



УДК 577.112.389.083.3

## СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ $\text{Ca}^{2+}$ -РЕГУЛИРУЕМОГО ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА С ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ МЕТОК В ИММУНОАНАЛИЗЕ

© 2004 г. Л. А. Франк\*\*, А. И. Петунин\*\*, Е. С. Высоцкий\*

\*Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок;

\*\*МПФ "ДИАС", Красноярск, Академгородок

Поступила в редакцию 23.04.2003 г. Принята к печати 08.05.2003 г.

Разработан эффективный способ синтеза конъюгатов обелина с иммуноглобулинами. Как альтернатива радиоизотопной метке показана возможность использования полученных конъюгатов для иммуноанализа тиреотропного гормона в сыворотках с чувствительностью 0.01 мкМЕ/мл. Результаты биoluminesцентного анализа сыворотки (34 пациента) хорошо коррелируют с результатами радиоизотопного анализа ( $R$  0.99).

*Ключевые слова:* биoluminesцентный иммуноанализ; обелин; тиреотропный гормон.

### ВВЕДЕНИЕ

Обелин –  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый фотопротейн, выделенный из гидроидного полипа *Obelia longisima* [1], представляет собой устойчивый фермент-субстратный комплекс, состоящий из белковой части – апопротеина (одноцепочечный полипептид, 22.2 кДа) и пероксицелентеразина [2, 3]. В присутствии ионов кальция практически мгновенно развивается реакция внутримолекулярного окислительного декарбокислирования целентеразина, продуктами которой являются молекула целентерамида,  $\text{CO}_2$  и квант света в видимой области ( $\lambda_{\text{max}}$  485 нм). В 1995 г. нами был клонирован ген апообелина [4], получен штамм-суперпродуцент этого белка и разработана эффективная технология его выделения [5, 6], позволяющая получать 30–35 мг высокоочищенного апообелина из 1 г сырой клеточной массы. Апобелок эффективно активируется синтетическим целентеразином в присутствии восстанавливающих реагентов – дитиотреита или меркаптоэтанола и кислорода. Полученный рекомбинантный обелин (Obе) по своим физико-химическим свойствам практически не отличается от природного белка. Высокий квантовый выход биoluminesцентной реакции позволяет определять до  $10^{-17}$ – $10^{-18}$  моль обелина. Доступность белка, высокая чувствительность его определения, стабильность,

простота запуска биoluminesцентной реакции обелина обуславливают перспективность его использования в качестве метки в различных аналитических тест-системах и, в частности, в иммуноанализе [7–9].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель данной работы – создание простого метода синтеза конъюгатов обелина с иммуноглобулинами и демонстрация возможности использования полученных меток для анализа тиреостимулирующего гормона (ТТГ) в сыворотках как альтернативы радиоизотопной метке.

В арсенале современной химии имеется широкий выбор конденсирующих агентов, позволяющих проводить конъюгирование белков, пользуясь доступными для модификации функциональными группами на поверхности белка. Задачей исследователя является подбор условий: выбор реагента, буферной системы, соотношения реагент–белок, температуры и времени проведения реакции с целью максимального сохранения активности белка, с одной стороны, и достижения эффективности конъюгирования, с другой. К сожалению, в каждом отдельном случае такой подбор условий проводится эмпирически.

Получение конъюгатов обелина с иммуноглобулинами осуществляли по схеме, показанной на рис. 1. Несмотря на то что молекула обелина содержит в своем составе пять остатков цистеина [4], попытки синтеза конъюгатов обелина с иммуноглобулинами через его SH-группы не увенчались успехом – выход целевых конъюгатов был низким (0.5–5%) [10]. Очевидно, это связано с малой до-

Сокращения: BLIA – биoluminesцентный иммуноанализ; DTNB – 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота); Obе – обелин; RIgG – кроличьи иммуноглобулины; SMCC – сукцинимидный эфир 4-(*N*-малеидометил)циклогексановой кислоты; ТТГ – тиреотропный гормон, тиреотропин.

# Автор для переписки (тел.: (3912) 49-44-30; факс: (3912) 43-34-00; эл. почта: lfrank@yandex.ru).

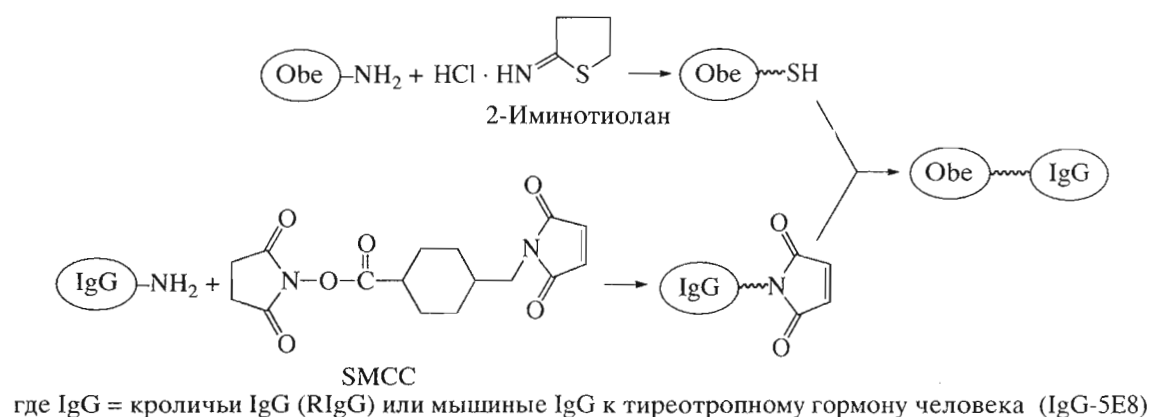


Рис. 1. Схема синтеза конъюгатов обелина с иммуноглобулинами.

ступностью природных остатков цистеина в молекуле белка. Ранее нами был разработан эффективный метод получения конъюгатов обелина с биотином реакцией сукцинимидного эфира биотина с аминогруппами на поверхности белка [8, 9]. Было продемонстрировано, что обработка 10-кратным избытком реагента в течение 30 мин при комнатной температуре обеспечивает привязку 1–2 молекул биотина на молекулу белка и сохраняет 70% его первоначальной активности. Для введения дополнительных SH-групп мы использовали реагент Траута – 2-иминотиолан [11], реакция которого также протекает по доступным аминогруппам. С целью выбора оптимальных условий модификации белка были проведены эксперименты с различным соотношением белок–реагент и временем реакции. Показано, что при использовании 20-кратного избытка реагента при комнатной температуре в течение 30 мин с одной молекулой белка связываются 1–2 дополнительные тиогруппы и сохраняется 70–80% исходной биолюминесцентной активности. Таким образом, можно с большой долей вероятности утверждать, что молекула обелина содержит несколько аминогрупп, любая модификация которых будет эффективной и существенным образом не повлияет на его функциональную активность.

Полученный обелин с активированным (тионилированным) спейсером пригоден для конъюгирования с малеимидактивированными антителами [12].

Иммуноглобулины кролика (RIgG) модифицировали бифункциональным сшивающим реагентом SMCC и показали, что в присутствии 10-, 50- и 100-кратного избытка реагента в молекулу иммуноглобулина вводится 2, 7 и 12 малеимидных групп соответственно. Для модификации мышьиных анти-ТТГ-иммуноглобулинов был взят 50-кратный избыток реагента. При конъюгировании малеимидактивированных анти-ТТГ-иммуноглобулинов с тионилированным обелином последний

использовали в 10-кратном молярном избытке. Конъюгаты очищали гель-фильтрацией, при этом высокомолекулярная фракция обладала 60–65% от первоначальной биолюминесцентной активности обелина. Это означает, что практически все малеимидные остатки на иммуноглобулинах были экпипированы молекулами обелина. Полученные конъюгаты стабильны при хранении в растворе при 4°C в течение как минимум шести месяцев – потеря биолюминесцентной активности за этот период не превысила 10%. Конъюгаты стабильны при лиофилизации – после растворения высушенных белков потерь иммуноглобулиновой и фотопротеиновой активности не наблюдалось (см. ниже рис. 3).

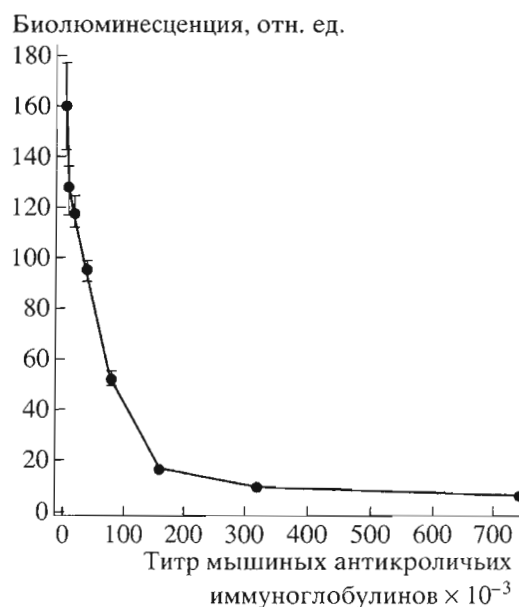
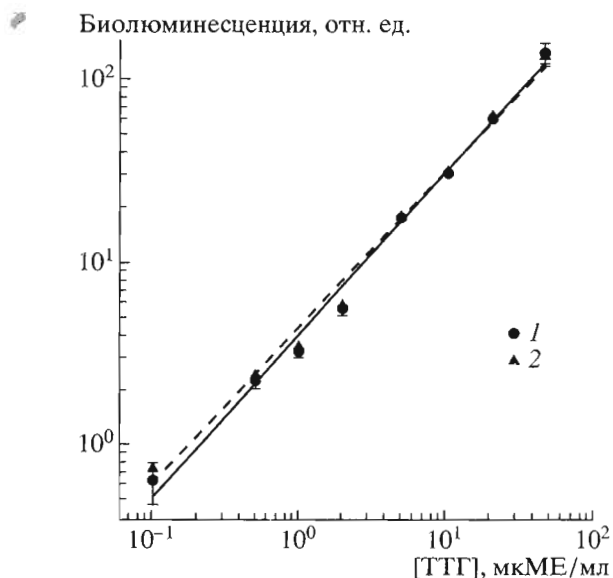


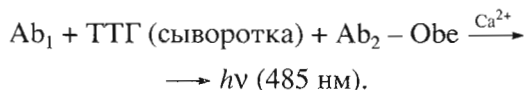
Рис. 2. Твердофазный биолюминесцентный иммуонализ антикроличьих иммуноглобулинов мышьи. Каждая точка представляет среднее от двух независимых определений.



**Рис. 3.** Твердофазный биолюминесцентный сэндвич-иммуноанализ ТТГ в стандартных сыворотках с использованием конъюгатов Obe-IgG-5E8 до (1) и после лиофильной сушки (2). Каждая точка представляет среднее значение от восьми независимых определений.

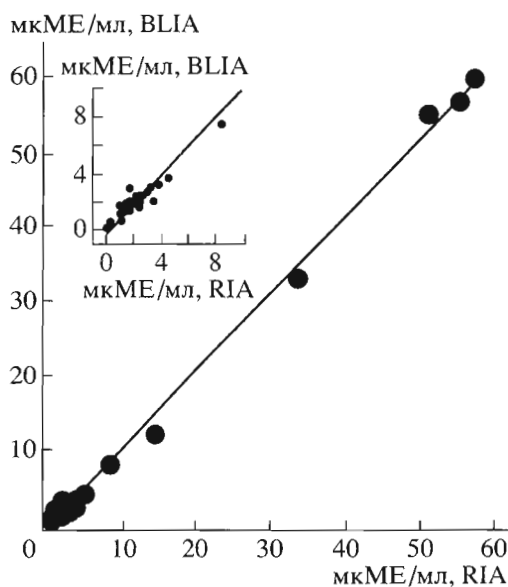
Конъюгат Obe-RIgG использовали для твердофазного анализа анти-RIgG в асцитной жидкости мышей (рис. 2). Из рисунка видно, что синтезированная нами метка позволяет обнаруживать анти-RIgG, сорбированные из растворов с разведением 1 : 740000.

Определение содержания ТТГ в сыворотках проводили в одну стадию с помощью сэндвич-иммуноанализа по схеме:



Были использованы два антитела на различные детерминанты молекулы ТТГ, одно из которых  $\text{Ab}_1$  (клон 10С7) было сорбировано на поверхности лунок, а другое  $\text{Ab}_2$  (клон 5Е8) помечено обелином. Биолюминесцентный сигнал комплекса, сформированного на поверхности, определяли сразу после добавления в лунку раствора  $\text{CaCl}_2$ . Зависимость биолюминесценции от концентрации ТТГ в стандартных сыворотках приведена на рис. 3. Полученную кривую использовали для определения содержания этого гормона в контрольных сыворотках (Immunotech, lot С104) и в сыворотках пациентов.

Для контрольных сывороток были получены следующие результаты: контроль № 1 –  $1.64 \pm 0.1$  мкМЕ/мл (1.41–2.11 мкМЕ/мл, Immunotech); контроль № 2 –  $14.16 \pm 0.715$  мкМЕ/мл (11.3–16.9 мкМЕ/мл, Immunotech). Приведенные результаты представляют собой среднее от шести



**Рис. 4.** Корреляционная кривая между результатами анализа ТТГ радиоиммунным (RIA) и биолюминесцентным методом (BLIA) в сыворотках пациентов ( $n$  34). На врезке – корреляция для образцов с низким содержанием гормона.

независимых измерений  $\pm$  SE. Таким образом, содержание ТТГ в контрольных сыворотках, определенное с помощью биолюминесцентной метки, хорошо согласуется со значениями, указанными фирмой-изготовителем.

Чувствительность проведенного анализа, рассчитанная по усредненному биолюминесцентному сигналу (восемь независимых определений), полученному для стандартной нулевой сыворотки + 2SD, составила 0.0097 мкМЕ/мл. Отметим, что чувствительность определения ТТГ радиоизотопной меткой для наборов фирмы Immunotech – 0.02 мкМЕ/мл ([www.immunotech.cz](http://www.immunotech.cz)). Таким образом, в данном анализе чувствительность биолюминесцентной метки не уступает радиоизотопной.

Особый интерес представляют измерения содержания ТТГ с помощью биолюминесцентной метки в сыворотках пациентов. Полученные средние от двух измерений значения содержания ТТГ сравнивали с таковыми, определенными с помощью RIA-gnost hTSH kit (CIS bio International, Франция) в лабораторно-диагностическом отделении эндокринологического центра Красноярской краевой больницы. На рис. 4 показана корреляционная кривая, полученная при исследовании 34 сывороток. Коэффициент корреляции между значениями, полученными радиоиммуноанализом и биолюминесцентным иммуноанализом, составил 0.997. Таким образом, полученные нами результаты показывают возможность замены изотопной метки на безопасную биолюминесцентную без потери качества анализа.

Следует отметить, что успешное использование биолюминесцентной метки в иммуноанализе продемонстрировано на примере и другого кальцийрегулируемого фотопротеина – акворина из гидромедузы *Aequorea victoria* [13–15].

Разработанный нами метод получения конъюгатов фотопротеина обелина с иммуноглобулинами, в принципе, позволяет синтезировать любые другие метки для анализа соответствующих антител. Фотопротеиновые метки обладают высокой чувствительностью, сравнимой с радиоизотопной, будучи при этом устойчивыми и безопасными. Простота запуска реакции, высокая скорость фотопротеиновой реакции и отсутствие инкубационного периода существенно укорачивают время анализа, что является преимуществом по сравнению с любыми ферментативными метками – независимо от типа используемых субстратов (хромофорного, флюоресцентного, хемиллюминесцентного), особенно при проведении большого массива измерений.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали высокоочищенный рекомбинантный обелин, полученный по методу, описанному в работе [5].

Моноклональные мышинные IgG к тиреотропному гормону человека (клоны 10С7 и 5Е8) были получены от фирмы ООО “Полигност” (С.-Петербург); контрольные образцы сывороток – от фирмы Immupotech (Чехия). Сыворотки с известным содержанием активного ТТГ (стандартные сыворотки ТТГ) были приготовлены и калиброваны в соответствии с Международным стандартом IRP80/558WHO. В работе использовали иммуноглобулины кролика к RIgG (асцитная жидкость), 2-иминотиолан · HCl, SMCC, 2-меркаптоэтиламин (Sigma, США) и DTNB (Serva, Германия).

Для твердофазного иммуноанализа использовали непрозрачные 96-луночные планшеты (Costar, США). Люминесцентный сигнал измеряли с помощью планшетного люминометра Luminoscan V1.30 (Финляндия).

**Модификация NH<sub>2</sub>-групп обелина 2-иминотиолом.** Тионирование обелина проводили в буфере, содержащем 0.25 М NaCl, 5 мМ EDTA, 50 мМ BICINE (*N,N*-бис(гидроксиэтил)глицин) pH 8.5, используя 20-кратный молярный избыток 2-иминотиола (свежеприготовленный раствор в том же буфере), в течение 30 мин при комнатной температуре. Избыток реагента отделяли гель-фильтрацией на колонке, уравновешенной раствором, содержащим 0.25 М NaCl, 5 мМ EDTA, 20 мМ PIPES (пиперазин-*N,N'*-бис(2-этансульфоуксусной кислоты)), pH 7.5 (буфер А).

**Число дополнительных SH-групп в молекуле обелина** определяли с помощью DTNB [16], используя в качестве контроля немодифицированный обелин.

**SMCC-активация иммуноглобулинов.** RIgG модифицировали в буфере А 10-, 50- и 100-кратным молярным избытком SMCC (свежеприготовленный раствор в DMF, предварительно очищенный от примеси формамида) в течение 1.5–2 ч при комнатной температуре. Избыток SMCC отделяли гель-фильтрацией на колонке, уравновешенной буфером А. Мышинные анти-ТТГ-иммуноглобулины (клон 5Е8) модифицировали аналогично, используя 50-кратный молярный избыток реагента.

**Число малеимидных групп, введенных в молекулу иммуноглобулина,** определяли обратным титрованием 2-меркаптоэтиламина DTNB как описано в работе [12].

**Конъюгаты обелина с иммуноглобулинами** получали инкубацией SMCC-активированных IgG с тионированным обелином в молярном соотношении 1 : 10 при комнатной температуре в течение 2 ч или при 4°C в течение ночи. Полученные конъюгаты выделяли гель-фильтрацией на колонке Superose 12 (хроматографическая установка FPLC, Pharmacia), уравновешенной 0.1 М NaCl, 5 мМ EDTA, 20 мМ Трис-HCl, pH 7.0.

**Биолюминесцентный иммуноанализ.** А). В лунки планшета вносили по 100 мкл асцитных растворов мышинных иммуноглобулинов на антитела кролика с разведением в 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 и 740 тысяч раз в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0, содержащем 0.15 М NaCl (PBS) и выдерживали в течение ночи при 4°C. После промывки (трижды, PBS, 0.1% Твин-20, 5 мМ EDTA) свободную поверхность блокировали (1% раствор BSA в PBS, 37°C, 1 ч). После промывки в лунки вносили по 100 мкл раствора конъюгата обелин-RIgG (1 мкг/мл), инкубировали при комнатной температуре 1 ч. Затем содержимое лунок отбрасывали, лунки промывали. Биолюминесцентный сигнал обелина измеряли сразу после впрыскивания 100 мкл 0.1 М раствора CaCl<sub>2</sub> в 0.1 М Трис-HCl pH 8.8. Время измерения сигнала от одной лунки 5 с.

Б). В лунки планшета вносили по 150 мкл раствора мышинных анти-ТТГ-иммуноглобулинов (клон 10С7, 10 мкг/мл). Сорбцию, промывки и блокировку свободной поверхности лунок проводили как описано в пункте А. После отмывки лунок в них вносили по 50 мкл сыворотки (стандартной, контрольной или пациентов) и 50 мкл раствора конъюгата обелин-IgG-5Е8 (1 мкг/мл, PBS, 0.25% BSA, 5 мМ EDTA). Смесь инкубировали при встряхивании (18°C, 400 об/мин, Thermomixer Comfort, Eppendorf, Германия) в течение 45 мин. Затем содержимое лунок отбрасывали, лунки промывали и измеряли биолюминесценцию обелина как описано выше.

Авторы выражают благодарность работникам лабораторно-диагностического отделения эндокринологического центра Красноярской краевой больницы за предоставленные образцы сывороток пациентов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Высоцкий Е.С., Бондарь В.С., Летунов В.Н.* // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 965–973.
2. *Liu Z.-J., Vysotski E.S., Chen C.J., Rose J.P., Lee J., Wang B.C.* // Protein Sci. 2000. V. 9. P. 2085–2093.
3. *Vysotski E.S., Liu Z.-J., Deng L., Rose J., Wang B.C., Lee J.* // Bioluminescence and Chemiluminescence 2000 / Eds J.F. Case, P.J. Herring, B.H. Robinson, S.H.D. Haddock, L.J. Kricka, P.E. Stanley. Singapore–New Jersey–London–Hong Kong: World Scientific, 2001. P. 135–138.
4. *Illarionov B.A., Bondar V.S., Illarionova V.A., Vysotski E.S.* // Gene. 1995. V. 153. P. 273–274.
5. *Illarionov B.A., Frank L.A., Illarionova V.A., Bondar V.S., Vysotski E.S., Blinks J.R.* // Methods in Enzymology. 2000. V. 305. P. 223–249.
6. *Markova S.V., Vysotski E.S., Lee J.* // Bioluminescence and Chemiluminescence 2000 / Eds J.F. Case, P.J. Herring, B.H. Robinson, S.H.D. Haddock, L.J. Kricka, P.E. Stanley. Singapore: World Scientific, 2001. P. 115–118.
7. *Frank L.A., Illarionova V.A., Vysotski E.S.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 219. P. 475–479.
8. *Frank L.A., Vysotski E.S.* // Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons / Eds J.W. Hastings, L.J. Kricka, P.E. Stanley. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. P. 435–438.
9. *Франк Л.А., Высоцкий Е.С., Петунин А.И., Навдаев А.В.* // Иммунология. 1997. № 1. С. 59–61.
10. *Франк Л.А.* Рекомбинантный фотопротейн обелин гидроидного полипа *Obelia longissima*: выделение и использование в иммуноферментном анализе. Дис. ... канд. биол. наук. Красноярск: Институт биофизики СО РАН, 1997. С. 53–61.
11. *Traut R.R., Bollen A., Sun T.-T., Hershey J.W.B., Sundberg J., Pierce L.R.* // Biochemistry. 1973. V. 12. P. 3266–3273.
12. *Bieniarz C., Husain M., Barnes G., King C.A., Welch J.* // Bioconjugate Chem. 1996. V. 7. P. 88–95.
13. *Stults N.L., Stocks N.F., Rivera H., Gray J., McCann R.O., O'Kane D., Cummings R.D., Cormier M.J., Smith D.F.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 1433–1442.
14. *Jackson R.J., Fujihashi K., Kiyono H., McGhee J.R.* // J. Immunol. Methods. 1996. V. 190. P. 189–195.
15. *Mirasoli M., Deo S.K., Lewis J.C., Roda A., Daunert S.* // Anal. Biochem. 2002. V. 306. P. 204–211.
16. *Торчинский Ю.М.* Сера в белках. М.: Наука, 1977.

## Conjugates of the Ca<sup>2+</sup>-Regulated Photoprotein Obelin with Immunoglobulins: Synthesis and Use as Labels in Bioluminescent Immunoassay

L. A. Frank\*\*, A. I. Petunin\*\*, and E. S. Vysotski\*

#Phone: +7 (3912) 49-4430; fax: +7 (3912) 43-3400; e-mail: lfrank@yandex.ru

\*Institute of Biophysics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,  
Krasnoyarsk, 660036 Russia

\*\*MPF DIAS Ltd., Krasnoyarsk, 660036 Russia

An efficient procedure for obelin conjugation with immunoglobulins was developed. The possibility was shown of using the resulting conjugates instead of a radioisotope label for the immunoassay of thyroid stimulating hormone in sera; the conjugates provide a sensitivity of 0.01  $\mu$ IU/ml. The results of bioluminescent immunoassay (sera of 34 patients) satisfactorily correlate with the results of radioisotope assay ( $R$  0.99). The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* bioluminescent immunoassay, obelin, thyroid stimulating hormone