



УДК 577.112.083.3

© 1992 г. Т. А. Головинна, И. Е. Кашеверов, Д. Ю. Пласкин*,
Н. Б. Якунина, В. А. Коваленко, Ю. Н. Уткин,
В. И. Цетлин

НОВЫЙ ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ ВЕЩЕСТВА Р НА ОСНОВЕ БИОТИН-СТРЕПТАВИДИНОВОЙ СИСТЕМЫ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва;

* Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

Предложен метод обнаружения мембранных рецепторов вещества Р (SP), не требующий использования радиоактивных производных этого пептида. В основе метода лежит количественное определение специфически связывающегося биотинилированного SP (Bt-SP), которое проводится после разрушения лиганд-рецепторного комплекса в кислых условиях и перехода Bt-SP в раствор. Для этого кислотный экстракт мембранного комплекса Bt-SP после нейтрализации вносят в лунки стандартных иммунологических планшет, покрытых аффинноочищенными антителами к SP. Чувствительность последующей детекции Bt-SP увеличена благодаря использованию нового типа конъюгата стрептавидина с полимерной формой пероксидазы хрена.

При выборе оптимальных условий иммуноферментного анализа использовано ¹²⁵I-меченое производное SP. Разработанный метод позволяет определять фемтомоли Bt-SP в пробе и по чувствительности сопоставим с радиолигандным анализом, проводившимся в параллельных экспериментах.

Радиолигандный анализ — наиболее распространенный метод изучения связывания различных соединений с рецепторами. Наряду с несомненными достоинствами (высокая чувствительность, надежность и т. п.) этот метод имеет и ряд недостатков, самый существенный из которых — необходимость работы с радиоактивными веществами. С другой стороны, на основе системы биотин — авидин или биотин — стрептавидин для меченя биомолекул в ряде случаев удается достичь уровня чувствительности радиоизотопных методов [1].

В настоящей работе предлагается новый метод изучения лиганд-рецепторного взаимодействия с использованием этой системы. Его суть состоит в том, что количественному определению подвергается не комплекс радиоактивно меченного лиганда с рецептором, а биотинилированный лиганд, высвобождающийся после разрушения комплекса. При этом определение лиганда, принимавшего участие в связывании с рецептором, проводится с помощью иммуноферментного анализа. Данный метод опробован при изучении взаимодействия вещества Р (RPKPQQFFGLM-NH₂), с тахикининовыми рецепторами мембран мозга крысы. В качестве лиганда использовано SP, модифицированное по остатку Lys³ N-оксисукцинимидным эфиром N'-биотинил-ε-аминокапроновой кислоты — Bt-SP. Предварительно проведенные нами опыты по конкуренции с радиоактивным SP показали,

Список сокращений: SP — вещество Р; Bt-SP — биотинилированное вещество Р; KLN — гемоцианин моллюска *Keyhole limpet*; BH — реагент Болтона — Хантера (N-оксисукцинимидный эфир 3-(4-гидроксифенил)пропионовой кислоты); PMSF — фенилметилсульфонилфторид; EDAC — 2-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиаимид; PBS — фосфатно-солевой буфер; IgG — иммуноглобулины класса G; BSA — бычий сывороточный альбумин.

что эффективность связывания Bt-SP с рецептором близка к таковой для природного лиганда (следует отметить, что биотинилированные производные SP, не содержащие капроильного спейсера, связывались с мозгом крысы всего в 1,5–3 раза менее эффективно, чем SP [2]).

Согласно данным радиOLIгандного анализа, содержание рецепторов SP в мембранных фракциях мозга мало и, как правило, не превышает 10–50 фмоль/мг белка [3–6]. Поэтому проблема количественного иммуноферментного анализа SP, связывающегося с мембранным рецептором, весьма не проста. Так, если поставить задачу определить SP или его производное, которое связывается с ~0,5 мг мембранного белка, обычно используемого при радиOLIгандном анализе на одно определение, то в этом случае необходимо достоверно определять 5–25 фмоль лиганда при концентрации 50–250 пМ. Указанные величины получаются, если предположить, что рецепторный комплекс удастся затем полностью диссоциировать и перевести связанный с мембранами лиганд в раствор объемом около 100 мкл (оптимальный объем для работы с 96-луночными планшетами). Оценка чувствительности обычных вариантов иммуноферментного анализа с использованием в качестве метки пероксидазы хрена и ее доступных хромогенных субстратов [7] показывает, что решение такой задачи лежит на грани возможности метода.

Следует отметить, что ранее предпринимались попытки определения SP с помощью нерадиоактивных методов [8, 9]. В частности, были разработаны методики иммуноферментного анализа, использующие моно- и поликлональные антитела против SP и производные SP, конъюгированные с ацетилхолинэстеразой [8]. Нижний предел определяемого при этом количества SP находился на уровне 5–50 фмоль. Поэтому мы предприняли поиск путей увеличения чувствительности системы детекции: были привлечены уникальные возможности биотин-стрептавидиновой системы, а также синтезированы новые конъюгаты на основе полимерной формы пероксидазы, позволяющие повысить чувствительность детектирующего звена по крайней мере на порядок по сравнению с аналогичными конъюгатами мономерной пероксидазы.

Первый этап исследования состоял в разработке чувствительного метода определения биотинилированного SP и построении калибровочных кривых, необходимых для последующего анализа лиганд-рецепторных взаимодействий. На рис. 1 представлены схемы двух вариантов определения Bt-SP, предполагающих образование биотин-стрептавидинового комплекса и взаимодействие с антителами, полученными на конъюгат SP с KLH.

Первый вариант включает извлечение Bt-SP из раствора на стрептавидин, сорбированный в лунках планшет, с последующим взаимодействием с антителами и их выявлением конъюгатом белка А с полимерной пероксидазой или конъюгатами антивидовых антител.

По второму варианту Bt-SP извлекается антителами, сорбированными в лунках планшет, а выявление связанного таким образом Bt-SP осуществляется с помощью конъюгата стрептавидин-полимерная пероксидаза. Оба варианта предполагают, что Bt-SP способен образовывать тройной комплекс с антителами и стрептавидином (или ферментативным конъюгатом стрептавидина). Предварительные эксперименты с сыворотками, полученными от кроликов, иммунизированных конъюгатом SP с KLH, показали, что такой тройной комплекс действительно образуется как в первом, так и во втором варианте.

Для дальнейшей работы мы использовали аффинноочищенные антитела к SP, полученные хроматографией на целлюлозе с иммобилизованным SP. Пороговая чувствительность, достигнутая при анализе Bt-SP с извлечением на стрептавидине с последующей обработкой антителами и их

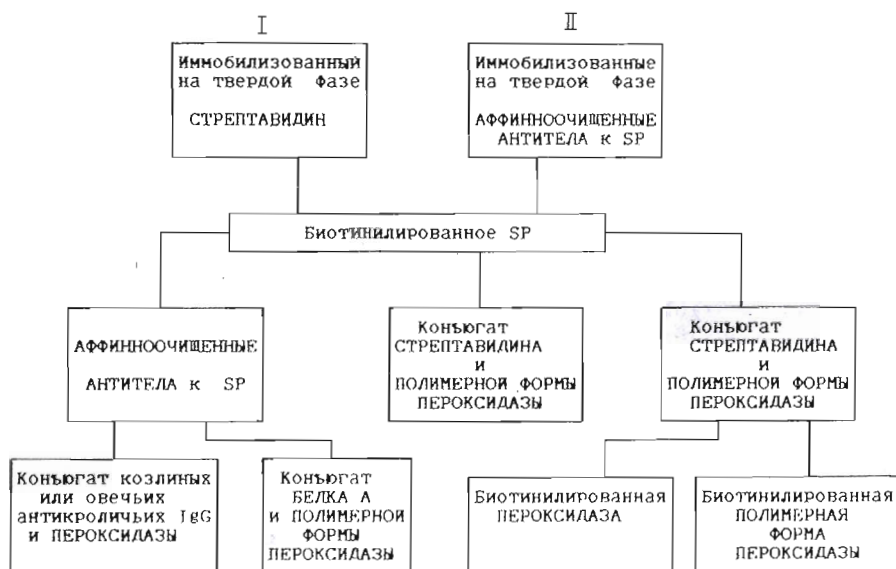


Рис. 1. Схемы комплексов, образующихся в результате различных вариантов иммуноферментного анализа Bt-SP

выявлением конъюгатами антивидовых антител с пероксидазой (или конъюгатом белка А с полимерной пероксидазой), составила около 100 фмоль в пробе (10^{-9} М), что по крайней мере на порядок превышало чувствительность метода, использующего прямую иммобилизацию Bt-SP в лунках иммунологической планшеты (на схеме этот вариант не обозначен). Значительно большая чувствительность получена при анализе Bt-SP путем извлечения на иммобилизованных антителах и выявлением конъюгатом стрептавидин—полимерная пероксидаза: пороговая чувствительность составила около 0,5 фмоль в пробе, что соответствует концентрации Bt-SP в анализируемом растворе $5 \cdot 10^{-12}$ М (рис. 2, кривая 1). Причем увеличение чувствительности, обусловленное использованием стрептавидинового конъюгата на основе полимерной пероксидазы, составило по крайней мере 10-кратную величину по сравнению со стандартным конъюгатом стрептавидин—пероксидаза. Попытки дальнейшего повышения чувствительности анализа за счет дополнительного введения ферментативной метки в виде биотинилированной пероксидазы (или полипероксидазы) (после обработки стрептавидиновым конъюгатом) не дали желаемых результатов. Тем не менее достигнутая чувствительность определения Bt-SP в растворе уже давала основания для использования этого варианта при детектировании тахикининовых рецепторов.

Следующим этапом исследования была адаптация разработанного иммуноферментного метода определения Bt-SP в растворе к обнаружению тахикининовых рецепторов в мембранах мозга крысы. Подбор условий разрушения комплекса рецептор—лиганд и внесения антигена на планшету при построении калибровочной кривой для определения количества Bt-SP в пробе, а также оптимизацию количества антител, иммобилизуемых на твердой фазе при иммуноферментном анализе, проводили в модельных системах с использованием радиоактивного производного SP, модифицированного реагентом Болтона — Хантера — $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$ [6].

Разрушение лиганд-рецепторного комплекса осуществляли в кислых условиях. После связывания $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$ с мембранами мозга крысы и удаления избытка несвязавшегося лиганда быстрым центрифугированием

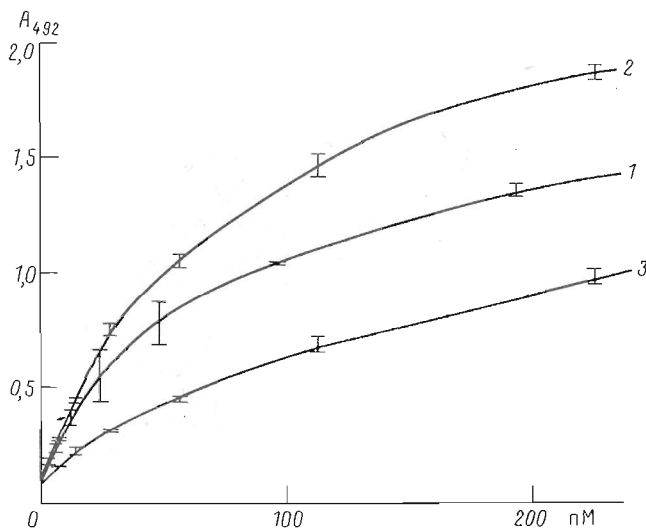


Рис. 2. Калибровочные кривые определения методом иммуноферментного анализа Bt-SP, растворенного в PBS-T (1, 2) и в кислотном экстракте из мембран (3). Количество антител в лунке 0,014 (1) и 0,3 мкг (2, 3). Пересечения кривых с осью ординат отвечают фоновым значениям поглощения, получаемым при использовании в качестве антигена SP (0,2 пмоль в лунке)

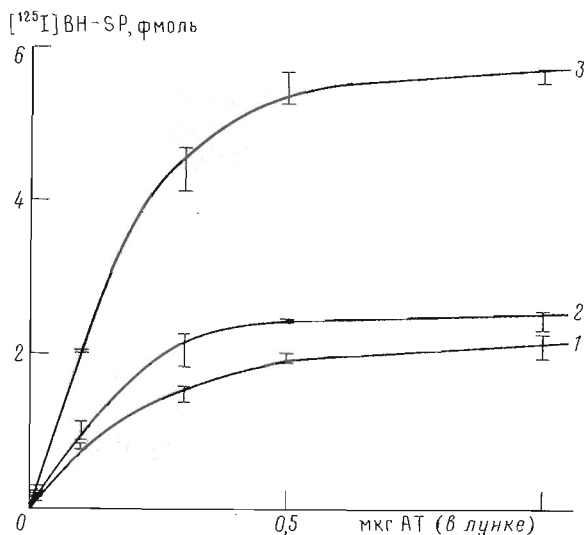


Рис. 3. Концентрационная зависимость связывания $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$ иммобилизованными анти-SP-антителами. Кривые 1, 2 и 3 — добавлено соответственно 2,9, 5,5 и 13,4 фмоль $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$

мембраны подвергали последовательным обработкам 0,05 М уксусной кислотой в течение различного времени и определяли количество высвобождающегося лиганда. Обнаружено, что при первой 10-минутной инкубации в кислых условиях разрушалось около 80% лиганд-рецепторных комплексов. Увеличение времени первой инкубации до 20 мин практически не отражалось на количестве высвобождаемого лиганда. В результате 2-й и 3-й 10-минутных обработок высвобождалось соответственно 15 и 5% радиоактивной метки. Для дальнейшей работы была выбрана однократная

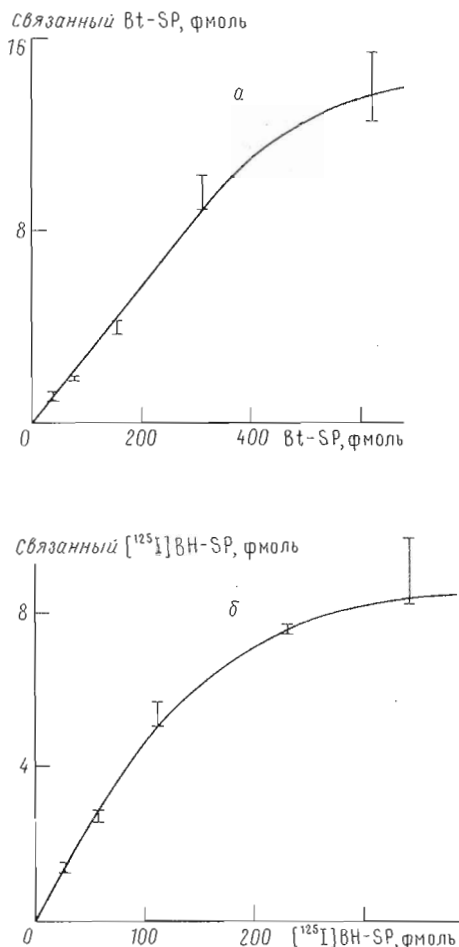


Рис. 4. Специфическое связывание производных SP с мембранами мозга крыс: а — Bt-SP (по результатам иммуноферментного анализа); б — [¹²⁵I]BH-SP (по результатам радиолигандного анализа)

10-минутная обработка мембран 100 мкл 0,05 М уксусной кислоты с последующей быстрой нейтрализацией экстракта. Цель состояла в том, чтобы вымывать лиганд в возможно минимальном объеме, удобном для работы с 96-луночными планшетами, а также избежать длительного пребывания пептида в растворе с низким значением pH.

Как показали модельные опыты, после инкубации Bt-SP в 0,05 М уксусной кислоте и особенно в составе кислотного экстракта из мембран мозга крысы снижалась эффективность взаимодействия этого соединения с антителами (рис. 2, ср. кривые 2 и 3).

Чтобы скомпенсировать упомянутое выше падение эффективности взаимодействия Bt-SP с антителами, был проведен подбор оптимальных количеств антител для иммобилизации на твердой фазе. Для этого к иммобилизованным на планшете антителам добавляли радиоактивно меченный SP в количествах, аналогичных получаемым после разрушения его комплекса с рецептором и соответствующих на кривой специфического связывания (давние радиолигандного анализа) начальному прямолинейному участку, точке перегиба и началу плато — т. е. 2,9, 5,5 и 13,4 фмоль.

(рис. 3). При этом обнаружено, что увеличение количества антител в лунке свыше 0,3 мкг не приводит к существенному увеличению количества взаимодействующего с ними антигена. Это количество и было использовано нами в дальнейшей работе при построении калибровочной кривой (рис. 2, кривая 3), предназначенной для количественного определения рецепторов SP. Ряд экспериментов включал также сравнение эффективности взаимодействия с Bt-SP антител, разделенных по степени аффинности путем ступенчатой элюции с сорбента растворами с разными значениями pH. Некоторые различия между фракциями антител не были столь существенными, чтобы выбрать какую-либо предпочтительную популяцию антител для иммобилизации в планшетах.

После подбора перечисленных условий исследовали связывание Bt-SP с мембранами мозга крысы (рис. 4а), используя калибровочную кривую 3 рис. 2. Аналогично на той же порции мембран в параллельных опытах получены данные по специфическому связыванию [125 I]BH-SP (рис. 4б). Рассчитанные для Bt-SP параметры связывания равны K_d $8,9 \pm 0,9$ нМ, B_{max} 104 ± 31 фмоль/мг белка (результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка, $n=3$), а для [125 I]BH-SP — K_d $1,1 \pm 0,6$ нМ, B_{max} 22 ± 3 фмоль/мг белка.

Полученные для указанных соединений величины K_d так же, как и величина K_i $3,5 \pm 0,2$ нМ, характеризующая конкуренцию Bt-SP с [125 I]BH-SP (см. «Экспериментальную часть»), находятся в пределах одного порядка, тогда как для количества связывающих участков B_{max} наблюдаются более значительные отличия, которые трудно однозначно интерпретировать. С одной стороны, следует иметь в виду достаточно большие (на порядок) расхождения в параметрах связывания, приводимых различными авторами для [125 I]BH-SP [4, 10, 11]. В частности, в нашей лаборатории при анализе связывания [125 I]BH-SP с мембранами мозга крысы методом микрофилтрации на стеклопористых фильтрах GF/F обычно значения K_d и B_{max} составляли 0,7 нМ и 60 фмоль/мг белка соответственно [6]. Другая причина может быть связана с имеющимися в литературе данными о том, что химическая модификация SP и других тахикининов может повлиять на их селективность в отношении тахикининовых рецепторов различных подтипов [12, 13]: более высокие значения K_d и B_{max} для Bt-SP по сравнению с [125 I]BH-SP могут быть обусловлены тем, что Bt-SP наряду с взаимодействием с тахикининовыми рецепторами NK-1-типа (проявляющимся в ингибировании связывания [125 I]BH-SP — специфического лиганда этого рецептора) способен связываться (с меньшим сродством) и с рецепторами других подтипов — например, NK-3-типа, также присутствующими в мозге крысы [12].

Полученные результаты демонстрируют воспроизводимость и надежность предложенного иммунохимического метода и свидетельствуют о том, что он вполне пригоден для детектирования тахикининовых рецепторов в мембранных препаратах. Метод позволяет обнаруживать фемтомольные количества рецепторов в пробе и сравним по чувствительности с радиолигандным анализом. Средний коэффициент изменчивости $[(\sigma/\bar{x}) \cdot 100\%]$ для точек, взятых либо в 4-, либо 6-кратном повторе, равен 7,2% ($n=20$). Для $n=4$ доверительный интервал составил бы $\pm 11,5\%$ от среднего при вероятности 95%. Степень точности метода практически аналогична степени точности иммуноферментного анализа SP, описанного в работе [9]. Представляется также возможной адаптация разработанного высокочувствительного метода определения Bt-SP (десятые доли фемтомоля в пробе) для количественной характеристики эндогенного SP в биологических объектах после трансформации метода в конкурентный вариант.

Экспериментальная часть

В работе использованы: SP (НПО «Вектор»); трис, БСА (фракция 5), бацитрацин, глицин (Serva); $MnCl_2$ (Ferak); PMSF, KLH, полный адъювант Фрейнда (Calbiochem); лейпептин (Peptide Institute Inc., Japan); водорастворимый карбодимид (EDAC) (Bio-Rad); неполный адъювант Фрейнда (Sigma); твин-20 (Fluka); 25% водный раствор глутарового альдегида (Reanal), макропористая целлюлоза (ВНИИ ОЧБ, Ленинград), таблетированный орто-фенилендиамин (2 мг хромогена в таблетке) (центр «Интермед», московский филиал). N-Оксисукцинимидный эфир N'-биотинил-ε-аминокапроновой кислоты предоставлен М. В. Безруковым (ИБХ РАН).

Стрептавидин выделен из концентрата культуральной среды *Streptomyces avidinii* с помощью аффинной хроматографии на иминобиотинсодержащем геле в соответствии с модифицированным методом [14]. Активность стрептавида, оцененная методом спектрофотометрического титрования [15], около 15 ед/мг белка.

Получение [^{125}I]BH-SP описано в работе [6]. Bt-SP получен с использованием N-оксисукцинимидного эфира N'-биотинил-ε-аминокапроновой кислоты в условиях, аналогичных условиям приготовления гидроксифенилпропионильного производного SP (BH-SP) [6]; Bt-SP очищен с помощью ВЭЖХ (колонок Ultrasphere ODS, 4,6×250 мм, Beckman, градиент ацетонитрила 25–60% в 0,1% водном растворе трифторуксусной кислоты за 45 мин). Данные масс-спектрометрии (FAB, ксенон 8 кэВ, глицерин — тиоглицерин, $M+1=1686$) свидетельствуют о включении в молекулу пептида одного остатка N'-биотинил-ε-аминокапроновой кислоты. По результатам N-концевого анализа α-аминогруппа Arg^1 свободна, а ε-аминогруппа (Lys^3) блокирована, т. е. в Bt-SP модифицирован остаток Lys^3 .

Мембраны из мозга крысы выделяли как описано в [6], содержание белка в мембранах определяли по модифицированной методике Лоури [16].

Для синтеза аффинного сорбента с иммобилизованным SP (SP-целлюлозы) использована макропористая целлюлоза. Активация геля осуществлена с помощью эпихлоргидрина [17] с последующим аминированием избытком гексаметилендиамина [18] и обработкой глутаровым альдегидом (равные объемы аминированного производного и 25% водного раствора глутарового альдегида объединяли и инкубировали 18 ч при 37°C, после чего гель тщательно отмывали водой). Иммобилизация SP проведена смешиванием 1 мл активированного глутаровым альдегидом геля в течение 36 ч при 9°C с 2 мг SP в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,2, с последующей обработкой 1 М глицином для блокирования оставшихся активных группировок геля.

Конъюгаты стрептавидин—полимерная пероксидаза, белок-A—полимерная пероксидаза и биотин—полимерная пероксидаза синтезированы из гомополимеров щелочной изоформы пероксидазы хрена со степенью полимеризации 10–20 [19]. Конъюгат стрептавидин—полимерная пероксидаза содержит 80% пероксидазы и 20% стрептавида (по весу), $R_z=1,1-1,2$. В модельных тест-системах анализа такой конъюгат обеспечивал 8–16-кратное увеличение чувствительности детекции по сравнению со стандартным конъюгатом, синтезированным на основе модифицированного периодатного метода [20] и имеющим молярное отношение пероксидаза—стрептавидин (1,5–2)/1,0.

Получение антител и их очистка. 1 мг SP конъюгировали с 2 мг KLH в PBS (8 мМ Na_2HPO_4 , 1,5 мМ KH_2PO_4 , 0,137 М NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4), используя EDAC (2 мг) в качестве активирующего агента. Реакцию вели 18 ч при 4°C, после чего конъюгат (130 мкл) диализовали против PBS

и использовали для иммунизации: на 1 кролика готовили эмульсию из 130 мл конъюгата Sp-KLH, 270 мкл PBS и 400 мкл полного адъюванта Фрейнда вводили животному (по 200 мкл под обе лопатки и в оба бедра) подкожно и внутривенно. Повторную иммунизацию проводили через 40 сут после первой, используя для приготовления эмульсии неполный адъювант Фрейнда.

Через две недели после повторной иммунизации у кроликов из ушной вены отбирали кровь и получали анти-SP-антисыворотку. Затем проводили фракционирование антисыворотки сульфатом аммония и методом ELISA [21] проверяли в иммуноглобулиновой фракции наличие специфических антител к SP, используя в качестве антигена конъюгат пептида с БСА (приготовленный аналогично SP-KLH).

Для выделения *аффинноочищенных антител* 12 мг IgG из сульфат-аммонийной фракции, растворенных в PBS, инкубировали с 1 мл SP-целлюлозы в течение 36 ч при 6°С, после чего отмывали систему последовательно PBS×3 и PBS. Антитела элюировали 0,1 М глициновым буфером сначала с pH 2,9, а затем с pH 2,4. Антитела собирали в коллектор фракций с одновременной подтитровкой элюата 1 М раствором триса до pH 7,2–7,4. Фракции антител хранили при 4°С с 0,1% азидом натрия.

Комплекс рецептор–лиганд получали в идентичных условиях для [¹²⁵I]BH-SP и для Bt-SP. Суспензию мембран (3,5 мг белка/мл) в 50 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,4, содержащем 0,5 мМ MnCl₂, 0,02% БСА, 0,5 мМ PMSF, 0,0004% лейпептина и 0,004% бацитрацина, инкубировали 15 мин при 22°С с необходимыми количествами лигандов в объеме 200 мкл. Реакцию останавливали центрифугированием (Biofuge B, Heraeus sepatech) 11 000 об/мин, 30 с. Осадок дважды промывали 1 мл холодного 50 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,4, содержащего 5 мМ MnCl₂, 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂ и 0,02% БСА. Неспецифическое связывание определяли в присутствии избытка SP (10⁻⁶ М). Количество радиоактивности в осадке определяли с помощью γ-счетчика (CompuGam-ma, Pharmacia).

Анализ конкуренции Bt-SP и [¹²⁵I]BH-SP за связывание с мембранами мозга крысы проводили с использованием постоянной концентрации радиоактивного лиганда (0,2 нМ), варьируя концентрацию Bt-SP в диапазоне 10⁻⁵–10⁻¹² М.

Разрушение рецепторного комплекса осуществляли инкубацией полученного центрифугированием промытого осадка мембран в 100 мкл 0,05 М уксусной кислоты в течение 10 мин при 22°С для [¹²⁵I]BH-SP и Bt-SP. Затем суспензию центрифугировали (11 000 об/мин) и в случае [¹²⁵I]BH-SP измеряли радиоактивность в супернатанте и осадке.

Подбор оптимальных количеств антител для проведения иммуноферментного анализа. По 100 мкл растворов [¹²⁵I]BH-SP (29, 55 и 134 нМ) вносили на 2 ч на планшету с иммобилизованными антителами (0,013, 0,1, 0,3, 0,5 и 1 мкг в лунке). Затем промывали планшету 4 раза PBS, содержащим 0,1% твин-20 (PBS-T), и вносили в каждую лунку по 100 мкл 0,1 М глицинового буфера, pH 2,0. Через 10 мин собирали раствор из каждой лунки в отдельную пробирку и на γ-счетчике измеряли радиоактивность в пробах.

Иммуноферментный анализ Bt-SP проводили в 96-луночных иммунологических планшетах microELISA DYNATECH (flat bottom, immulon), используя для промывания лунок и разведения конъюгатов буфер PBS-T. Аффинноочищенные антитела помещали в лунку (0,3 мкг белка в 100 мкл 0,1 М бикарбонатного буфера, pH 9,0), выдерживали 1 ч при 37°С, затем планшету обрабатывали 30 мин 0,1% раствором БСА в PBS-T и промывали. После этого в лунки вносили антиген в объеме 100 мкл и инкубировали 2 ч при 22°С.

При построении калибровочной кривой к 200 мкл кислотного экстракта из мембран, проинкубированных без SP в условиях связывания (см. методику образования комплекса рецептор—лиганд), добавляли 5 мкл раствора, содержащего 90 фмоль Bt-SP и выдерживали 10 мин. Затем доводили pH экстракта до 7,2—7,4 1 М раствором триса и проводили последовательные 2-кратные разведения антигена, используя для этого каждый раз по 100 мкл нейтрализованного кислотного экстракта.

При определении содержания Bt-SP в 100 мкл опытного образца, полученного после кислотной обработки лиганд-рецепторного комплекса, в лунки с антителами вносили подтитрованные до pH 7,2—7,4 супернатанты. Затем планшету промывали (4 раза по 2 мин), вносили в лунки по 100 мкл раствора конъюгата стрептавидина с полимерной формой пероксидазы хрена (0,5 мкг/мл) в PBS-T, содержащем 0,6% коллоидного казеина, и выдерживали 30 мин при 22°С. Промывали 4 раза и заливали в лунки по 100 мкл раствора субстрата (2 таблетки орто-фенилендиамина, 35 мкл H₂O₂, 10 мл 1% натрий-цитратного буфера, pH 4,5). Через 10 мин в каждую лунку добавляли по 100 мкл 2 н. H₂SO₄. Поглощение измеряли на фотометре Titertek Multiskan Plus MK II при 492 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wilcheck M., Bayer E. A. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 171. № 1. P. 1—32.
2. Lavielle S., Chassaing G., Beaujouan J. C., Torrens Y., Marquet A. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1984. V. 24. № 5. P. 480—487.
3. Hanley M. R., Sandberg B. E., Lee C. M., Iversen L. L., Brundish D. E., Wade R. // *Nature*. 1980. V. 286. № 5785. P. 810—812.
4. Viger A., Beaujouan J. C., Torrens Y., Glowinski J. // *J. Neurochem.* 1983. V. 40. № 4. P. 1030—1039.
5. Nakata Y., Tanaka H., Morishima Y., Segawa T. // *J. Neurochem.* 1988. V. 50. № 2. P. 522—527.
6. Лазаквич Е. М., Мугуле Н. Э., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И. // *Биоорганическая химия*. 1988. Т. 14. № 3. С. 313—317.
7. Ishikawa E. // *J. Immunoassay*. 1983. V. 4. № 3. P. 209—327.
8. Couraud J. I., Frobert Y., Conrath M., Renzi D., Grassi J., Drapeau G., Regoli D., Pradelles P. // *J. Neurochem.* 1987. V. 49. № 6. P. 1708—1719.
9. Stjernschantz J., Gregerson D., Bausher L., Sears M. // *J. Neurochem.* 1982. V. 38. № 5. P. 1323—1328.
10. Tousignant C., Guillemette G., Drapeau G., Telemague S., Dion S., Regoli D. // *Brain Res.* 1990. V. 524. № 2. P. 263—270.
11. Cascieri M. A., Liang T. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. № 8. P. 5158—5164.
12. Bergstrom L., Torrens Y., Saffroy M., Beaujouan J. C., Lavielle S., Chassaing G., Morgat J. L., Glowinski J., Marquet A. // *J. Neurochem.* 1987. V. 48. № 1. P. 125—133.
13. Лазаквич Е. М., Уткин Ю. Н., Мугулис Ф. К., Цетлин В. И., Иванов В. Т. // *Биол. мембраны*. 1988. Т. 5. № 3. С. 233—239.
14. Bayer E. A., Ben-Hur H., Gittlin G., Wilcheck M. // *J. Biochem. and Biophys. Methods*. 1986. V. 13. № 2. P. 103—112.
15. Green N. M. // *Meth. Enzymol.* 1970. V. 18A. P. 418—424.
16. Peterson G. L. // *Anal. Biochem.* 1977. V. 83. № 2. P. 346—356.
17. Matsumoto I., Mizuno Y., Seno N. // *J. Biochem.* 1979. V. 85. № 4. P. 1091—1098.
18. Matsumoto I., Seno N., Golovtchenko-Matsumoto A. M., Osawa T. // *J. Biochem.* 1980. V. 87. № 2. P. 535—540.
19. Плаксин Д. Ю., Громаковская Е. Т. // Авторская заявка № 4703353/13—80448.
20. Tijssen P., Kurstak E. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 136. № 2. P. 451—457.
21. Clark R., Engvall E. // *Enzyme-linked Immunoassay (ELISA). Theoretical and Practical Aspects*. Enzyme-immunoassay/Ed. E. T. Maggio. Woca Raton, Florida, 1981. P. 167—179.

Поступила в редакцию
26.XI.1991
После доработки
12.II.1992

**NEW ENZYME IMMUNOASSAY FOR DETECTION OF SUBSTANCE P
RECEPTORS BASED ON BIOTIN-STREPTAVIDIN SYSTEM**

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy
of Sciences, Moscow;*

**Institute of Microorganism Ecology and Genetics, Ural Division
of Russian Academy of Sciences, Perm*

A novel method for detecting the membrane receptors of Substance P (SP) has been developed. The method does not require radioactive derivatives of SP and is based on quantitation of specifically bound biotinylated SP (Bt-SP), the analysis being performed after destruction of the ligand-receptor complex in acidic conditions and Bt-SP extraction into solution. The acidic extract from the Bt-SP-membrane complex after neutralization is added to immulon microELISA plate coated with affinity purified anti-SP-antibodies. The sensitivity of subsequent detection of Bt-SP enhances by using a new type of the streptavidin conjugate with a polymeric form of horseradish peroxidase.

Enzyme immunoassay conditions were optimized using [125 I]-labelled SP derivative. The developed method allows the determination of femtomoles of SP in a sample and has a sensitivity comparable to that of radioligand analysis.