



УДК 577.152.111.04:577.112.4+612.017

© 1990 г.

*В. Л. Маркина, Е. И. Карасева, А. Н. Еремин***СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ
С ДЕГИДРОГЕНАЗАМИ***Институт биоорганической химии АН БССР, Минск*

Сравнены три метода синтеза конъюгатов иммуноглобулинов с малат-, лактат- и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназами: с использованием периодатного окисления углеводного фрагмента иммуноглобулинов, водорастворимого карбодиимида или глутарового диальдегида (в одну стадию). Показано, что конъюгаты дегидрогеназ с иммуноглобулинами, полученные глутаральдегидным методом, сохраняют высокую ферментативную активность и иммунореактивность и могут успешно использоваться в иммуноферментном анализе стероидов.

В настоящее время иммуноферментный анализ (ИФА) самых различных антигенов широко применяется в медицине, биотехнологии и сельском хозяйстве [1, 2]. Наиболее часто в качестве ферментов-маркеров и ИФА используются пероксидаза, β -галактозидаза и щелочная фосфатаза [3–5].

Ранее нами была показана возможность успешного использования лактатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в ИФА прогестерона и кортизола [6, 7]. Однако получение конъюгатов ферментов с рядом низкомолекулярных антигенов (стероидные гормоны, канцерогены ароматического ряда, токсиканты окружающей среды) сопряжено с синтезом активированных производных гаптен, применением органических растворителей и длительным диализом [6, 7]. Наиболее перспективно использование в ИФА конъюгатов ферментов-маркеров с аптителами, так как белковые молекулы в мягких условиях можно ковалентно связать с минимальной потерей их каталитической активности и иммунохимических свойств [5, 8–11].

Целью данной работы было сравнение трех способов синтеза конъюгатов антивидовых аптител с малатдегидрогеназой, лактатдегидрогеназой и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой с использованием периодатного окисления углеводного фрагмента иммуноглобулинов, водорастворимого карбодиимида и глутарового диальдегида.

Сравнительная характеристика перечисленных методов при получении конъюгатов малатдегидрогеназы с антивидовыми аптителами приведена в табл. 1.

Для синтеза конъюгатов аптител с пероксидазой или щелочной фосфатазой ранее использовали окисление углеводных компонентов ферментов метапериодатом натрия с последующим связыванием аптител по их свободным NH_2 -группам [8–14]. Однако дегидрогеназы лишены углеводного компонента, поэтому в настоящей работе мы окисляли периодатом углеводный фрагмент иммуноглобулинов. Однако, как следует из табл. 1, выход и активность конъюгата малатдегидрогеназы с аптителами, полученного периодатным методом, весьма низкие, а в случае глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы конъюгата вообще не обнаружено.

По-видимому, метод периодатного окисления можно использовать только при наличии у ферментов-маркеров доступных углеводных фрагментов [8–11, 13, 14]. Окисленные углеводные фрагменты иммуноглобулинов G весьма слабо взаимодействуют со свободными NH_2 -группами дегидрогеназ.

Таблица 1

Сравнение методов получения конъюгатов малатдегидрогеназы с антивидами антителами

Метод	Выход конъюгата по белку, %	Малатдегидрогеназная активность конъюгата, % от активности исходного фермента
Периодатный	13,0	3
Карбодиямидный	17,7	4
Глутаральдегидный	40,0	54

Таблица 2

Характеристики конъюгатов глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы с антителами, полученных глутаральдегидным методом

Концентрация глутарового диальдегида, %	Выход конъюгата по белку, %	Удельная каталитическая активность, Е/мг	Каталитическая активность, % от исходной
0,05	62,0	2,9	0,9
0,04	40,0	23,6	7,1
0,03	24,3	151,4	45,9

Таблица 3

Кинетические характеристики малатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и их конъюгатов с антивидами антителами, полученных глутаральдегидным методом

Фермент/конъюгат с иммуноглобулином *	$K_m \cdot 10^4, M$		$V \cdot 10^7, M \cdot c^{-1}$
	субстрат	кофактор	
Малатдегидрогеназа	1,18	0,556	13,3
Конъюгат малатдегидрогеназы	0,83	0,556	7,14
Глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназа	4,16	0,230	14,3
Конъюгат глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназы	5,50	0,370	11,1

* Концентрация конъюгатов малат- и глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназ с антителами составляет 0,28 и 0,21 мкМ соответственно.

Анализ карбодиямидного способа синтеза конъюгатов малатдегидрогеназы с иммуноглобулинами G показал, что карбоксильные группы малатдегидрогеназы легко реагируют с карбодиямидом в водной среде при pH 7. При более низких значениях pH фермент инактивируется. Однако проведение реакции при нейтральном pH сопровождается димеризацией молекул фермента. Поэтому аминокислоты фермента защищали ацетилацетоном. В ходе реакции с ацетилацетоном одновременно следили за изменением числа модифицированных остатков лизина и активностью фермента (рис. 1).

Ацетилацетон модифицирует практически все свободные NH_2 -группы малатдегидрогеназы (рис. 1), однако сильно модифицированный фермент лишен каталитической активности. Для последующего синтеза конъюгата достаточно защитить наиболее доступные аминокислоты, что достигается примерно за 2–4 ч в реакции с ацетилацетоном. В дальнейшем использовали препарат фермента, обработанный ацетилацетоном в течение 4 ч. Однако и в этом случае синтез конъюгатов антивидами антител с малатдегидрогеназой, проводимый карбодиямидным способом, так же как и в случае использования периодатного окисления, сопровождается значительной потерей ферментативной активности белка (рис. 2, табл. 1).

При иммобилизации белков часто используют глутаровый диальдегид. Этот подход применен при синтезе конъюгатов пероксидазы, щелочной фосфатазы и β -галактозидазы с иммуноглобулинами [5, 8]. Однако выход целевого продукта невелик: 15–25%. Наша работа показала, что глутаральдегидный способ синтеза конъюгатов малатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы с антителами дает лучшие результаты (табл. 1–3).

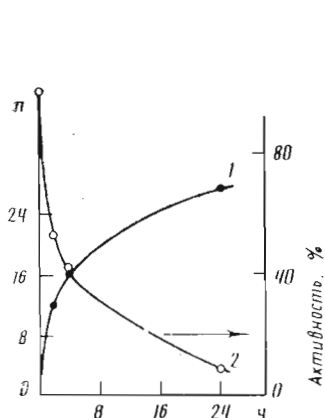


Рис. 1

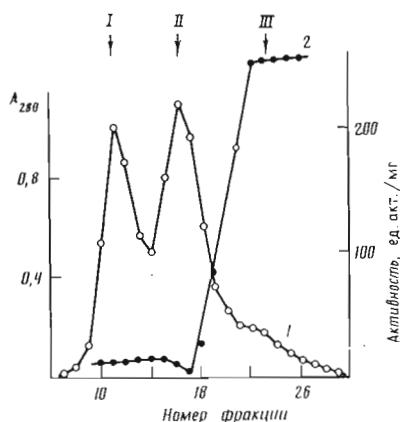


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика модификации остатков лизина (n) малатдегидрогеназы ацетилацетоном (1) и относительная активность модифицированного фермента (2). Условия модификации: 0,5 М бикарбонатный буфер (рН 8,9), 29 мкМ малатдегидрогеназа, 29 мМ ацетилацетон. n — число модифицированных остатков лизина

Рис. 2. Гель-фильтрация смеси продуктов синтеза конъюгатов малатдегидрогеназы с антивидами антителами, полученных при использовании карбодимидного метода. Хроматография на сефадексе G-200 (2,5×40 см). Объем фракций 1,5 мл. Сверху показано место элюции белковых-стандартов: I — каталаза (M 240 кДа), II — IgG (160), III — малатдегидрогеназа (70). 1 — A_{280} , 2 — активность малатдегидрогеназы

При концентрации глутарового диальдегида 0,1–0,2% реакция дегидрогеназ с иммуноглобулинами происходит очень быстро с образованием обильного осадка, а при концентрациях до 0,02% выход конъюгатов очень низок. Оптимальная концентрация альдегида, необходимая для получения конъюгатов малат- и лактатдегидрогеназ с антителами, составила 0,05%, а в случае глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы — 0,03%. На рис. 3 представлен профиль элюции реакционной смеси, содержащей конъюгат малатдегидрогеназы с антителами.

Сравнение кинетических параметров исходных ферментов и их конъюгатов (табл. 3) показывает, что каталитическая активность малатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в конъюгатах достаточно высока и сродство ферментов в конъюгатах к субстрату и кофактору практически не изменяется.

Антитела в составе конъюгатов взаимодействуют со стафилококковым реагентом, содержащим белок А, связывающий антитела (рис. 4).

100 мкл стафилококкового реагента осаждают 80–90% конъюгатов. Это свидетельствует в пользу сохранения свойств Fc-фрагмента антител в составе конъюгата. Кроме того, показано, что конъюгаты дегидрогеназ с антивидами антителами хорошо взаимодействуют с иммуноглобулинами класса G кролика, т. е. антитела в составе конъюгатов не теряют иммунореактивности.

Таким образом, простой и быстрый одностадийный глутаральдегидный метод может быть успешно использован при синтезе конъюгатов дегидрогеназ с антивидами антителами. Эти конъюгаты сохраняют высокую ферментативную активность и иммунореактивность и могут найти применение в таких схемах твердофазного ИФА, преимуществом которых является исключение контакта фермента-маркера с биологической жидкостью и возможность использования одного и того же конъюгата для иммуноферментного определения самых разных антигенов.

Экспериментальная часть

В работе использовали *L*-малатдегидрогеназу (КФ 1.1.1.37), *L*-лактатдегидрогеназу (КФ 1.1.1.27) и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу (КФ 1.1.1.49) производства НПО «Фермент» (Вильнюс) с удельной активностью 670, 280 и 330 ед. акт./мг соответственно. В качестве субстратов

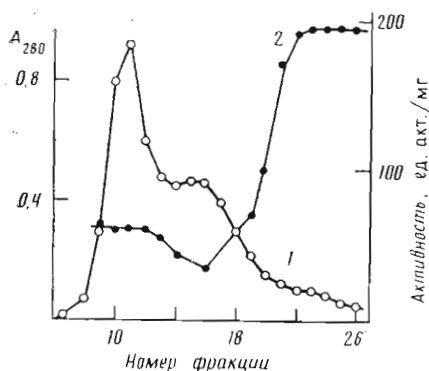


Рис. 3

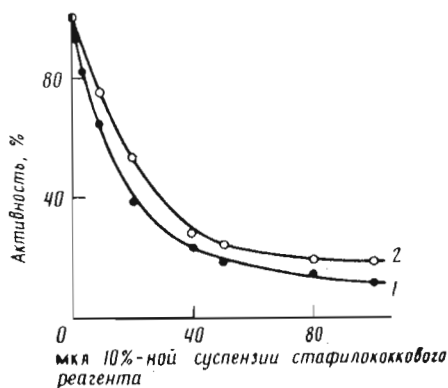


Рис. 4

Рис. 3. Гель-фильтрация смеси продуктов синтеза конъюгатов малатдегидрогеназы с активными антителами, полученных при использовании глутаральдегидного метода. Обозначения см. рис. 2

Рис. 4. Осаждение конъюгатов активированных антител с малатдегидрогеназой (1) и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой (2) стафилококковым реагентом

ферментов использовали цавелевоуксусную и пировиноградную кислоты фирмы Sigma (США), глюкозо-6-фосфат, NADH и NADP (Reanal, ВНР). Применяли стафилококковый реагент отечественного производства. Использовали мето-4-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимида (Serva, ФРГ), метапериодат натрия и 25%-ный водный раствор глутарового диальдегида (Reanal, ВНР).

Модификацию дегидрогеназ ацетилацетоном проводили в 0,5 М бикарбонатном буфере, pH 8,9, при соотношении фермент — ацетилацетон, равном 1 : 1000. За ходом реакции наблюдали, отбирая аликвоты реакционной смеси по времени и проводя их последующую хроматографию на сефадексе G-50, уравновешенном 0,05 М бикарбонатным буфером. В белоксодержащих фракциях определяли ферментативную активность и степень модификации дегидрогеназ [12] (см. «Экспериментальную часть»).

Иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови барана против иммуноглобулинов G кролика получали осаждением 3 М сульфатом аммония с последующим фракционированием на DEAE-целлюлозе.

Синтез конъюгатов иммуноглобулинов с дегидрогеназами. а) *Периодатный метод.* К 33 мкМ водному раствору иммуноглобулинов G барана (pH 6,0) приливали 100-кратный избыток метапериодата натрия. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при 20° С. Избыток окислителя нейтрализовали этиленгликолем. Затем к активированным иммуноглобулинам прибавляли малат- или глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу в мольном соотношении 1 : 1 и инкубировали смеси 1 ч при 20° С, а затем в течение ночи при 4° С. Образовавшиеся азометиновые связи восстанавливали боргидридом натрия и реакционную смесь хроматографировали на колонке с сефадексом G-200.

б) *Карбодиимидный метод.* К 3,7 мкМ раствору модифицированной ацетилацетоном малатдегидрогеназы добавляли мето-4-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимида в конечной концентрации 0,02 М и доводили pH до 7,0. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 20° С, прибавляли к ней 2-кратный мольный избыток иммуноглобулина и оставляли на 2 ч при 20° С, а затем на ночь при 4° С. Реакционную смесь хроматографировали на колонке с сефадексом G-200.

в) *Глутаральдегидный метод.* Смесь фермента с иммуноглобулинами в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4, в мольном соотношении 1 : 1 перемешивали 5 мин, затем добавляли к ней глутаровый диальдегид до конечной концентрации 0,001–0,2%. Реакцию проводили в течение 1 ч при 20° С, после чего смесь хроматографировали на колонке с сефадексом G-200.

Гель-фильтрацию реакционных смесей, содержащих конъюгаты дегидрогеназ с антивидовыми антителами, проводили на колонке (2,5×40,0 см) с сефадексом G-200, уравновешенным 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,4, и откалиброванным смесью малатдегидрогеназы, иммуноглобулинов класса G и каталазы (M 70, 160 и 240 кДа соответственно). Белки элюировали тем же буфером со скоростью 8 мл/ч. Фракции (по 1,5 мл) собирали, измеряли их оптическую плотность при 280 нм и находили концентрацию белков по методу [15].

Ферментативную активность конъюгатов антивидовых антител с малат- и лактатдегидрогеназами определяли при 20°С в 0,1 М фосфатном буфере с pH 7,4, содержащем 0,15 мМ NADH и 0,3 мМ щавелевоуксусную или 0,2 мМ пировиноградную кислоту (соответственно в случае малат- и лактатдегидрогеназ). Ферментативную активность конъюгатов с глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой определяли при 20°С в 0,1 М глициновом буфере с pH 9,1, содержащем 1,0 мМ глюкозо-6-фосфат и 0,4 мМ NADP. Реакции начинали добавлением кофактора и через 1 ч регистрировали оптическое поглощение растворов при длине волны 340 нм. Начальные скорости реакций вычисляли, используя молярный коэффициент поглощения восстановленных форм кофакторов, равный 6220 М⁻¹·см⁻¹ [16]. Все спектральные измерения проводили в термостатированных кюветах на приборах Specord UV VIS и Specol 21 (ГДР).

Осаждение конъюгатов антивидовых антител с дегидрогеназами проводили добавлением 5–100 мкл 10% суспензии стафилококкового реагента в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4, к 100 мкл конъюгата малат- или глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназ с антивидовыми антителами. Общий объем доводили буфером до 200 мкл и смесь встряхивали в течение 1 ч. После центрифугирования смеси в течение 10 мин при 4000 об/мин определяли остаточную активность конъюгатов в надосадочной жидкости.

Авторы выражают благодарность проф. Д. И. Метелице за участие в обсуждении результатов и высказанные замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дзангисев Б. Б., Осипов А. П. // Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 3. Неизотопные методы анализа. М.: ВИНТИ, 1987. С. 56–116.
2. Егоров А. М. // Методы иммуноферментного анализа в биологии и медицине. М.: НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 1983. С. 3–24.
3. Cartier J., Bout D., Capron A. // Bull. Inst. Pasteur. 1981. V. 79. P. 313–382.
4. Maggio E. T. // Enzyme-Immunoassay/Ed. Maggio E. T. Boca Raton: CRC Press, 1983. P. 53–70.
5. Schrenk W. J., Kurzinger K. // Med. Lab. Sci. 1986. V. 43. P. 269–276.
6. Маркина В. Л., Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Тез. докл. V Всесоюз. конф. «Методы получения и анализа биохимических препаратов». Рига, 1987. С. 24.
7. Карасева Е. Н., Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Тез. докл. Всесоюз. конф. «Современные направления создания медицинских диагностикумов». М., 1988. С. 58.
8. Kabakoff D. S. // Enzyme-Immunoassay/Ed. Maggio E. T. Boca Raton: CRC Press, 1983. P. 71–104.
9. Tsang V. C. W., Hancock K., Maddison S. E. // J. Immunol. Meth. 1984. V. 70. № 1. P. 91–100.
10. Deelder A. M., DeWater P. // J. Histochem. Cytochem. 1981. V. 29. № 11. P. 1279–1280.
11. Nakane P. K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. 1974. V. 22. № 12. P. 1084–1091.
12. Гаврилова Н. А., Гринкевич Х. А., Антонов В. К. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 8. С. 1176–1183.
13. Williams D. G. // J. Immunol. Meth. 1984. V. 72. № 2. P. 261–268.
14. Halliday M. J., Wisdom G. B. // Biochem. Soc. Trans. 1986. V. 14. P. 473–474.
15. Sedmak J. J., Grossberg S. E. // Anal. Biochem. 1977. V. 79. № 1/2. P. 544–552.
16. Калинин Ф. Л., Лобов В. П., Жидков В. А. Справочник биохимика. Киев: Наук. думка, 1971. С. 320.

Поступила в редакцию

15.II.1989

После доработки

2.VIII.1989

V. L. MARKINA, E. I. KARASYOVA, A. N. ERYOMIN
THE SYNTHESIS OF IMMUNOGLOBULIN CONJUGATES WITH
DEHYDROGENASES

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

Three methods of synthesis of immunoglobulin conjugates with malate, lactate and glucose-6-phosphate dehydrogenases, involving the sodium metaperiodate oxidation of immunoglobulin carbohydrate component, use of water-soluble carbodiimide and the one-step glutaraldehyde technique, were compared. The glutaraldehyde method was shown to give immunoglobulin-dehydrogenase conjugates with high catalytic and immunochemical activity, which may be useful for enzyme-immunoassay.