногенность и усиливало эффективность сорбции на нитроцеллюлозной и поливинилдифторидной мембранах. Иммунизация животных аутоконъюгированным апротинином индуцировала выработку антител, реагирующих как с конъюгированным, так и мономерным апротинином. Обнаруженные свойства конъюгированного апротинина делают возможным его применение в методах иммуноферментного анализа и иммуноблота на мембранах для повышения чувствительности этих методов при работе с апротинином и антиапротининовыми антителами.

Ключевые слова: апротинин; конъюгирование; иммуногенность; сорбция на мембране; спот-иммуноанализ; твердофазный ИФА.

Апротинин – это низкомолекулярный полипептид (58 а. о.), относящийся к группе природных ингибиторов сериновых протеиназ и обладающий широким спектром действия: против трипсина, химотрипсина, каллекреина, плазмина, триптазы Клара и др. [1, 2]. Существует ряд коммерческих препаратов апротинина: Trasyloл (Bayer, Германия), Contrycal (Germed, Германия), Antagonan (Behring, Германия), Gordox (Гедеон Рихтер, Венгрия) и др., которые широко применяются в медицинской практике для лечения панкреатитов, кровотечений, шоковых состояний и т.п. [3]. Помимо этого предложено новое оригинальное применение апротинина – для ингаляционного лечения респираторных заболеваний различной этиологии [4, 5]. Однако, несмотря на широкое терапевтическое использование этого полипептида, его физиологическая роль в организме остается невыясненной. Для ее понимания необходимо изучение функций эндогенного апротинина в организме-хозяине, а также поведения экзогенного апротинина в организме-реципиенте при различных формах введения в организм.

Сокращения: PBS – 0.01 М фосфатный буфер (pH 7.4), содержащий 0.15 М NaCl; PBST – 0.05 М PBS, содержащий 0.1% Твин-20; BSA – бычий сывороточный альбумин; PBS/BSA – 0.01 М PBS, содержащий BSA (1 мг/мл); GA – глутаровый альдегид.

[#] Автор для переписки (e-mail: ZHIRNOV@invir.msk.su; тел.: (095) 190-30-58).

Исследование взаимодействия апротинина с другими белками организма, в частности с антителами и ферментами, с помощью обычно применяемых для таких целей методов (твердофазный ИФА, иммуноблот) затруднено. В силу невысокой молекулярной массы (6 кДа) этот белок обладает низкой способностью к сорбции в отношении нитроцеллюлозной (НЦ) и поливинилдифторидной (ПВДФ) мембран, используемых в аналитических методиках [2]. Кроме того, апротинин – полипептид, имеющий консервативную аминокислотную последовательность, сходную для животных различных видов. Эта особенность определяет его низкую иммуногенность при введении в гетерологичный организм и затрудняет получение антител к нему [1].

Мы предположили, что ковалентное сшивание молекул апротинина между собой с образованием высокомолекулярных комплексов усилит его сорбционные и иммуногенные свойства [2]. В качестве сшивающего агента был использован глутаровый альдегид (GA), при взаимодействии которого с полипептидами происходит ковалентное связывание преимущественно по ε-аминогруппам лизина и образуются устойчивые комплексы [6, 7].

К раствору апротинина в воде добавляли глутаровый альдегид. Через определенные промежутки времени отбирали реакционные пробы и останавливали реакцию конъюгирования, добавляя 10-кратный (относительно GA) избыток глицина.

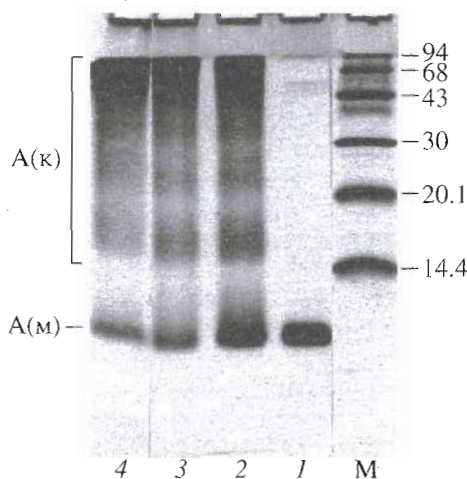


Рис. 1. Электрофоретический анализ мономерного аprotинина (1) и аprotинина, обработанного GA в течение 15 (2), 30 (3) и 60 мин (4). Дорожка М – маркерные полипептиды (сверху вниз): фосфорилаза b, BSA, овальбумин, карбоангидраза, ингибитор трипсина, лизоцим. А(м), А(к) – фракции мономерного и конъюгированного аprotинина соответственно.

Эффективность конъюгирования аprotинина оценивали по данным гель-электрофореза, демонстрирующего уменьшение содержания свободного аprotинина (M 6 кДа) в реакционной смеси и увеличение содержания высокомолекулярных аprotининовых комплексов с широким диапазоном молекулярных масс (от 12 до 400 кДа), часть из которых задерживалась на старте фокусирующего геля. Как видно на представленном рис. 1, около 50% молекул аprotинина сшивалось в комплексы уже за 15 мин инкубации. После 1-часовой инкубации отмечался переход основной части молекул мономерного аprotинина в высокомолекулярные комплексы. Именно этот препарат конъюгированного аprotинина использовался в дальнейших исследованиях.

В следующей серии опытов изучали связывание мономерного и конъюгированного аprotинина с нитроцеллюлозной и поливинилдифторидной мембранами. Сорбцию аprotинина, содержащегося в растворе в определенных концентрациях, проводили либо путем инкубации с мембраной, либо путем фильтрования через мембрану [8]. Количество сорбированного на мембране аprotинина оценивали визуально с помощью окрашивания белка раствором коллоидного серебра.

Как показали предварительные опыты, при фильтрации через мембрану сорбция аprotинина на мембране заметно не повышалась по сравнению с инкубацией в растворе. Однако в обоих случаях отмечалась заметная разница в сорбционной способности у мономерного и конъюгированного аprotинина. Как видно из рис. 2, визуально наблюдаемые окрашенные пятна на нитроцеллюлоз-

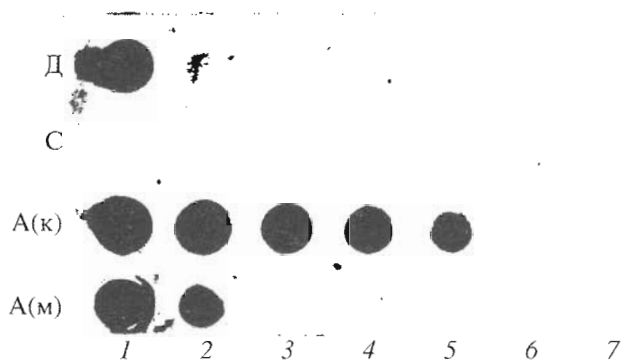


Рис. 2. Адсорбция разных форм аprotинина на нитроцеллюлозной мембране. По 100 мкл раствора, содержащего 1000, 500, 250, 125, 62, 31 и 15 мкг/мл (колонки 1–7 соответственно) мономерного (А(м)), конъюгированного (А(к)) аprotинина и смеси соответствующего по массе количества мономерного аprotинина с 2% глутаровым альдегидом, предварительно инактивированным глицином (Д), фильтровали через нитроцеллюлозную мембрану с последующим окрашиванием коллоидным серебром. Пробы 1(С) – 2(С) – контрольные образцы воды, а 3(С) – 4(С) – 2% глутаральдегида.

ной мембране обнаруживались при фильтрации раствора мономерного аprotинина с концентрацией равной или выше 500 мкг/мл, тогда как для конъюгированного аprotинина сорбция происходила при концентрации препарата равной или выше 60 мкг/мл. Усиление сорбции конъюгированного аprotинина не было обусловлено простым присутствием глутарового альдегида и глицина; на это указывает отсутствие усиления окрашивания в контрольной колонке, когда мономерный аprotинин инкубировали с глутаровым альдегидом, предварительно инактивированным глицином (пятна Д1 – Д7 на рис. 2). Такие же результаты более эффективной сорбции конъюгированного аprotинина получены и для поливинилдифторидной мембраны. Таким образом, ковалентное сшивание молекул аprotинина глутаровым альдегидом приводит к восьмикратному усилению его способности к сорбции на нитроцеллюлозной и поливинилдифторидной мембранах.

В следующей серии экспериментов изучали иммуногенные свойства мономерного и конъюгированного аprotининов методом ИФА на полистирольных планшетах. С этой целью на планшеты сорбировали эквивалентное по массе количество аprotинина обеих форм и далее планшеты инкубировали с сыворотками мышей, иммунизированных мономерным и конъюгированным аprotинином, в последовательных двукратных разведениях (в титрах от 1/100 до 1/3200). Как видно из рис. 3б, сыворотка, полученная к конъюгированному аprotинину хорошо реагировала как с мономерным (1), так и с конъюгированным (2) аprotинином. Реакция сыворотки с конъюги-

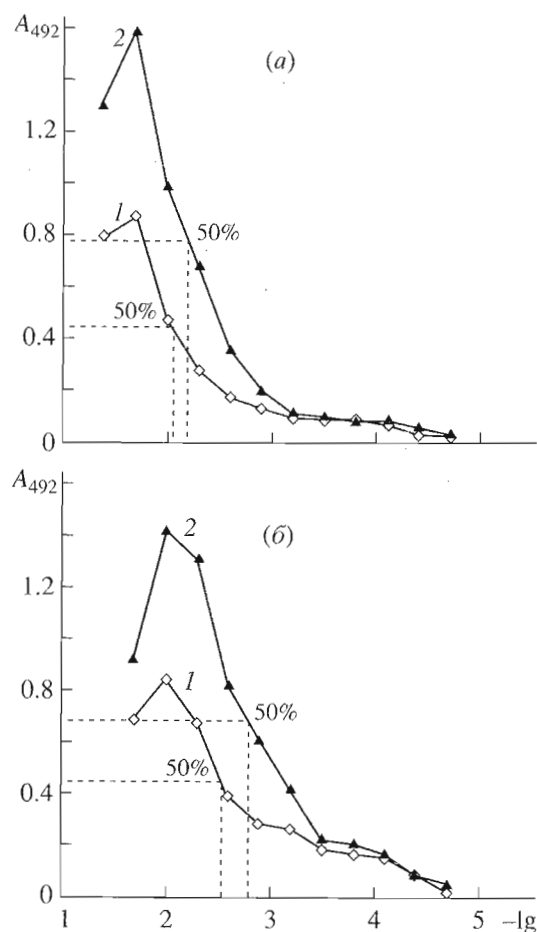


Рис. 3. Реактивность сывороток мышей, иммунизированных мономерным и конъюгированным апротинином, с мономерным и конъюгированным апротинином, определенная в методе ИФА. Мышей иммунизировали мономерным (а) или конъюгированным (б) апротинином. В сыворотке крови методом ИФА определяли уровень антител, способных связываться с мономерным (1) и конъюгированным (2) апротинином. По оси ординат отложена величина поглощения при 492 нм. По оси абсцисс – обратный десятичный логарифм кратности разведения исследуемой мышиной сыворотки.

рованным апротинином происходила при более высоких ее титрах, чем с мономерным апротинином. Так, для получения 50 % сигнала (на рис. 3 показано пунктиром) для мономерного апротинина требовалось разведение сыворотки 1/316, а для конъюгированного аналогичный 50 % сигнал выявлялся при разведении 1/769 [9].

У мышей, иммунизированных мономерным апротинином (рис. 3а), выявлялись антитела, которые также реагировали с мономерным и конъюгированным апротининами. Однако титры этих антител были более низкими, чем у мышей, иммунизированных конъюгированным апротинином. Такой результат объясняется более высокой иммуногенностью конъюгированного апротини-

на, и, как мы предполагаем, дополнительной выработкой у иммунизированных животных антител к “новым” эпитопам, появляющимся в апротинине в результате его конъюгирования и конформационного разворачивания молекулы. Таким образом, данные работы показали, что иммунизация конъюгированным апротинином более эффективна, чем мономерным, и вызывает выработку антител с более высоким титром, которые обладают высокой степенью взаимодействия с мономерным и конъюгированным апротинином. Результаты, полученные для нативного (немодифицированного) апротинина, хорошо согласуются с работами других авторов о его низкой иммуногенности [10, 11].

Чтобы подтвердить вывод о более высокой иммуногенности конъюгированного апротинина, в следующей части работы мы сравнивали связывание антител сыворотки морской свинки, иммунизированной конъюгированным апротинином, при взаимодействии с мономерным и конъюгированным апротинином. С этой целью на мембраны сорбировали эквивалентное по массе количество обеих форм апротинина путем инкубации с мембраной растворов нативного и конъюгированного апротинина с концентрацией 500 и 100 мкг/мл соответственно. Такие концентрации выбраны на основании результатов, представленных на рис. 2. Далее мембраны инкубировали с сывороткой с последовательными двукратными разведениями, чтобы оценить предельные детектируемые разведения для мономерного и конъюгированного апротинина. Как видно из рис. 4, сыворотка свинки реагировала с конъюгированным апротинином в разведении 1/2000 и ниже, тогда как с мономерным апротинином наблюдали слабо окрашенное пятно при разведении 1/500. Этот результат подтвердил вывод о том, что при иммунизации конъюгированным апротинином вырабатываются антитела у морских свинок к “новым” эпитопам, “молчащим” у мономерного апротинина.

Таким образом, полученные в работе данные показывают, что при инкубации с глутаровым альдегидом происходит эффективное ковалентное сшивание апротинина, заметно изменяющее его биохимические свойства. Во-первых, в результате конъюгирования существенно повышается иммуногенность апротинина. При этом важно подчеркнуть, что на введение конъюгированного апротинина вырабатывались антитела, реагирующие с мономерным (нативным) апротинином. Это наблюдение имеет прикладное значение, так как позволяет для получения высокотитражных сывороток к апротинину применять его агрегированную форму. Во-вторых, полимерный апротинин имеет значительно более высокую сорбционную способность, чем мономерный, что делает возможным применение его для усовершенствования и повышения чувствительности та-

ких методов иммуноанализа, как иммуноблот, спот-иммуноанализ, дот-иммуноанализ, твердофазный ИФА. Кроме того, такой конъюгированный аprotинин можно использовать в методе субстрат-ферментного (апротинин-протеиназного) комплексообразования на мембранах для оценки уровня протеиназной активности в физиологических жидкостях.

Важно подчеркнуть, что указанным методом возможно получение аprotинина с разной степенью конъюгирования. В частности, "мягкие" (олигомерные) конъюгаты, сохраняющие функциональную активность, образуются при снижении соотношения аprotинин/глутаральдегид при конъюгировании и уменьшении времени конъюгирования [12–14]. В качестве ориентира можно привести работу [12], в которой показано, что близкое к полному сохранение клеточных антигенов достигалось при фиксации клеток смесью параформальдегида (0.1–0.5%) и глутаральдегида (0.01–0.05%). Использование таких "мягких" конъюгатов аprotинина будет особенно важным в методах, изучающих субстрат-ферментное комплексообразование на мембранах и требующих сохранения ингибиторной функции аprotинина по отношению к протеиназам.

При ковалентном взаимодействии глутарового альдегида с полипептидами не происходит существенных конформационных модификаций и изменений третичной структуры, однако, заметные трансформации могут возникать в альфа-спиральных участках полипептидов [15, 16]. В молекуле аprotинина содержится четыре остатка лизина [1], что определяет его эффективное сшивание глутаральдегидом. Однако следует отметить, что один из остатков лизина (Lys15) находится в активном центре аprotинина и играет главную роль в связывании и инактивации протеиназы-мишени [1]. Поэтому можно ожидать, что глутаральдегид может существенно ослабить протеиназосвязывающую и протеиназоинактивирующую функцию аprotинина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали коммерческий препарат очищенного аprotинина (Contrycal/TM, Germed). В качестве маркерных полипептидов использовали набор фирмы Bio-Rad, содержащий: лизоцим (M 14.4 кДа), ингибитор трипсина (M 20.1 кДа), карбоновую ангидразу (M 30.0 кДа), овальбумин (M 43.0 кДа), BSA (M 68.0 кДа), фосфоорилазу В (M 94.0 кДа). Также в работе использовали конъюгат пероксидазы хрена с антителами, специфичными к иммуноглобулинам морской свинки (ДАКО, Дания).

Иммунизация животных. Животных (кролик ~950 г, морская свинка ~300 г, мыши 12–15 г) им-

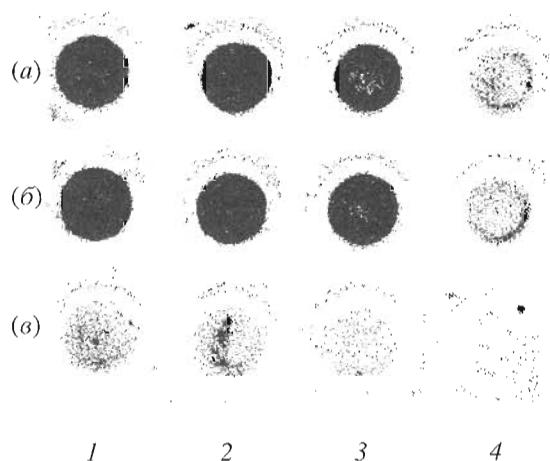


Рис. 4. Взаимодействие мономерного и конъюгированного аprotинина с сывороткой к конъюгированному аprotинину. Мономерный (50 мкг на пятно (в)), конъюгированный (1-часовая инкубация с ГА; 10 мкг на пятно (б)) и частично конъюгированный (20-минутная инкубация с ГА; 10 мкг на пятно (а)) аprotинин наносили на НЦ-мембрану и инкубировали с сывороткой в различных разведениях. Колонки 1, 2, 3, 4 соответствуют разведениям сыворотки 1/500, 1/1000, 1/2000 и 1/4000 соответственно.

мунизировали подкожно вдоль позвоночника трехкратно с двухнедельным интервалом. При каждой иммунизации вводили ~0.75 мл суспензии, приготовленной смешиванием 0.25 мл полного адьюванта Фрейнда и 0.5 мл раствора, содержащего мономерный или конъюгированный аprotинин в концентрации 5 мг/мл. На 4–6-е сутки после третьей иммунизации у животных брали кровь и получали сыворотку, которую тестировали методом ИФА на полистирольных планшетах по стандартной методике [17].

Электрофорез в 18% полиакриламидном геле проводили в 1мм пластине при соотношении акриламид/бисакриламид 30/1.0 в буферной системе Лэммли [18]. После электрофореза гель окрашивали Кумаси R-350 [19].

Конъюгация аprotинина. К водному раствору аprotинина (25–50 мг/мл) добавляли глутаровый альдегид (Sigma) до концентрации 1–2% и инкубировали при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, которые смешивали с равным объемом 15% раствора глицина и дополнительно инкубировали 30 мин для связывания избытка глутаральдегида и остановки конъюгации. Затем к раствору добавляли 1 М Трис-HCl (pH 8.0) до конечной концентрации 100 мМ. Молекулярные массы полученных образцов конъюгата аprotинина анализировали методом электрофореза, а затем изучали сорбционную способность этих образцов по отношению к синтетическим мембра-

нам методом окрашивания коллоидным серебром и способность связываться с антителами методом спот-иммуноанализа. Все дальнейшие опыты проводили с конъюгированным апроптенином, полученным в результате 1-часовой инкубации с глутаровым альдегидом (см. рис. 1)

Сорбция апроптенина на мембранах. Применяли нитроцеллюлозную (Millipore, 0.45 мкм) и поливинилдифторидную мембрану (Immobilon/TM, 0.45 мкм; Bio-Rad). Сорбцию апроптенина на мембранах проводили с помощью "spot"-аппарата фирмы Schleicher & Schuell (модификация Minifold) посредством фильтрации раствора апроптенина через мембрану в течение 5 мин при остаточном давлении, либо 60-минутной инкубацией мембраны с нанесенным раствором апроптенина. Ячейки над жестко фиксированной в аппарате мембраной имели диаметр 5 мм. В каждую из них вносили по 100 мкл растворов, содержащих и не содержащих апроптенин. После сорбции мембрану извлекали из аппарата, трижды промывали 10 мл PBS и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Затем мембрану подвергали либо окрашиванию коллоидным серебром, либо инкубировали с антителами с последующей регистрацией сорбированных антител, так называемый "spot-assay" [20].

Окраска мембран коллоидным серебром. Кусочки мембраны с адсорбированным апроптенином окрашивали свежеприготовленным раствором коллоидного серебра, как описано ранее [21]. Коллоидное серебро (взвесь 10–30 нм частиц атомарного серебра) получали смешиванием водных растворов 40% цитрата натрия, 30% сульфата двухвалентного железа и 10% нитрата серебра в соотношении 1.4 : 1 : 1 по объему. Водный раствор коллоидного серебра смешивали с эквивалентным объемом 10 мМ цитратного буфера (рН 3.0) и 0.1% Твин-20 и инкубировали с мембраной 45 мин при комнатной температуре. Окрашенные мембраны трижды отмывали от несвязавшегося серебра 10 мл деионизированной воды. В случае положительной реакции фильтр окрашивался в темно-коричневый цвет, а в случаях отсутствия сорбции полипептидов – окраска фильтра была желтой.

Спот-иммуноанализ ("spot-assay"). Мембраны с сорбированным апроптенином инкубировали в течение 1 ч в 0.01 М PBS/BSA для блокирования свободных участков. Затем добавляли сыворотку морской свинки, содержащую антиапроптениновые антитела (первичные антитела) в соответствующих двукратных разведениях, и инкубировали в течение ночи при +4°C. Далее мембраны трижды промывали 10 мл 0.01 М PBS и инкубировали 1 ч при 37°C с конъюгатом пероксидазы хрена с антителами, специфичными к иммуноглобулинам морской свинки (ДАКО, Дания) – вторич-

ные антитела. После многократной промывки мембран в 10 мл 0.01 М PBS образовавшиеся иммунные комплексы окрашивали 0.03% 4-хлор-1-нафтолом по стандартной методике [20]. В случае положительного результата наблюдали голубое пятно, в случаях отрицательного результата мембраны оставались неокрашенными. Каждое определение проводили трижды.

Иммуноферментный анализ сывороток проводили на полистирольных 96-луночных планшетах (Costar) по стандартной методике [17]. Нативный и конъюгированный апроптенин наносили в PBS по 100 мкл в концентрациях 500 и 100 мкг/мл соответственно в каждую лунку и инкубировали ночь при температуре 4°C. Далее планшеты трижды промывали раствором 0.05 М PBST. Затем вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора 1% BSA и инкубировали 1 ч при температуре 37°C, блокируя свободные участки. После этого в лунку вносили по 100 мкл сыворотки мышей в последовательных (от 1/100 до 1/2000) двукратных разведениях и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Планшеты трижды промывали PBST, добавляли конъюгат (антимышиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена), и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшеты трижды промывали PBST, добавляли по 100 мкл в каждую лунку 0.05% раствора орто-фенилдиамина в фосфат-цитратном буфере (рН 5.0), содержащем 0.03% перекиси водорода и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 20 мин. Реакцию ингибировали добавлением 50 мкл 4 М серной кислоты. Каждое определение проводили трижды. Оптическое поглощение измеряли при 492 нм на приборе "Diagnostics Pasteur".

Работа выполнена при финансовой поддержке по грантам РФФИ № 97-04-48741, № 98-04-48901, РФФИ/НИИО № 96-04-00124, (SFB 286), гранта № 75195-546302 Института Ховарда Хьюза (США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fritz H., Wunderer G. // *Arzneim.-Forsch. Drug Res.* 1983. V.33 (1). P. 479–494.
2. Kido H., Yokogoshi Y., Sakai K., Tashiro M., Kishino Y., Fukotomi A., Katunuma N. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 13573–13579.
3. Николаева Н.Б., Альперович Б.Р., Созинов В.Н. и др. // *Лекарственные препараты зарубежных фирм в России.* М.: Наука, 1993. С. 174.
4. Zhirnov O.P., Ovcharenko A.V., Kirzhner L.S., Malishev N.A. // *Antiinfective Drugs and Chemotherapy.* 1996. V. 14. P. 209–216.
5. Журнов О.П., Куржнер Л.С., Овчаренко А.В., Мальшев Н.А. // *Вест. РАМН.* 1996. № 5. С. 38–45.
6. Korn A.H., Fearheller S.H., Filachione E.M. // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 65. P. 525–537.
7. Blaas J., Verriest C., Lean A., Weiss M. // *J. Am. Leather Chemists Assoc.* 1976. V. 71. P. 121–134.

8. Harlow E., Lane D. Immunoblotting: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988. P. 500–506.
9. Clark M.F., Bar-Joseph M. // Methods in Virology / Eds K. Maromroschi, H. Koprovski. Orlando; San Diego; New York; London; Toronto; Monreal; Sydney; Tokyo: Acad. Press, 1984. V. 7. P. 57–67.
10. Haberland G.L. // Synthetic and Natural Proteinase Inhibitors: Basic and Clinical Aspects / Internet. Symp. Tokyo 1967. Nov. 20th. Tokyo: Jap. Soc. of Medical Sciences, 1967. P. 47–55.
11. Shikimi T., Kobayashi T. // J. Pharm. Dynamic. 1980. V. 3. P. 400–406.
12. Van Ewijk W., van Soest P.L., Verker K.A., Jongkind J.F. // Histochemical J. 1984. V. 16. P. 179–193.
13. Borges M. // Electron. Microscopy. 1980. V. 2. P. 280–283.
14. Berod A., Hartman B.K., Pujol J.F. // J. Histochem. Cytochem. 1981. V. 29. P. 844–850.
15. Barrnett R.J., Perney D.P., Hagotromm E. // J. Histochem. Cytochem. 1964. V. 12. P. 36–42.
16. Sabatini D.D., Miller F., Barrnett R.J. // J. Histochem. Cytochem. 1964. V. 12. P. 57–68.
17. Clark M.F., Bar-Joseph M. // Methods in Virology / Eds K. Maromroschi, H. Koprovski. Orlando; San Diego; New York; London; Toronto; Monreal; Sydney; Tokyo: Acad. Press, 1984. V. 7. P. 70–75.
18. Laemmli U.K. // Nature (London). 1970. V. 227. P. 680–685.
19. Zhirnov O.P. // Virology. 1990. V. 176. P. 274–279
20. Harlow E., Lane D. Immunoblotting: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988. P. 506–510.
21. Moeremans M., Daneels G., De Mey J. // Anal. Biochemistry. 1985. V. 145. P. 315–321.

Sorption on Synthetic Membranes and Immunogenic Properties of Aprotinin Intermolecularly Crosslinked by Glutaraldehyde

T. A. Timofeeva, P. B. Golyando, and O. P. Zhirnov[#]

*Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Gamalei 16, Moscow, 123098 Russia*

A procedure for the intermolecular crosslinking of aprotinin (natural polypeptide, an inhibitor of serine proteases) by glutaraldehyde was proposed. This autoconjugation of aprotinin increased its immunogenicity and the efficiency of sorption on nitrocellulose and polyvinylidene difluoride membranes. The immunization of animals by the autoconjugated aprotinin induced the production of antibodies that reacted with both conjugated and monomeric aprotinin. The properties of the crosslinked aprotinin are promising for the enhancement of sensitivity through its use in EIA and immunoblotting membrane methods that employ aprotinin and anti-aprotinin antibodies.

Key words: aprotinin, autoconjugation, ELISA, immunogenicity, intermolecular crosslinking, sorption on membranes, spot-immunoassay

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 190-3058; e-mail: zhirnov@invir.msk.su.