



УДК 577.217.53.083.3

ПРИМЕНЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОЧИСТКИ  
ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ G ИЗ *THERMUS THERMOPHILUS*Лисиц Н. М., Ворожейкина Д. П., Матвиенко Н. И.,  
Манцыгин Ю. А.\* , Святухина Н. В.\*

Институт белка Академии наук СССР, Пущино Московской обл.;

\* Институт биологической физики Академии наук СССР,  
Пущино Московской обл.

Получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к фактору элонгации трансляции G из термофильной бактерии *Thermus thermophilus*. Антитела были иммобилизованы на CNBr-активированной сефарозе и полученный иммуносорбент использовался для быстрой препаративной очистки G-фактора. Белок, элюируемый с иммуносорбента, не терял ферментативной активности и характеризовался высокой чистотой. Методом электрооблоттинга показано, что примеси меньшей молекулярной массы, присутствовавшие в следовых количествах в препаратах, очищенных на иммуносорбенте, являются продуктами деградации G-фактора.

Фактор элонгации G — важный компонент белоксинтезирующего аппарата прокариот. В последние годы повышенный интерес вызывает G-фактор из термофильной бактерии *Thermus thermophilus*, поскольку он обладает весьма высокой устойчивостью к денатурирующим воздействиям, что обуславливает возможность исследования его многими физико-химическими методами [1].

G-Фактор является мономерным белком с молекулярной массой ~80 000. Получение высокоочищенных препаратов G-фактора трудоемко и включает в себя большое число стадий с низким выходом конечного продукта [1, 2]. Мы приготовили иммуносорбент с моноклональными антителами к G-фактору из *Th. thermophilus*, что позволило резко сократить трудоемкость очистки фактора.

Иммуноаффинная хроматография довольно широко применялась для очистки белков в 70-е годы [3]. Однако преимущества этого метода могли быть реализованы полностью только с разработкой техники получения моноклональных антител. Моноклональные антитела, продуцируемые гибридомой, специфичны к одной антигенной детерминанте белка, что значительно повышает избирательность взаимодействия. Они характеризуются строго определенной для антител данного клона константой связывания с антигеном, что облегчает подбор условий десорбции без необратимой денатурации белка и увеличивает полноту элюции. Молекулярная гомогенность моноклональных антител означает, что все молекулы способны в равной мере взаимодействовать с антигеном, в то время как в популяции обычных (полученных из иммунной сыворотки) антител лишь не более 10% всех молекул связывает данный антиген. В соответствии с этим специфическая емкость иммуносорбента с моноклональными антителами должна быть значительно выше. Наконец, синтез моноклональных антител при наличии гибридомы не связан с затратой антигена, и они легко могут быть получены в граммовых количествах в лабораторных условиях.

Начиная с 1980 г. [4], когда было описано успешное применение иммобилизованных моноклональных антител для очистки интерферона человека, в литературе появился ряд сообщений об использовании метода для

Принятые сокращения: IgG — иммуноглобулин класса G; SDS — додецилсульфат натрия.

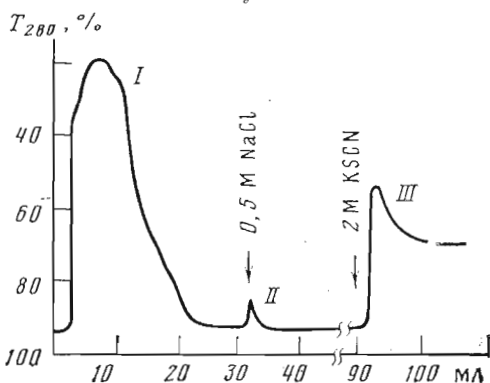


Рис. 1. Очистка G-фактора из *Th. thermophilus* на колонке с моноклональными антителами.  $T$  — оптическое пропускание раствора. Подъем базовой линии обусловлен сильным поглощением KSCN. I — несвязавшийся материал, II — фракция, смываемая 0,5 М NaCl, III — G-фактор

выделения других сывороточных белков [5, 6]. Более широкое применение иммуноаффинной хроматографии сдерживается необходимостью использования жестких условий десорбции, неприемлемых для лабильных белков.

Мы получили ряд гибридных клонов, продуцирующих антитела, специфичные к G-фактору *Th. thermophilus*. Дальнейшая работа проводилась с одним клоном, давшим максимальный положительный ответ при тестировании специфических антител. Антитела принадлежали к классу IgG по данным гель-фильтрации, электрофореза и электронной микроскопии.

Препаративные количества антител нарабатывались *in vivo* в асцитной опухоли у мышей, вызванной инъекцией гибридных клеток. Очищенные ионообменной хроматографией антитела использовались для получения иммуносорбента.

Типичная картина иммуноаффинной хроматографии препарата, содержащего G-фактор, показана на рис. 1. После нанесения препарата колонка промывалась до удаления несвязавшегося материала, затем направление протока меняли на обратное и продолжали промывку 0,5 М NaCl для удаления неспецифически сорбированного белка. Элюцию осуществляли также в обратном направлении обычно при высоких концентрациях KSCN и нейтральном pH.

Полученный нами иммуносорбент связывал ~4 мг G-фактора на 10 мг иммобилизованных антител. Эта величина соответствует лишь ~10% от теоретически возможной емкости (учитывая, что одна молекула IgG с молекулярной массой ~150 000 способна связывать две молекулы G-фактора), однако согласуется с данными, имеющимися в литературе для иммуносорбента к фактору комплемента C3b [5]. Возможно, что значительное снижение связывающей способности антител вызвано стерическими ограничениями для иммобилизованных молекул внутри сетки геля и/или частичной денатурацией антител при их иммобилизации. Однако даже такая сравнительно невысокая емкость сорбента позволяла нам получать ~12 мг очищенного G-фактора за один цикл, что не достигалось другими методами.

Определение GTP-азной активности в присутствии рибосом по методу [7] показало, что элюируемый белок характеризовался высокой удельной активностью (высвобождение более 800 пмоль фосфора за 10 мин при 37°С в присутствии рибосом против 16,5 пмоль без рибосом).

Было показано, что чистота белка, элюированного с иммуносорбента, зависит от качества исходного препарата. Обычно элюируемый G-фактор содержал следовые количества примесей меньшей молекулярной массы, детектируемые SDS-электрофорезом только при большой перегрузке (рис. 2). Эти примеси не удалялись повторной хроматографией, что свидетельствует о родстве к иммуносорбенту.

Для выяснения природы примесей мы применили метод электроблоттинга [8] с последующим дискриминированием электрофоретических полос при помощи иммуоферментного метода (рис. 3). Сопоставление рис. 2 и 3 позволяет отметить, что в области, где присутствуют минорные

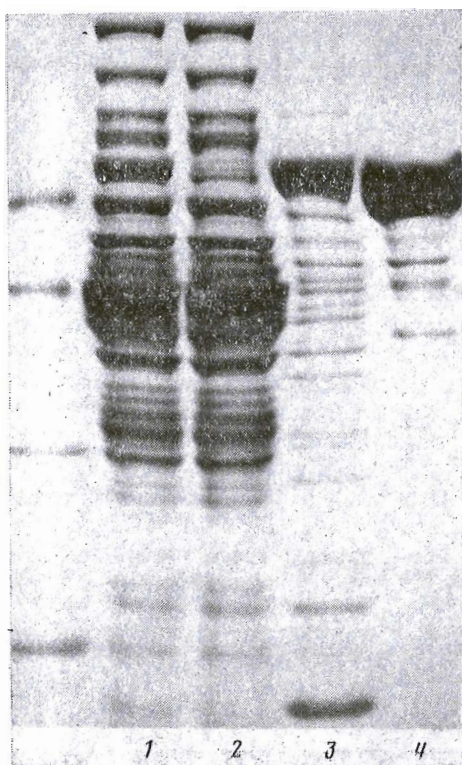


Рис. 2

Рис. 2. SDS-электрофорез фракций после очистки G-фактора на иммуносорбенте (фр. I—III рис. 1): 1 — исходный препарат, 2 — пик I, 3 — пик II (нанесено в избытке для выявления примесей), 4 — G-фактор, пик III. Слева — маркеры (в скобках — молекулярная масса), сверху вниз: бычий сывороточный альбумин (67 000), овальбумин (43 000), химотрипсиноген А (25 000), рибонуклеаза (13 700)

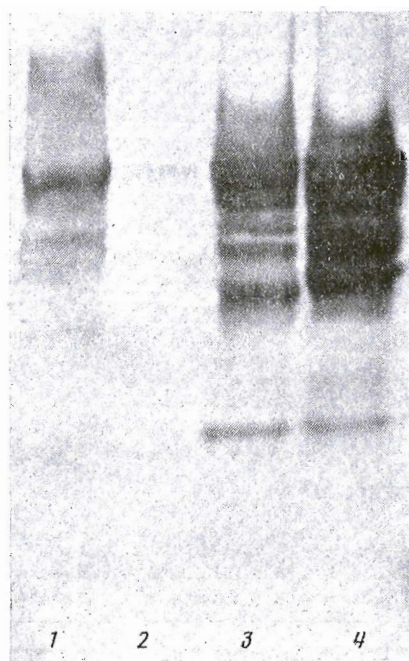


Рис. 3

Рис. 3. Электроблоттинг фракций I—III рис. 1. Обозначения как на рис. 2. Белковые полосы, перенесенные на нитроцеллюлозу, дискриминировались иммуноферментным методом для обнаружения материала, имеющего антигенную природу G-фактора

полосы на электрофореграмме очищенного G-фактора, наблюдается интенсивное связывание моноклональных антител. Таким образом, присутствующие в препарате примеси являются продуктами протеолитической деградации G-фактора и, следовательно, задача получения более чистого белка сводится к уменьшению естественного протеолиза. В то же время в большинстве случаев наблюдавшийся уровень примеси фрагментированного белка допустим.

Существенно, что картина иммуноферментного окрашивания для фракции, удаляемой с иммуносорбента 0,5 М NaCl, практически идентична таковой для элюированного G-фактора, в то время как на исходной электрофореграмме, окрашенной кумасси G-250, наблюдается много полос, соответствующих полипептидам с молекулярными массами как меньшими, так и большими 80 000. Это подтверждает оправданность промежуточной отмывки, удаляющей с колонки неспецифически сорбированные белки. Для фракции, не связавшейся с иммуносорбентом, практически не обнаруживается взаимодействие с моноклональными антителами, что свидетельствует о полноте извлечения G-фактора из раствора.

Имуносорбент использовался более 15 раз без снижения связывающей способности и мог храниться длительное время при 4° С в присутствии 0,02% азида натрия для предотвращения роста микроорганизмов. Таким образом, приготовленный нами иммуносорбент является эффективным средством очистки G-фактора из *Th. thermophilus* и может использоваться для крупномасштабного получения активного и высокочистого G-фактора.

## Экспериментальная часть

*Получение гибридом.* Мыши линии BALB/c были иммунизированы G-фактором из *Th. thermophilus*. После повторной иммунизации сыворотки мышей тестировались на присутствие специфических антител иммуноферментным методом (ELISA). Использовали два варианта метода: с сорбцией антигена на ячейках стандартных титровальных плат [9] или на кусочках нитроцеллюлозного фильтра («dot»-метод) [10]. Конъюгаты пероксидазы хрена с кроличьими антителами, специфичные к антителам мыши, необходимые для иммуноферментного определения, были получены по методу [11].

Клетки селезенки мыши, давшей максимальный иммунный ответ (положительное определение антител к G-фактору при разведении сыворотки 1 : 500 000, по данным «dot»-метода), были взяты для слияния с миеломными клетками Sp2/O-Ag14 [12]. Смешанные клоны, выросшие на селективной среде HAT [13], тестировались на присутствие в культуральной жидкости антител к G-фактору. Дальнейшее клонирование проводили методом редкого рассева с использованием перитонеальных макрофагов мышей в качестве питающего слоя [14]. Клонировали и размножали гибридомы в среде DMEM (Gibco, Англия) с добавлением 5% свиной сыворотки. (Ранее нами было показано, что свиная сыворотка по ростовым свойствам превосходит эмбриональную телячью сыворотку, обычно используемую для культивирования гибридом [15].) Полученные клоны хранились замороженными в жидком азоте.

*Наработка моноклональных антител.* Для индукции образования асцитной опухоли мышам линии BALB/c вводили по  $10^7$  клеток гибридомы в присутствии полного адьюванта Фрейнда (Calbiochem, США) внутривентриально. Через 8–14 сут (по мере развития опухолей) мышей забивали и отбирали асцитную жидкость, которую замораживали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . После осаждения иммуноглобулиновой фракции асцита при 50%-ном насыщении сульфатом аммония до 50% моноклональные антитела очищали ионообменной хроматографией на DEAE-Тойоперле (Toyo Soda, Япония) [14].

*Приготовление иммуносорбента.* Антитела иммобилизовали на CNBr-активированной сефарозе 4B (Pharmacia, Швеция) по стандартной методике [3] из расчета 5 мг антител на 1 мл геля. Для предварительных опытов использовали колонку, содержащую ~2 мл сорбента. Впоследствии было приготовлено 25 мл сорбента со связывающей способностью ~12 мг G-фактора.

*Иммуноаффинная хроматография.* Образец наносили при скорости потока 5 см/ч в буфере, содержащем 25 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0,02% NaN<sub>3</sub>, pH 7,5. Использовали как грубый экстракт (после осаждения рибосом), так и более обогащенные препараты. Колонку промывали буфером до удаления несвязавшегося материала, меняли направление потока на обратное и продолжали промывку раствором 0,5 М NaCl в буфере А. Элюцию проводили раствором хаотропной соли KSCN также при обратном направлении потока. Элюированный белок концентрировали диализом против полиэтиленгликоля или сразу обессоливали на колонках PDIO (Pharmacia, Швеция).

*Анализ препаратов G-фактора.* Чистоту препаратов анализировали методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле с градиентом концентрации 4–30% [16]. Природу детектируемых электрофорезом примесей в препаратах G-фактора, а также полноту извлечения его из исходного материала определяли методом электроблоттинга [8] с последующим «проявлением» перенесенных на нитроцеллюлозу белковых полос иммуноферментным методом. Гель с образцами, разделенными SDS-электрофорезом, помещали в ячейку аппарата Trans Blot Cell (Bio-Rad, США) вместе с приложенной к нему нитроцеллюлозной мембраной (0,17 мкм, Synrog, Чехословакия). После проведения электрофореза в поперечном направлении нитроцеллюлозу с иммобилизованными на ней белковыми полосами инкубировали в растворе моноклональных антител к G-фактору.

Далее обработку проводили как в работе [10]. Использовали антитела кролика против антител мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена. Специфическое окрашивание проводили с помощью 4-хлоро-1-нафтола (Merck, ФРГ).

Авторы выражают благодарность М. Б. Гарбер за постоянный интерес к работе, весьма ценные рекомендации и замечания, а также за любезно предоставленные препараты G-фактора, необходимые для проведения работы, С. К. Смайлову за помощь в определении активности G-фактора и С. Н. Рязанцеву за электронную микроскопию моноклональных антител.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гарбер М. Б., Решетникова Л. С. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1572–1574.
2. Aray K., Ota Y., Aray N., Nakamura S., Henneke C., Oshima T., Kaziro Y. Eur. J. Biochem., 1978, v. 92, № 2, p. 509–520.
3. Affinity chromatography (principles and methods). Pharmacia Fine Chemicals. Örebro, Sweden: Ljungföretagen AB, 1979, p. 112.
4. Secher D. S., Burke D. C. Nature, 1980, v. 285, № 12, p. 446–450.
5. Hsiung L., Barelay A. N., Brandon M. R., Sim E., Porter R. R. Biochem. J., 1982, v. 203, p. 293–298.
6. Monoi M., Kennel R. H., Click M. C. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 24, p. 11914–11921.
7. Kaziro Y., Inoue-Yokosawa N., Kawakita M. J. Biochem. (Tokyo), 1972, v. 72, № 4, p. 853–863.
8. Burnette W. N. Anal. Biochem., 1981, v. 112, p. 195–203.
9. Schuur A. H., Van Weeman B. K. Clin. chim. acta, 1977, v. 81, p. 1–10.
10. Hawkes R., Niday E., Gordon J. Anal. Biochem., 1982, v. 119, p. 142–147.
11. Wilson M. B., Nakane P. K. In: Immunofluorescence and related staining techniques / Eds Knapp W., Holubar K., Wick G. Elsevier: North-Holland Biomedical Press, 1978, p. 215–224.
12. Schulman M., Wilde C. D., Köhler G. Nature, 1978, v. 276, p. 269–270.
13. Littlefield J. W. Science, 1964, v. 145, p. 709–710.
14. Gooding J. W. J. Immunol. Meth., 1980, v. 39, p. 285–308.
15. Манцыгин Ю. А., Святухина Н. В., Повуалоне С. А. Цитология, 1983, т. XXV, № 10, с. 1197–1201.
16. Polyacrylamide gel electrophoresis (laboratory techniques). Pharmacia Fine Chemicals, Sweden. Rahms i Lund, 1983, p. 72.

Поступила в редакцию  
30.VIII.1984

#### USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR PURIFICATION OF ELONGATION [FACTOR G FROM *THERMUS THERMOPHILUS*

LISSIN N. M., VOROZHEIKINA D. P., MATVIENKO N. I.,  
MANTZYGHIN Yu. A.\*, SVYATUKHINA N. V.\*

*Institute of Protein Research and\* Institute of Biological  
Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

Monoclonal antibodies were obtained to the polypeptide chain elongation factor G from the extreme thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. Antibody from ascitic fluid was purified and coupled to CNBr-activated Sepharose 4B. The affinity sorbent was used for facile preparative isolation of G factor. The product thus obtained preserved the enzymatic activity and showed a high degree of purity. A trace amount of impurities in the preparations was a degraded G factor, as established by Western blotting in conjunction with the ELISA technique.