



УДК 577.332.083.3

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ *Escherichia coli* КАК АНТИГЕНА МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА НЕИЗВЕСТНОЙ РАНЕЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ

© 2000 г. Т. В. Корнеев, Н. Б. Пестов, М. В. Егоров,  
М. В. Иванова, М. Б. Костина, Я. Ридстрем\*, М. И. Шахпаронов#

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\* Департамент биохимии и биофизики, Гетеборгский университет, Гетеборг, Швеция

Поступила в редакцию 28.03.2000 г. Принята к печати 25.04.2000 г.

Проведена иммуноаффинная хроматография мембранных белков *E. coli* для выяснения специфичности моноклонального антитела (ЗАб; получено среди других при иммунизации мышей препаратом никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназы), реагирующего с неизвестным антигеном *E. coli*. В результате выделены белки с кажущимися молекулярными массами 150, 45 и 20 кДа, которые затем были идентифицированы при помощи *N*-концевого секвенирования как субъединицы нитратредуктазы. Этот вывод был подтвержден при помощи иммуноблоттинга белков клеток *E. coli*, выращенных в условиях индукции нитратредуктазы, с антителом ЗАб. Показано, что антитело ЗАб специфически распознает  $\alpha$ -субъединицу нитратредуктазы, и образование комплекса фермент–антитело не приводит к потере каталитической активности фермента.

*Ключевые слова:* иммуноаффинная хроматография; моноклональные антитела; мембрана; никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназа; нитратредуктаза.

### ВВЕДЕНИЕ

При получении как поли-, так и моноклональных антител (МА) для иммунизации и скрининга зачастую используются такие грубые препараты, как целые клетки, фракции мембран и т.п. Однако в таких случаях получаемые МА обладают неизвестной заранее специфичностью. Поскольку нередко такие МА имеют привлекательные свойства (например, проявляют биологическую активность), то оказывается интересным определение истинных антигенов этих МА. Но выполнение такой задачи подчас оказывается технически сложным.

Данная работа является примером успешной идентификации первоначально неизвестного антигена моноклонального антитела при помощи иммуноаффинной хроматографии солюбилизованных клеточных мембран *E. coli* на носителе с иммобилизованным антителом с последующим определением *N*-концевой последовательности связавшихся белков.

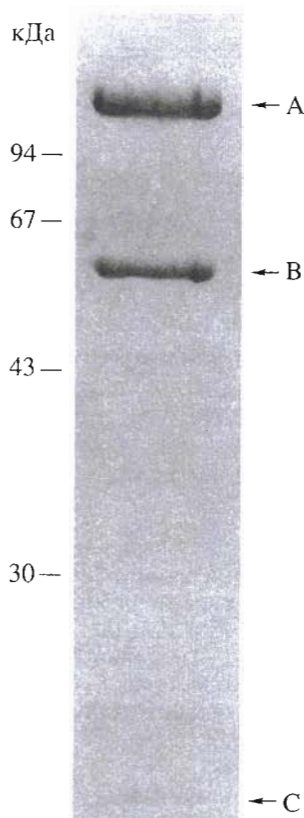
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При использовании в качестве антигена для иммунизации полноразмерной никотинамиднук-

леотидтрансгидрогеназы *E. coli* [1] (КФ 1.6.1.1; далее – трансгидрогеназа), выделенной при помощи традиционного метода ионообменной хроматографии [2], среди прочих был получен гибридный клон ЗАб [1]. Продуцируемые им МА хуже реагировали в ИФА с препаратами трансгидрогеназы высокой степени очистки, а также не распознавали фермент в иммуноблоттинге. Поэтому было сделано предположение, что антигеном МА ЗАб является один из белков, составляющих минорные примеси препарата трансгидрогеназы, использованного для иммунизации и скрининга гибридом. В то же время нельзя было исключить, что МА ЗАб распознает специфический конформационный эпитоп в молекуле нативной трансгидрогеназы.

Чтобы установить, какой из этих двух возможных вариантов является истинным, было решено идентифицировать белки *E. coli*, связывающиеся с МА ЗАб в условиях иммуноаффинной хроматографии. Для этого солюбилизованные белки бактериальных мембран пропускали через аффинную колонку с иммобилизованным МА ЗАб. Электрофореграмма связавшихся и элюированных денатурирующим раствором белков (элюата) показана на рис. 1. На ней видны три основные белковые полосы А, В и С, соответствующие кажущимся *M* 150, 55 и 22 кДа.

# Автор для переписки (факс: (095) 330-64-56; e-mail: shakh@ibch.ru).



**Рис. 1.** Электрофореграмма белков, выделенных иммуноаффинной хроматографией на иммобилизованном МА 3А6.

После выделения этих белков определяли их *N*-концевые аминокислотные последовательности и осуществляли поиск таких белков в базе данных аминокислотных последовательностей. Оказалось, что среди всех белков *E. coli* *N*-концевые последовательности, гомологичные определенным, имеют только субъединицы нитратредукта-

зы (КФ 1.7.99.4). Сравнение полученных и опубликованных ранее *N*-концевых последовательностей и молекулярных масс субъединиц двух изоформ нитратредуктазы *E. coli* [3, 4] показаны в таблице.

Высокая степень соответствия приведенных последовательностей и молекулярных масс элюированных с аффинной колонки белков однозначно указывает на то, что МА 3А6 специфично к нитратредуктазе *E. coli*, но этих данных недостаточно для однозначного вывода о содержании в элюате той или иной изоформы нитратредуктазы (или смеси изоформ).

Для независимого подтверждения вывода о том, что истинным антигеном МА 3А6 является нитратредуктаза, был проведен иммуноблоттинг с МА 3А6 белков *E. coli*, выращенных в условиях репрессии (рис. 2, 1) или активации (рис. 2, 2) *narGHI*-оперона, кодирующего изоформу А [5, 6]. Реакция антитела с полосой, соответствующей белку с кажущейся молекулярной массой 150 кДа, в случае клеток, выращенных в присутствии нитрата и в отсутствие кислорода, по сравнению с клетками, выращенными в аэробных условиях и в отсутствие нитрата, однозначно подтверждает вывод, что МА 3А6 распознает  $\alpha$ -субъединицу изоформы А. В то же время нельзя сделать вывод, способно ли МА реагировать также и с изоформой Z или оно абсолютно специфично к изоформе А.

Бактериальная нитратредуктаза является терминальной оксидазой электронтранспортной цепи, ответственной за транспорт электронов от хинонов на нитрат во время анаэробного роста бактерий [3–7]. Фермент состоит из двух цитозольных субъединиц  $\alpha$  и  $\beta$  и одной трансмембранной субъединицы  $\gamma$ , также известной как цитохром *b* [7]. Субъединицы изоформы А нитратредуктазы *E. coli* кодируются генами *narg* ( $\alpha$ ), *narh* ( $\beta$ )

Идентификация белков, выделенных иммуноаффинной хроматографией на иммобилизованном МА 3А6

Полоса (рис. 1)	Выделенные белки		Нитратредуктаза <i>E. coli</i> [3–6]		
	$M_r^*$	определенная <i>N</i> -концевая последовательность	истинная <i>N</i> -концевая последовательность субъединиц	истинная мол. масса**	субъединица, ген, изоформа
A	150	<b>SXFLD</b>	<b>SKFLD</b> <b>SKLLD</b>	140.4 140.1	$\alpha$ , <i>narg</i> , A $\alpha$ , <i>narz</i> , Z
B	55	<b>MXIXSQ</b>	<b>MKIRSQ</b> <b>MKIRSQ</b>	58.1 58.6	$\beta$ , <i>narh</i> , A $\beta$ , <i>nary</i> , Z
C	22	<b>MQQMY II P</b>	<b>MQFLN</b> <b>MIQYL</b>	25.5 26.0	$\gamma$ , <i>nari</i> , A $\gamma$ , <i>narv</i> , Z

\* По данным электрофореза.

\*\* Рассчитанная из выведенной аминокислотной последовательности.

Жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки, идентичные как в полученных, так и в выведенных из ДНК последовательностях.

и *nari* ( $\gamma$ ), входящими в *narGHI*-оперон, а субъединицы изоформы Z – генами *narz*, *nary* и *narv*, соответственно [3–6].

МА 3А6 может быть успешно использовано для детекции и очистки нитратредуктазы. Поэтому мы предприняли несколько экспериментов по изучению свойств этого МА. Оказалось, что МА 3А6 не ингибирует нитратредуктазу при инкубации его с мембранами *E. coli*. Кроме того, активность фермента была детектирована в препарате, содержащем нитратредуктазу, связанную с МА 3А6, иммобилизованном на сорбенте (эксперимент не представлен). Такие результаты указывают на то, что МА 3А6 распознает эпитоп как в денатурированной, в иммуноблоттинге, так и в нативной  $\alpha$ -субъединице нитратредуктазы А *E. coli*, причем связывание не влияет на активность фермента.

МА 3А6 было получено при иммунизации препаратами трансгидрогеназы *E. coli*. Наиболее вероятно, что это обусловлено недостаточной очисткой трансгидрогеназы традиционным методом ионообменной хроматографии [2], поскольку при использовании в качестве антигена аффинноочищенной трансгидрогеназы были получены антитела исключительно к ней [1]. В качестве альтернативного объяснения можно предположить, что эти два фермента могут быть ассоциированы в нативной клеточной мембране и частично оставаться в таком состоянии при недостаточно жестких условиях хроматографической очистки. Однако подтверждение данной гипотезы требует обширных дополнительных исследований.

Идентификация неизвестных антигенов МА при помощи иммуноаффинной хроматографии и определения их частичной аминокислотной последовательности успешно использовалась и ранее [8]. Нужно отметить, что привлекательность такого подхода сильно увеличивается при работе с организмами, для которых определен полный геном, когда все аминокислотные последовательности белков данного организма уже известны. Кроме того, такой подход может быть полезен и для идентификации белков, последовательности (а также свойства и функции) которых еще не установлены.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали холат и дезоксихолат натрия (Sigma, США), мембрану PVDF (Bio-Rad, США), мочевины (марки “для секвенирования ДНК”) непосредственно перед использованием деионизировали.

**Моноклональное антитело 3А6** [1] получили при иммунизации мышей трансгидрогеназой, выделенной при помощи ионообменной хроматографии [2], по описанной ранее схеме [9]. МА

1 2



**Рис. 2.** Иммуноблоттинг белков клеток *E. coli*, выращенных в разных условиях, с использованием МА 3А6. 1 – клетки, выращенные в обычных условиях (в присутствии кислорода и в отсутствие нитрата); 2 – клетки, выращенные в анаэробных условиях в присутствии нитрата.

нарабатывали в асцитах мышей и очищали высаливанием сульфатом аммония с последующей аффинной хроматографией на модифицированном протеине G (“Gamma Bind Plus Sepharose”, Pharmacia, Швеция) по протоколу, рекомендуемому производителем. Очищенное МА 3А6 диализовали против боратного буфера и иммобилизовали на активированной сефарозе 4В (Pharmacia, Швеция).

**Иммуноаффинная хроматография.** Клетки *E. coli* TG-1 выращивали в среде “terrific broth” [10] в течение ночи при 37°C, осаждали центрифугированием и хранили при –70°C. Для приготовления клеточных мембран использовали ранее описанную процедуру [11] с модификациями. Осадок клеток ресуспендировали в буфере TE (50 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 1 мМ Na-EDTA), добавляли дитиотреит до 2 мМ и разрушали клетки при помощи пресса Френча. Лизат центрифугировали при 10000g 20 мин, и затем из супернатанта осаждали мембраны в роторе Ti-70 в течение 50 мин при 35000 об/мин. Мембраны ресуспендировали в буфере TE и добавляли равный объем буфера А (2 М КСl, 50 мМ холат натрия, 50 мМ дезоксихолат натрия), инкубировали на льду 30 мин и центрифугировали в роторе Ti-70 1 ч при 45000 об/мин. Супернатант разбавляли 1 : 6 буфером Б (25 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 150 мМ NaCl, 200 мМ КСl, 2 г/л бридж-35, 5 мМ дезоксихолат натрия, 5 мМ холат натрия) и пропускали через колонку с иммобилизованным антителом 3А6. Колонку промывали в течение ночи буфером Б и связанные белки элюировали буфером Б с 4 М мочевиной.

**Электрофорез** белков в ПААГ проводили по методу Леммли [12]. Элюированный белок высаживали добавлением 0.15 мл 72% трихлоруксусной кислоты на 1 мл элюата с последующим центрифугированием и промывкой осадка ацетоном.

Осадок высушивали на воздухе и растворяли в буфере для нанесения образца [12] в ультразвуковой бане в течение 30 мин.

**Идентификация выделенных белков.** Белки, разделенные электрофорезом, переносили на мембрану PVDF, которую обрабатывали как описано ранее [13], и определяли *N*-концевую аминокислотную последовательность на газофазном секвенаторе, модель 470 А (Applied Biosystems, США). Соотнесение полученных последовательностей с последовательностями известных белков *E. coli* осуществляли при помощи программы "TagIdent" (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>).

**Индукция нитратредуктазы и измерение ее активности.** Клетки TG-1 выращивали в среде LB. Для индукции *narGHI*-оперона [5, 6] в среду добавляли 1 г/л нитрата натрия и молибдат натрия до 1 мкМ. Для создания анаэробных условий среду продували азотом и создавали на поверхности слой вазелинового масла. Активность нитратредуктазы (КФ 1.7.99.4) измеряли как описано ранее [14] с использованием в качестве субстрата метилвиологена, восстановленного дитионитом.

Авторы выражают признательность Ю.Ф. Леоновой за определение *N*-концевой последовательности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 99-04-48006), INTAS (грант № 96-1633) и Шведского совета по естественным наукам.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Egorov M.V., Korneenko T.V., Pestov N.B., Ivanova M.V., Shakhparonov M.I., Rydström J. // 10th European Bioenergetics Conference, June 1998, Göteborg, Sweden. EBEC Reports. V. 10. P. 61.
2. Hu X., Zhang J.W., Persson A., Rydström J. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1229. P. 64–72.
3. Blasco F., Iobbi C., Giordano G., Chippaux M., Bonnefoy V. // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 218. P. 249–256.
4. Blasco F., Iobbi C., Ratouchniak J., Bonnefoy V., Chippaux M. // Mol. Gen. Genet. 1990. V. 222. P. 104–111.
5. Chippaux M., Bonnefoy-Orth V., Ratouchniak J., Pascal M.C. // Mol. Gen. Genet. 1981. V. 182. P. 477–479.
6. Iobbi C., Santini C.L., Bonnefoy V., Giordano G. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 168. P. 451–459.
7. Bonnefoy V., Demoss J.A. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1994. V. 66. P. 47–56.
8. Altevogt P., Heckl-Oestreicher G., Lang E., Kohl U., Kratzin H., Schirrmacher V. // Eur. J. Immunol. 1988. V. 18. P. 677–683.
9. Bizouarn T., Fjellström O., Axelsson M., Korneenko T.V., Pestov N.B., Ivanova M.V., Egorov M.V., Shakhparonov M.I., Rydström J. // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 3282–3288.
10. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
11. Clarke D.M., Bragg P.D. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 149. P. 517–523.
12. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
13. Корнеенко Т.В., Пестов Н.Б., Егоров М.В., Иванова М.В., Костина М.Б., Шахпаронов М.И. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 800–804.
14. Lowe R., Evans H. // Biochim. Biophys. Acta. 1964. V. 85. P. 377.

## The Identification of Nitrate Reductase from *Escherichia coli* as the Antigen for a Monoclonal Antibody of Unknown Specificity

T. V. Korneenko\*, N. B. Pestov\*, M. V. Egorov\*, M. V. Ivanova\*,  
M. B. Kostina\*, J. Rydström\*\*, and M. I. Shakhparonov\*\*

\* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

\*\* Department of Biochemistry and Biophysics, Göteborg University and Chalmers University of Technology,  
Box 462, 405 30 Göteborg, Sweden

The immunoaffinity chromatography of total membrane proteins from *Escherichia coli* helped determine the specificity of the monoclonal antibody 3A6 that was obtained upon immunization of mice with nicotinamide nucleotide transhydrogenase preparations and reacted with an unknown *E. coli* antigen. Proteins with apparent molecular masses of 150, 45, and 20 kDa were isolated and identified by *N*-terminal sequencing as the subunits of nitrate reductase. This conclusion was confirmed by immunoblotting with the 3A6 antibody of the proteins from the *E. coli* cells grown upon induction of nitrate reductase. It was shown that the 3A6 antibody specifically recognizes the  $\alpha$  subunit of nitrate reductase, and the formation of the enzyme–antibody complex does not result in a loss of the enzyme catalytic activity.

*Key words:* immunoaffinity chromatography, monoclonal antibodies, membrane, nicotinamide nucleotide transhydrogenase, nitrate reductase

# To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 330-6456; e-mail: shakh@ibch.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.