



УДК 577.152.32*123:577.175.722.083.3

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТА ИНСУЛИНА С β -ГАЛАКТОЗИДАЗОЙ ИЗ *E. COLI* ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

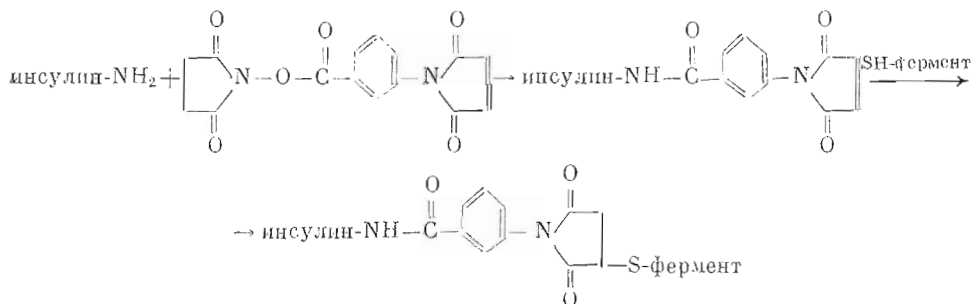
Маркрян А. Н., Чередникова Т. В., Дзантиев В. В.

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Разработана модифицированная методика получения конъюгата свиного инсулина с β -галактозидазой из *E. coli* с помощью гетеробифункционального реагента N-гидроксисукцинимидного эфира *m*-малеимидобензойной кислоты. Подобраны оптимальные условия ацилирования инсулина и последующей его конденсации с β -галактозидазой, позволяющие получать конъюгат с высоким выходом. Способность модифицированного антигена взаимодействовать с антителами контролировали в реакции связывания конъюгата с иммобилизованными моноклональными антителами к инсулину. Установлено, что конъюгат почти полностью сохраняет ферментативную активность и специфически связывается с антителами к гормону. Показана возможность использования конъюгата в конкурентном варианте иммуноферментного анализа инсулина.

β -Галактозидаза (β -D-галактозид-галактогидролаза, КФ 3.2.1.23) является одним из ферментов, широко используемых в иммуноферментном анализе для метки антигенов, антител и их фрагментов [1]. В последние годы заметно расширился круг химических соединений, используемых для синтеза галактозидазных конъюгатов. Особый интерес среди них представляют гетеробифункциональные сшивающие реагенты [4–4], позволяющие получать конъюгаты в строго контролируемых условиях реакции, без побочной полимеризации исходных компонентов и с высоким выходом. В литературе описано использование N-гидроксисукцинимидного эфира *m*-малеимидобензойной кислоты (MBS) для синтеза конъюгата β -галактозидазы с инсулином [2], однако методические подробности, необходимые для воспроизведения реакции, опубликованы не были.

В настоящей работе нами предлагается модифицированная методика синтеза конъюгата β -галактозидазы и инсулина, основанная на использовании MBS. Конденсация протекает по двухстадийной схеме:



Для подбора оптимальных условий ацилирования инсулина с помощью MBS вначале провели серию модельных экспериментов, используя в качестве ацилируемого объекта лейцина. Реакцию проводили в Na-фосфатном буфере, pH 7,0, степень ацилирования аминокислоты при различных стехиометрических соотношениях лейцина и MBS контролировали аминокислотным анализом и дансильрованием [5]. Показано, что при соотношении MBS — лейцин 2 : 1 и выше ацилирование проходит полностью.

Далее исследовали реакцию ацилирования инсулина с помощью MBS в тех же условиях. Эффективность ацилирования определяли с помощью

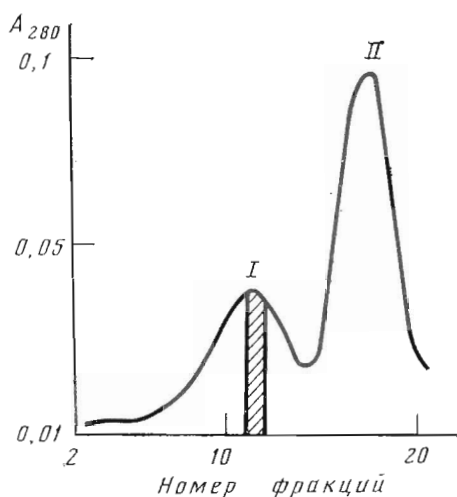


Рис. 1

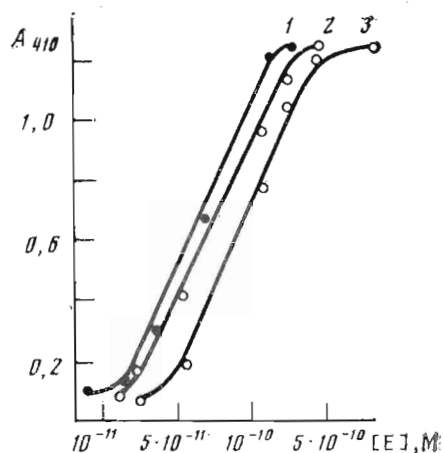


Рис. 2

Рис. 1. Хроматографическое разделение реакционной смеси, содержащей конъюгат инсулина с β -галактозидазой, на колонке с сефарозой 6В. Пик I — конъюгат, пик II — непрореагировавший MBS-инсулин. Заштрихованы отбираемые фракции конъюгата с максимальной ферментативной активностью

Рис. 2. Гидролиз *o*-нитрофенил- β -галактопиранозиды нативной β -галактозидазой (1), свежеприготовленным конъюгатом (2) и конъюгатом спустя 6 мес после его получения (3). По оси ординат отложено поглощение продукта гидролиза

реактива Элмана по уменьшению количества β -меркаптоэтанола или дитиотреита, прореагировавшего с MBS-инсулином, по методике [6]. Ацилирование инсулина проводили при стехиометрических соотношениях MBS — инсулин 1,5 : 1, 3 : 1 и 6 : 1, при этом увеличение содержания MBS в 4 раза приводило к возрастанию количества модифицированных молекул инсулина от 4 до 40%. Дальнейшее увеличение содержания MBS в реакционной смеси затруднительно из-за ухудшения его растворимости при высоких концентрациях. В работе [2] степень ацилирования инсулина с помощью MBS достигает 15%, однако воспроизвести эти данные нам не удалось. Нами установлено, что предлагаемое авторами работы [2] осаждение инсулина из реакционной смеси и последующее его высушивание приводит к существенному снижению концентрации маленимидных остатков. Не исключено, что это вызвано разрушением двойной связи маленимидного компонента в условиях эксперимента. Таким образом, предлагаемые нами условия модификации позволили повысить выход реакционноспособного MBS-инсулина почти в 3 раза.

Изучение стабильности MBS-инсулина показало, что при хранении в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0, маленимидный компонент полностью разрушается в течение 12 ч. Ранее было установлено [2], что маленимидный остаток MBS-лейцина при тех же условиях за 30 мин разрушается на 7%. Попытка предохранить MBS-инсулин от деградации путем замораживания не дала удовлетворительных результатов. Таким образом, MBS-инсулин необходимо использовать сразу после его получения.

Реакцию связывания модифицированного инсулина с тиаловой группой β -галактозидазы проводили при pH 7,0. С целью полного связывания фермента использовали 30-кратный мольный избыток MBS-инсулина. Анализ проб в процессе реакции не обнаружил изменений в активности β -галактозидазы. После завершения реакции реакционную смесь хроматографировали на колонке с сефарозой 6В (рис. 1). Конъюгат количественно отделяется от остатков MBS-инсулина (рис. 1). Фракции, проявляющие высокую β -галактозидазную активность, объединяли и использовали в дальнейшей работе. Характеристиками, определяющими эффективность предлагаемого метода конъюгации, являются выход конъюгата, степень сохранения ферментативной активности и способность взаимодействовать

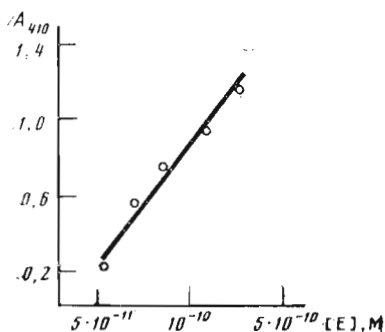


Рис. 3

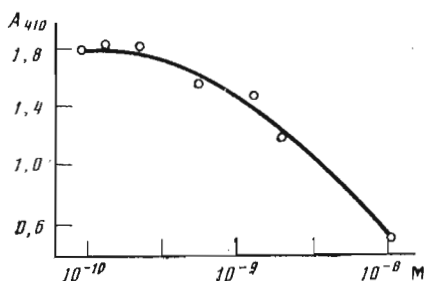


Рис. 4

Рис. 3. Гидролиз *o*-нитрофенил-β-галактопиранозид конъюгатом, связанным с моноклональными антителами

Рис. 4. Калибровочная кривая определения инсулина конкурентным методом иммуноферментного анализа

с антителами. Выход конъюгата по ферменту, рассчитанный из данных по активности исходного фермента и активности β-галактозидазы после хроматографического разделения, составил свыше 90%.

Исследования полученного конъюгата показали, что минимально детектируемая концентрация конъюгата при использовании в качестве субстрата *o*-нитрофенил-β-галактопиранозид составляет $5 \cdot 10^{-11}$ М (рис. 2). При использовании же флуорогенного субстрата β-галактозидазы — 4-метилумбеллиферил-β-галактопиранозид концентрацию детектируемого конъюгата удалось понизить до $2 \cdot 10^{-12}$ М. Установлено, что удельная активность β-галактозидазы в конъюгате сразу после его получения и очистки практически не отличается от удельной активности нативного фермента, однако при хранении (~6 мес) она уменьшается более чем в 3 раза. Не исключено, что это связано с отсутствием в буфере, где хранился конъюгат, восстанавливающих агентов (дитиотреита или β-меркаптоэтанола), которые увеличивают стабильность β-галактозидазы в растворе. В данном случае повышение стабильности конъюгата таким путем невозможно, так как добавление этих восстановителей приводит к потере способности конъюгата образовывать комплекс с антителами — по-видимому, из-за разрушения дисульфидных связей инсулина.

Доступность антигенных детерминант инсулина определяли взаимодействием синтезированного конъюгата с иммобилизованными на твердой фазе моноклональными антителами к гормону. Связавшийся с антителами конъюгат выявляли по ферментативной реакции (рис. 3). Синтезированный конъюгат может быть использован для количественного определения инсулина методом конкурентного иммуноферментного анализа. Минимальная определяемая с данными реагентами концентрация инсулина составляет $6,3 \cdot 10^{-10}$ М (рис. 4). Это позволяет использовать полученный конъюгат для решения ряда практических задач: количественного определения инсулина на разных стадиях его производства, тестирования инсулина, получаемого генно-инженерным методом, и отбора клонов при получении моноклональных антител.

Экспериментальная часть

В работе использовали ссфадексы G-15 и G-50 (Pharmacia, Швеция), ссфарозу 6B (Pharmacia, Швеция), дитиотреит (Serva, ФРГ), β-меркаптоэтанол (Ferak, Зап. Берлин), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (Serva, ФРГ), N-гидроксисукцилимидный эфир *m*-малеимидобензойной кислоты (Sigma, США), *o*-нитрофенил-β-галактопиранозид и 4-метилумбеллиферил-β-галактопиранозид (Sigma, США).

β -Галактозидазу выделяли из биомассы *E. coli* по методике [7]. Гомогенность препарата подтверждена электрофорезом в полиакриламидном геле [8].

Моноклональные антитела к инсулину получены совместно с Е. С. Севериным и сотр. (ИМБ АН СССР) [9].

Монокликовый свиной инсулин выделен и очищен из отечественного препарата и любезно предоставлен для работы И. А. Дзнецким (ВНИИТКГП).

Определение концентрации белка проводили по поглощению при λ 280 нм с учетом $E^{0,1\%}=2,1$ для β -галактозидазы и $E^{0,1\%}=1,4$ для антител и с помощью красителя кумасси G-250 [10].

Активность β -галактозидазы определяли спектрофотометрически с *o*-нитрофенил- β -галактопиранозидом по методике [11] и флуориметрически с 4-метилумбеллиферил- β -галактопиранозидом по методике [2].

Ацилирование инсулина MBS. К 3 мг инсулина, растворенного в 50 мкл воды (рН 10), добавляли 250 мкл 0,1 М Na-фосфатного буфера, рН 7,0. Полученный раствор смешивали с 200 мкл MBS (5 мг/мл) в диоксане. После инкубации при осторожном перемешивании в течение 1 ч при 30° С непрореагировавший MBS и диоксан отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-15 (1,4×7 см), уравновешенным 0,05 М Na-фосфатным буфером, рН 7,0. Анализ ацилированного инсулина проводили реактивом Элмана [12] по модифицированной методике [6]. В 1 мл 0,1 М трис-HCl-буфера, рН 7,9, добавляли 0,1 мл (5 мг/мл) модифицированного инсулина, 10 мкл 1,4 мМ раствора β -меркаптоэтанола и 50 мкл (1 мг/мл) 5,5'-дитионис (2-нитробензойной кислоты) в том же буфере. При расчете количества образовавшейся 5-тио-2-нитробензойной кислоты использовали значение ϵ 13 600 М⁻¹·см⁻¹ (λ 412 нм). В контрольной пробе MBS-инсулин заменяли 0,1 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера, рН 7,0.

Конъюгация β -галактозидазы с MBS-инсулином. К 1 мл раствора β -галактозидазы (0,5 мг/мл) в 0,05 М Na-фосфатном буфере, рН 7,0, добавляли 200 мкл MBS-инсулина в том же буфере. После инкубации в течение 2 ч при 22° С реакцию останавливали добавлением 10 мМ раствора азидата натрия. Реакционную смесь хроматографировали на колонке с сефарозой 6В (1,6×43 см), уравновешенной 0,05 М Na-фосфатным буфером, рН 7,0. Объем собираемых фракций 5 мл, скорость элюции 20 мл/ч.

Связывание конъюгированного инсулина с антителами. На полистироловые планшеты с сорбированными моноклональными антителами к инсулину добавляли 50 мкл конъюгата и 50 мкл 0,05 М Na-фосфатного буфера, рН 7,5, содержащего 0,05% твина-20. Начальную концентрацию конъюгата изменяли от $1,38 \cdot 10^{-8}$ до $5,39 \cdot 10^{-11}$ М по ферменту. После инкубации в течение 1 ч при 37° С и отмывки буфером с твином в лунки планшетов добавляли 0,1 мл раствора *o*-нитрофенил- β -галактопиранозид (0,7 мг/мл) в 0,05 М Na-фосфатном буфере, рН 7,0, содержащем 1 мМ MgCl₂ и 1 мМ дитиотреит. Через 1 ч реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 1 М Na₂CO₃ и измеряли поглощение при λ 410 нм на абсорбциометре MR-600 (Dynatech, Швейцария).

Иммуоферментный анализ инсулина. В лунки полистироловых планшетов с сорбированными моноклональными антителами к инсулину одновременно добавляли 50 мкл конъюгата ($4,3 \cdot 10^{-10}$ М) в 0,05 М Na-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 0,05% твина-20, и 50 мкл раствора, содержащего различные концентрации инсулина (от $1,2 \cdot 10^{-10}$ до $6,25 \cdot 10^{-8}$ М) в том же буфере. После инкубации в течение 1 ч при 37° С и 3-кратной промывки 0,05 М Na-фосфатным буфером, рН 7,5, с твином-20 связавшийся с твердой фазой конъюгат определяли как описано выше.

Авторы выражают глубокую благодарность д-ру биол. наук А. М. Егорову (МГУ) за проявленный интерес и помощь при выполнении настоящей работы.

1. Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S., Yoshitake S., Hamaguchi Y., Ueno T. J. Immunoassay, 1983, v. 4, № 3, p. 209-327.
2. Kitagawa T., Aikawa T. J. Biochem., 1976, v. 79, № 1, p. 233-236.
3. O'Sullivan M. J., Gnemmi E., Morris D., Chieragatti G., Simmons M., Simmonds A. D., Bridges J. W., Marks V. FEBS Lett., 1978, v. 95, № 2, p. 311-313.
4. O'Sullivan M. J., Gnemmi E., Morris D., Chieragatti G., Simmons A. D., Simmonds M., Bridges J. W., Marks V. Anal. Biochem., 1979, v. 100, № 1, p. 100-108.
5. Hartley B. S. Biochem. J., 1970, v. 119, № 5, p. 805-822.
6. Sedlak J., Lindsay R. H. Anal. Biochem., 1968, v. 25, № 1-3, p. 192-205.
7. Цыганков А. Ю., Орловский А. Ф., Гладилин К. Л. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 4, с. 471-479.
8. Davis B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 245, № 20, p. 5206-5213.
9. Kurochkin S. N., Egorov A. M., Gavrilova E. M., Rabtsova M. Yu., Cherednikova T. V., Severin E. S. In: Advances in enzyme regulation/Ed. Weber G. N. Y.: Pergamon Press, 1984, v. 23, p. 377-386.
10. Bradford M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1, 2, p. 248-254.
11. Craven G. R., Steers E., Anfinsen C. B. J. Biol. Chem., 1965, v. 240, № 6, p. 2468-2477.
12. Ellman G. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1959, v. 82, № 1, p. 70-77.

Поступила в редакцию
16.VII.1985

PREPARATION OF INSULIN CONJUGATE WITH *E. COLI* β -GALACTOSIDASE FOR ENZYME IMMUNOASSAY

MARKARYAN A. N., CHEREDNIKOVA T. V., DZANTIEV B. B.

*A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A modified procedure has been worked out for preparing a conjugate of porcine insulin with *E. coli* β -galactosidase employing a heterobifunctional reagent, N-hydroxy-succinimidyl *m*-maleimidobenzoate. Optimal conditions for insulin acylation and subsequent coupling with β -galactosidase were selected that afforded the conjugate in a high yield. The ability of the modified antigen to react with antibody was evaluated in the reaction of conjugate binding with immobilized monoclonal antibody to insulin. The conjugate almost completely retained the enzymatic activity and reacted with high specificity with the antibody to insulin. The conjugate can be used in competitive ELISA of insulin.