



УДК 577.112.4.083.3

НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ ГЕМИНА с IgG КРОЛИКА

Пизкулева И. А., Турко И. В.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

С помощью реагента Вудворда К синтезированы стабильные активированные производные гемина, которые получены в очищенном состоянии. Оптимизированы условия модификации ими молекул IgG кролика. Обсуждаются преимущества предложенного способа мечения IgG по сравнению с традиционным карбодимидным методом.

Хемилюминесцентный иммуноанализ — один из альтернативных методов иммунологического микроанализа. Его возможности и преимущества подробно описаны в обзоре [1]. Один из вариантов хемилюминесцентного иммуноанализа связан с использованием в качестве маркера для молекул антител гемина (Fe^{III} -комплекс 1, 3, 5, 8-тетраметил-2, 4-дивинилпорфирина-6, 7-дипропионовой кислоты). Аналитические параметры анализа в значительной степени зависят от свойств конъюгата гемина с антителами. В настоящее время описаны четыре способа получения конъюгатов порфиринов с антителами: карбодимидный, метод активированных эфиров, имидазолидный и метод смешанных ангидридов [2, 3]. Помимо частных недостатков, присущих каждому способу в отдельности, все эти методы характеризуются тем, что при получении конъюгатов активированное производное порфирина не выделяется в индивидуальном состоянии. Реакционная смесь добавляется к раствору антител, и они подвергаются обработке

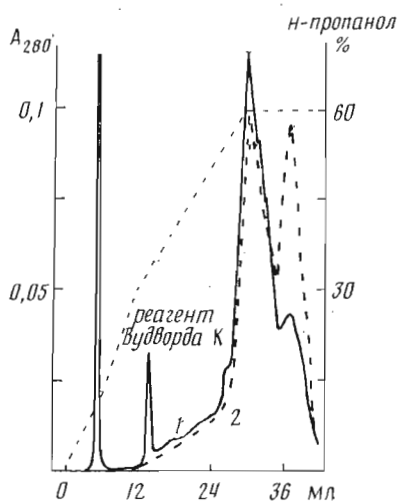


Рис. 1. ВЭЖХ на носителе Ultrasphere ODS продуктов синтеза активированных производных гемина до (1) и после (2) очистки на силикагеле. Условия хроматографии см. в «Экспер. части»

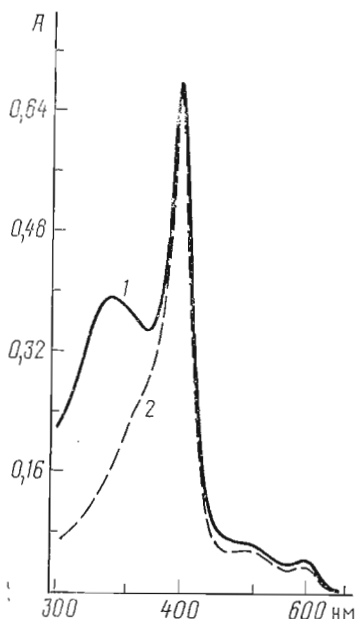


Рис. 2. Спектры поглощения смеси очищенных активированных производных гемина (1) и немодифицированного гемина (2) в смеси хлороформ — метанол (7 : 3)

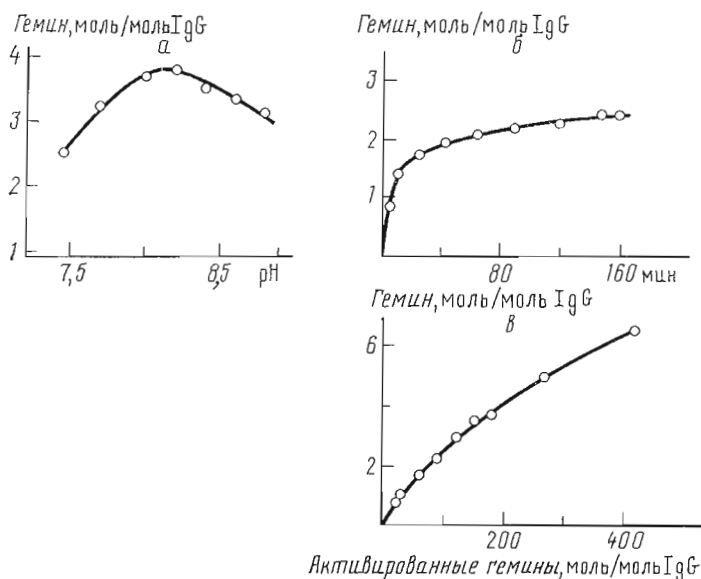


Рис. 3. Модификация IgG активированными производными гемина: а — влияние pH на степень модификации при обработке белка 200-кратным молярным избытком реагента в течение 60 мин, б — кинетика процесса модификации при использовании 80-кратного молярного избытка реагента, в — зависимость степени модификации от избытка реагента при проведении реакции в течение 60 мин при pH 8,2. Условия реакций см. в «Экспер. части»

активирующим агентом, что крайне нежелательно, так как необходимо максимально сохранить исходные функциональные свойства аптител.

В настоящей работе с помощью реагента Вудворда К (N-этил-5-фенил-изоксазоль-3'-сульфокислота) синтезированы стабильные активированные производные гемина, которые получены в очищенном состоянии, и оптимизированы условия модификации ими молекул IgG.

Условия реакции для синтеза модифицированных геминов соответствовали работе Вудворда [4] по активации карбоксильных групп солями изоксазолия. Непрореагировавший гемин удаляли из реакционной среды центрифугированием, так как он нерастворим в ацетоцитриле, а избыток реагента Вудворда К — хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента смесь ацетон — изопропанол — триэтиламин (9 : 7 : 0,2). При этом окрашенное пятно, содержащее активированные производные гемина, оставалось сорбированным в верхней части колонки, а реагент Вудворда К элюировался с колонки (для реагента Вудворда К R_f в данной системе составляет 0,32). Десорбцию активированных производных гемина осуществляли метанолом. Их чистота контролировалась ТСХ и ВЭЖХ. Во всех случаях мы имели дело со смесью моно- и дизамещенных производных гемина, которые разделяются при ТСХ на силикагеле в системе 2,6-лутидин — H_2O , 10:3 (R_f 0,72 и 0,65 соответственно) и при ВЭЖХ (время удерживания 122 и 96 мин) (рис. 1) и которые не содержат примеси исходных соединений. Наличие в спектре поглощения полученного продукта (рис. 2) максимума при 340 нм, характерного для енольного эфира реагента Вудворда К с карбоксильной группой [5], и отсутствие пика при 319 нм, характерного для свободного реагента Вудворда К [5], свидетельствует об образовании активированных по $COOH$ -группе производных гемина.

Для оптимизации условий модификации IgG активированными производными гемина первоначально было исследовано влияние значения pH и состава буферных смесей на степень модификации. При проведении реакции в фосфатном буфере, pH 7,5, трис-HCl-буфере, pH 8,2, или бикарбонатном буфере, pH 9,0, степень модификации была незначительна — не более 0,2 моль гемина/моль IgG. Иная картина наблюдалась при добавлении в буферные системы имидазола — катализатора в реакциях пуклео-

фильного замещения (рис. 3а). рН-оптимум реакции в присутствии имидазола находится при значениях рН 8,0–8,2, поэтому все последующие эксперименты проводились при рН 8,2. Исследование кинетики процесса модификации (рис. 3б) свидетельствует о том, что реакция протекает быстро и 1 ч достаточно для получения высоких значений степени модификации. При анализе зависимости степени модификации от избытка реагента (рис. 3в) мы не стремились достиг-

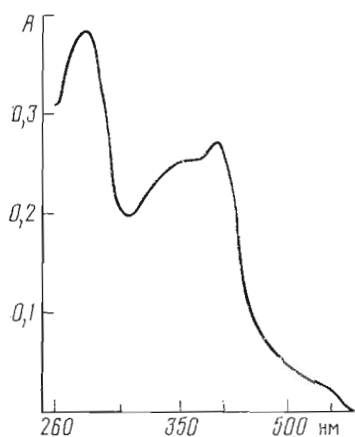


Рис. 4. Спектр поглощения конъюгата гемин-IgG состава 4:1 моль/моль в 0,1 М фосфатном буфере, содержащем 6 М хлорид-рат гуанидина, рН 7,2

нуть максимальных значений степени модификации, так как известно, что при этом нарушаются антигенсвязывающие свойства IgG и их растворимость. Таким образом, для введения в молекулу IgG 5–6 остатков гемина достаточно обработать их 300-кратным мольным избытком активированных производных гемина в течение 1 ч при рН 8,2. Спектр такого белка представлен на рис. 4.

Исследование стабильности активированных производных гемина позволило установить, что в течение 1 мес при условии их хранения при -15°C в лиофилизированном состоянии степень модификации IgG при проведении реакции в идентичных условиях не изменялась.

Предложенный нами способ мечения IgG по сравнению с наиболее широко используемым карбодимидным методом [2] обладает рядом преимуществ: 1) существенно сокращает время получения конъюгата; 2) активированные реагентом Вудворда К производные гемина хорошо растворяются в воде, что позволяет проводить реакцию без добавления органических растворителей (в случае карбодимидного метода содержание диметилсульфоксида в реакционной среде достигает 40%); 3) побочными реакциями при получении конъюгатов с помощью карбодимидов являются образование полимерных форм IgG за счет сшивания белков и неспецифическое мечение по остаткам тирозина и гистидина, модификация которых может ухудшить антигенсвязывающие свойства IgG. Все эти эффекты отсутствуют при использовании активированных с помощью реагента Вудворда К производных гемина. И еще одно достоинство этих соединений необходимо отметить. Так как активированные производные гемина не реагируют с аминогруппами белка при рН 7,0 в отсутствие катализатора (имидазола), реакции аффинного узнавания метки и ее пришивки к белку могут быть разнесены во времени. Таким образом, активированные с помощью реагента Вудворда К производные гемина могут быть использованы в качестве аффинной метки для локализации активного центра в ферментах, содержащих в качестве простетической группы Fe-протопорфирина IX, или же для идентификации участков связывания в белках, обладающих средством к гемину.

Экспериментальная часть

В работе использовали хлоргемин, реагент Вудворда К, силикагель Silica Servachrom Si-60 (0,05–0,1 мм; Serva, ФРГ), имидазол (Calbiochem, США), ацетонитрил (Merck, ФРГ), триэтиламин (Fluka, ФРГ).

Индивидуальность полученных соединений проверяли методом ТСХ на хроматографических пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системах растворителей 2,6-лутидин – H₂O (10:3) и ацетон – изопропанол – триэтиламин, 9:7:0,2 (проявление УФ-светом) и ВЭЖХ на хроматографе Altex 340 (США) с проточным детектором Altex 160 (США) на колонке (0,46 × 25 см) с носителем Ultrasphere ODS (5 мкм) в градиенте концентраций *n*-пропанола (0–60%) в 10 мМ ацетате триэтиламина, рН 6,7. Скорость

элюирования составляла 0,3 мл/мин. Детекция осуществлялась при длине волны 280 нм. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре Spectord M-40 (Karl Zeiss, ГДР).

Синтез активированных производных гемина. 13 мг (20 мкмоль) гемина суспендировали в 1,0 мл ацетонитрила, содержащем 0,03 мл (220 мкмоль) триэтиламина, и добавляли к суспензии реагента Вудворда К (15 мг, 60 мкмоль) в 1,0 мл ацетонитрила. Реакцию проводили при 20° С при постоянном перемешивании в течение 60 мин в темноте, после чего непрореагировавший гемин удаляли центрифугированием (5000g, 10 мин). Супернатант наносили на колонку (1×14 см) с силикагелем, уравновешенным системой ацетон — изопропанол — триэтиламин, 9:7:0,2, и после промывки колонки 100 мл этой же системы и 30 мл ацетонитрила десорбцию модифицированных геминных производных осуществляли метанолом. Растворитель затем упаривали в вакууме. Полученный препарат (6,1 мг, 9,4 мкмоль, 47% выход по отношению к гемину) представлял собой смесь моно- и дизамещенных производных гемина. Спектр поглощения: $\lambda_{\text{макс}}$ 340 и 400 нм (смесь хлороформ — метанол, 7:3). R_f 0,65 и 0,72 в системе 2,6-лутидин — H₂O, 10:3.

Получение конъюгатов гемина с IgG. IgG из нормальной сыворотки кролика получали фракционированием сульфатом аммония с последующей хроматографией на целлюлозе DE-32 [6]. К 0,3 мл раствора IgG (0,55 мг/мл) в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7,2, подтитрованному до необходимого значения pH имидазолом, добавляли смесь очищенных активированных производных гемина в метаноле. Конечная концентрация метанола не превышала 3%. По окончании реакции, которая проводилась в темноте, IgG осаждали подкисленным ацетоном (0,1 мл HCl на 50 мл ацетона), преципитат дважды промывали подкисленным ацетоном, а затем H₂O, после чего растворяли в 1,0 мл 0,1 М фосфатного буфера, содержащего 6 М хлоргидрат гуанидина, pH 7,2, и записывали спектры поглощения. Для расчета степени модификации были использованы следующие значения молярных коэффициентов поглощения: для гемина ϵ_{390} 93 000 М⁻¹·см⁻¹, ϵ_{280} 31 000 М⁻¹·см⁻¹ [2], для IgG $E_{280}^{1\%}$ 14 [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гагарина Е. М. Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. М.: ВИНТИ АН СССР, 1987. Т. 3. С. 3—55.
2. Ikariyama Y., Suzuki S. // Anal. chim. acta. 1984. V. 156. № 5. P. 245—252.
3. Roberts J. C., Figard S. D., Mercer-Smith J. A., Svitra Z. V., Anderson W. L., Lavallee D. K. // J. Immunol. Meth. 1987. V. 105. № 2. P. 153—164.
4. Woodward R. B., Olofson R. A., Mayer H. // Tetrahedron. 1966. V. 8(suppl.). Pt 1. P. 321—346.
5. Sinha U., Brewer J. M. // Anal. Biochem. 1985. V. 151. № 2. P. 327—333.
6. Phillips A. P., Martin K. L., Horton W. H. // J. Immunol. Meth. 1984. V. 74. № 2. P. 385—393.
7. Coulter A., Harris R. // J. Immunol. Meth. 1983. V. 59. № 2. P. 199—203.

Поступила в редакцию
30.I.1989

A NEW METHOD FOR CONJUGATION OF RABBIT IgG WITH HEMIN

PIKULEVA I. A., TURKO I. V.

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Stable derivatives of hemin activated by means of the Woodward reagent K were obtained, and the reaction conditions for their covalent attachment to the IgG molecule optimized. Advantages of the new method for conjugation are discussed.