



УДК 577.112.088.1

© 1991 г.

*Г. В. Гололобов, А. М. Шустер\*, И. К. Залите\*,  
А. Г. Габитов, А. Г. Рабинков*

### СИНТЕЗ И ВЫДЕЛЕНИЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ОЛИГОМЕРНЫХ КОНЪЮГАТОВ АВИДИН—ПЕРОКСИДАЗА

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва;  
\* НПО «Биолар» АН СССР, Рига*

Предложен метод синтеза и очистки с помощью ВЭЖХ высокочувствительных олигомерных конъюгатов авидин—пероксидаза для целей микродетекции. Установлено, что в ходе синтеза образуются олигомеры различного стехиометрического состава. Проведена очистка высокоактивных олигомеров авидин—пероксидаза, основанная на применении высокоэффективной гидрофобной жидкостной хроматографии, и показано, что наибольшей чувствительностью обладают олигомеры молекулярной массы 150 и 220 кДа, в которых на одну молекулу авидина приходится 2 и 4 молекулы пероксидазы соответственно.

Авидин-биотиновая система получила широкое распространение как надежный и чувствительный способ неізотопной детекции микроколичеств биополимеров [1, 2]. Различают два основных способа формирования авидин-биотиновых агрегатов: 1) биотинилированная макромолекула — авидин — биотинилированный фермент; 2) биотинилированная макромолекула — конъюгат авидин—фермент.

Во многих случаях второй способ с использованием белкового конъюгата позволяет добиться большей воспроизводимости и чувствительности [3]. Одним из наиболее распространенных ферментов, используемых в этой системе, является пероксидаза. Приготовить конъюгат Av — HRP можно, используя различные способы модификации функциональных групп белков [4]. Простым и дешевым способом получения конъюгата Av—HRP является, например, образование Шиффа между альдегидными группами окисленного периодата углеродного компонента пероксидазы и аминогруппами авидина [5, 6]. В результате реакции образуются комплексы различного стехиометрического состава. Высокомолекулярные комплексы обладают высокой неспецифической сорбцией, что приводит к увеличению фона и снижению чувствительности детекции при использовании этого проявляющего агента. Синтез конъюгатов с помощью гетерофункциональных реагентов позволяет обеспечить стехиометрическое связывание авидина с ферментом и относительно высокий выход активного продукта [7]. К недостаткам этой процедуры следует отнести большую трудоемкость по сравнению с периодатным методом и относительно большую стоимость используемых реагентов. Представляется целесообразным усовершенствовать периодатный метод получения конъюгатов авидин—фермент с целью выделения высокоактивных олигомерных форм, способных обеспечить в качестве проявляющего агента высокую чувствительность при минимальной неспецифической сорбции. Этой задаче и посвящено настоящее исследование. В качестве модельного объекта для микродетекции выбран b-BSA.

Использованные сокращения: HRP — пероксидаза хрена, Av — авидин, BSA — бычий сывороточный альбумин, b-BSA — биотинилированный бычий сывороточный альбумин, ABTS — 2,2'-азино-ди(3-этилбензтиазолин-6-сульфокислота), НАВА — 2-(4-гидроксibenзоазо)бензойная кислота.

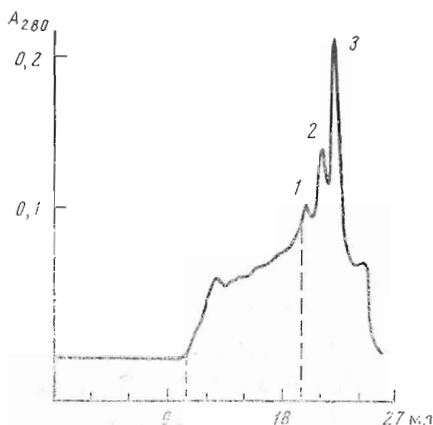


Рис. 1. Гель-фильтрация конъюгатов  $A_v$ -HRP после восстановления  $NaBH_4$ . Колонка TSK G4000Sw. Элюент — 0,1 М NaOAc (pH 5,0), 0,2 М NaCl. Скорость потока 0,3 мл/мин. В объеме элюции 11–20 мл — полимерные фракции с молекулярными массами  $2 \cdot 10^6$ – $3 \cdot 10^5$  Да. 1 —  $A_v$ -HRP<sub>1</sub>,  $M$  220 кДа; 2 —  $A_v$ -HRP<sub>2</sub>,  $M$  150 кДа; 3 — HRP и  $A_v$ ,  $M$  40 и 68 кДа соответственно

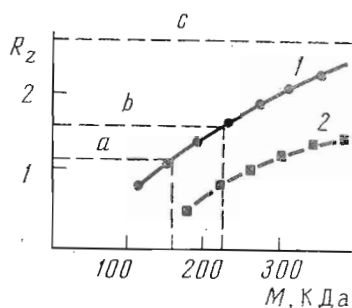


Рис. 2. Теоретические кривые значений  $R_z$  в зависимости от молекулярных масс олигомеров состава  $A_v$ -HRP<sub>k</sub> (1) и  $A_v$ -HRP<sub>k</sub> (2). Штриховые линии «а» и «б» показывают соотносимость олигомерных фракций  $R_z$  1,17,  $M$  150 кДа и  $R_z$  1,6,  $M$  220 кДа с теоретической кривой для конъюгатов  $A_v$ -HRP<sub>k</sub> (см. «Экспер. часть»)

Окисленная пероксидаза легко взаимодействует с авидином. Как видно из профиля элюции при гель-фильтрации (рис. 1), полученный препарат  $A_v$ -HRP<sub>1</sub> содержит смесь различных продуктов, причем большую часть составляют полимерные формы с молекулярными массами  $(0,3$ – $2) \cdot 10^6$  Да, затем следуют активные олигомерные фракции (пики 1 и 2, рис. 1). Последней выходит смесь непрореагировавших авидина и пероксидазы.

Как видно из рис. 1, даже при высоком разрешении с использованием метода ВЭЖХ довольно сложно разделить наиболее чувствительные олигомерные формы конъюгатов  $A_v$ -HRP, неактивные полимеры и исходные непрореагировавшие белки. Полимерные формы, обладая слабой активностью, резко повышают фон вследствие неспецифической сорбции при последующей детекции, а непрореагировавший авидин конкурирует с конъюгатом за связывание с биотинилированным биополимером. Таким образом, использование для детекции микроколичеств биополимера неочищенного препарата конъюгата  $A_v$ -HRP требует внесения большего, чем необходимо, количества вещества по белку, что увеличивает фон и не позволяет добиться оптимальных значений чувствительности. Олигомерные формы конъюгата, содержащиеся в пиках 1 и 2 рис. 1, обладают молекулярными массами 220 и 150 кДа соответственно.

При изучении факторов, влияющих на выход высокоактивных олигомерных форм в ходе синтеза конъюгата, было обнаружено, что процесс образования олигомерных форм рН-зависим. Так, при рН 8,5 наблюдается минимальное образование полимерных фракций. При этом выход активного конъюгата не превышает 10% (в основном форма с  $M$  150 кДа). При рН 9,0 до 20% конъюгата представлено полимерными формами, а фракция активных олигомеров составляет 20–30% (соотношение конъюгатов с  $M$  150 и 220 кДа равно 2:1). При 9,5 содержание полимерных фракций возрастает до 40–50%, а выход активного конъюгата — до 30% (соотношение конъюгатов с  $M$  150 и 220 кДа составляет 1:1). Увеличение ионной силы буфера приводит к снижению образования полимерных форм. Оптимальным в наших условиях являлся 0,1–0,2 М натрий-бикарбонатный буфер, рН 9,0: выход полимеров составил не более 10%. На концентрацию активных олигомеров ионная сила буфера оказывала незначительное влияние.

Для установления структуры активных олигомерных форм  $A_v$ -HRP мы прибегли к анализу оптических свойств конъюгатов и исходных белков.

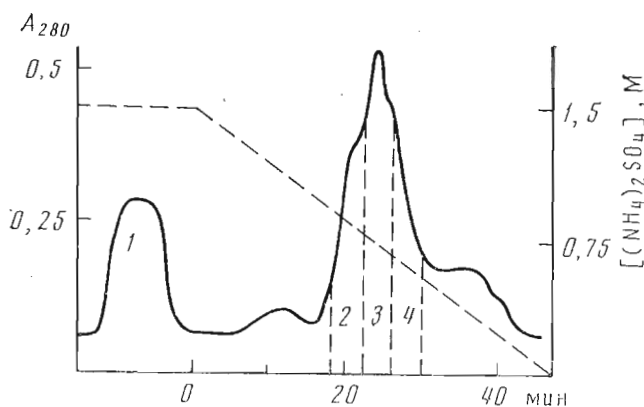


Рис. 3. Высокоэффективная гидрофобная хроматография конъюгатов Ав—HRP. Колонка TSK Phenyl 5PW. Скорость потока 0,5 мл/мин. Фракция 1 — свободный авидин, фракции 2—4 содержат активные олигомеры Ав—HRP

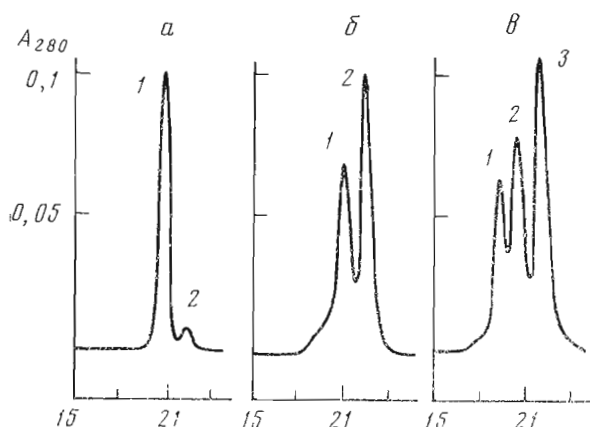


Рис. 4. Рехроматография фракций 2—4 (рис. 3) с использованием гель-фильтрации. Условия см. рис. 1. а — фракция 2: 1 —  $M$  150 кДа,  $Av_1$ —HRP<sub>2</sub>; 2 — HRP; б — фракция 3: 1 —  $M$  150 кДа,  $Av_1$ —HRP<sub>2</sub>; 2 — HRP; в — фракция 4: 1 —  $M$  220 кДа,  $Av_1$ —HRP<sub>4</sub>, 2 —  $M$  150 кДа,  $A_1$ —HRP<sub>2</sub>, 3 — HRP

Экспериментально найденные величины  $A_{403}/A_{280}$  ( $R_z$ ) дали возможность соотнести их молекулярные массы с данными, полученными из зависимости теоретически рассчитанных значений  $R_z$  и молекулярных масс олигомеров Ав—HRP различного стехиометрического состава (см. рис. 2). Экспериментально найденные значения  $R_z$  для форм Ав—HRP, содержащихся в пиках 1 и 2 (рис. 1), составили 1,6 и 1,17. Как видно из рис. 2, эти величины с учетом найденных молекулярных масс соотносятся с теоретической кривой  $Av_1$ —HRP<sub>n</sub>. Это позволяет заключить, что выделенные активные олигомеры Ав—HRP с молекулярной массой 150 и 220 кДа имеют вероятное строение  $Av_1$ —HRP<sub>2</sub> и  $Av_1$ —HRP<sub>4</sub>.

Трудности отделения активных олигомерных форм конъюгатов с молекулярными массами  $\sim 300$  кДа от более высокомолекулярных и малоактивных полимеров и исходных непрореагировавших белков поставили задачу поиска альтернативных гель-фильтраций путей их выделения. В наших исследованиях весьма эффективным и воспроизводимым показал себя метод, основанный на хроматографии гидрофобного взаимодействия. Внесение в реакционную смесь по завершении синтеза конъюгата 1,5 М сульфата аммония позволило осадить большую часть полимерных форм конъюгата. Как видно из профиля элюции, после нанесения конъюгата на колонку TSK Phenyl SPW (рис. 3), авидин не связывается с гидрофобным сорбентом и элюируется стартовым буфером.

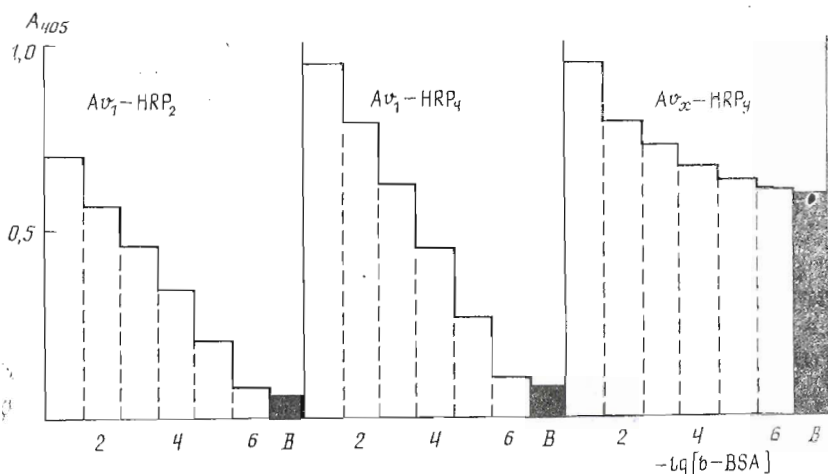


Рис. 5. Чувствительность различных конъюгатов  $Av-HRP$ , определенная твердофазным методом.  $b-BSA$  использован в качестве модельного биотинилированного полимера. Подробности см. в «Экспер. части». В — фон

Анализ фракций 2—4, полученных при гидрофобной хроматографии (см. рис. 3) методом гель-фильтрации (рис. 4), позволил заключить, что элюция различных компонентов смеси при снижении концентрации сульфата аммония происходит в следующем порядке:  $Av_1-HRP_2$ ,  $HRP$ ,  $Av_1-HRP_4$  и далее  $Av_1-HRP_n$ -полимеры. Таким образом, методом гидрофобной хроматографии можно легко выделить фракцию олигомерных форм  $Av-HRP$ , не содержащую препятствующих микродетекции примесей.

На рис. 5 представлены данные, позволяющие сравнить чувствительность выделенных олигомеров при детекции  $b-BSA$ . Наибольшей чувствительностью обладают олигомеры структуры  $Av_1-HRP_2$  и  $Av_1-HRP_4$ , причем чувствительность второго олигомера несколько выше. Видно, что в обоих случаях значительного превышения над фоном удается достичь при определении  $b-BSA$  в количестве 1 пг (5-я точка по оси абсцисс, рис. 5). Это значение количества определяемого биотинилированного биополимера позволяет использовать предложенную проявляющуюся систему для практических целей микродетекции. Полимерные фракции  $Av_x-HRP_y$  (рис. 5), хотя и обладают авидин-пероксидазной активностью, из-за высокой неспецифической сорбции (см. соотношение фон — опыт) мало пригодны для целей микродетекции. По всей видимости, именно они, составляя значительную часть белкового материала в неочищенных препаратах конъюгатов авидин—пероксидаза, увеличивают неспецифический фон.

Таким образом, предложенный метод выделения олигомерных фракций  $Av-HRP$  с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий, позволяет получить препараты конъюгата максимальной удельной активности.

### Экспериментальная часть

В работе использовали  $D$ -биотин,  $BSA$  (Sigma, США), пероксидазу хрена —  $R_2$  2,8 (Биолар, СССР), НАВА, АВТС (Serva, ФРГ), СМ-три-сакрия (ЛКВ, Швеция). Авидин очищали по описанному ниже методу. Маркерные мелки ( $M$ , кДа): каталаза (232), альдолаза (158, 67), сывальбу-мин (43) химотрипсिनоген А (25) (Pharmacia, Швеция).

**Получение и очистка авидина.** Яичный белок отделяли от желтка и разводили деионизованной водой в соотношении 1 : 1. К полученному раствору добавляли сульфат аммония до 60% от насыщения, центрифугировали 30 мин при 10 000g. К супернатанту добавляли сульфат аммония до 100% насыщения и центрифугировали 30 мин при 10 000g. Осадок растворяли в деионизованной воде и добавляли равный объем охлажденного до  $-70^\circ C$  этилового спирта. Затем проводили центрифугирование в течение 15 мин при 10 000g. Осадок экстрагировали 0,05 M  $NaOAc$ , pH 4,5. Экстракт центрифугировали 10 мин при 10 000g. Осадок подвергали повтор-

ной экстракции и центрифугированию. Супернатанты объединяли, диализовали в течение ночи против 0,05 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$  и наносили на колонку ( $2 \times 5$  см) с CM-трисакрилом (Pharmacia, Швеция), уравновешенную тем же буфером. Условия хроматографии были близкими описанным в работе [8]. Колонку промывали 0,05 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 9,0. Пик балластных белков элюировали 0,5%  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , авидин — 1%  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ .

*Характеристика препарата авидина.* Активность выделенного авидина измеряли методом [9] с применением гидрофобного красителя НАВА (Serva, ФРГ). Она составила 13—14,5 мкг биотина на 1 мкг белка. Чистоту препарата проверяли электрофорезом в присутствии SDS. Препарат был гомогенен, его электрофоретическая подвижность соответствовала белку с молекулярной массой 17 кДа.

*Биотинилирование белков.* N-Окисукцинимидный эфир биотина синтезировали согласно работе [10]. Биотинилирование BSA осуществляли по методике [11].

*Получение окисленной пероксидазы.* 5 мг пероксидазы растворяли в 1 мл воды и прибавляли 0,2 мл 0,1 М свежеприготовленного водного раствора периодата натрия. Смесь инкубировали в течение 1 ч при 20° С и слабом перемешивании. Затем прибавляли 50 мкл этиленгликоля и инкубировали 2 ч в тех же условиях. Препарат диализовали против 3 мМ  $\text{NaOAc}$ , pH 4,5, трижды в течение 1 ч для освобождения от низкомолекулярных реагентов и продуктов реакции.

*Получение конъюгата авидин—пероксидаза.* 5 мг авидина растворяли в 1 мл 0,2 М  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,0. К раствору по каплям добавляли раствор окисленной пероксидазы. Смесь инкубировали при медленном перемешивании 2 ч при 20° С. К раствору добавляли 5 мг  $\text{NaBH}_4$  и инкубировали 2 ч при 4° С. Полученный препарат диализовали против 0,05 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,85%  $\text{NaCl}$  (буфер А).

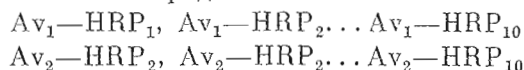
*Хроматографическое разделение* проводили на приборе Altex (Beckman, США), модель 332. Гель-фильтрацию препаратов конъюгатов Av—HRP осуществляли на колонке ( $7,5 \times 600$  мм) TSK G4000Sw в 0,1 М  $\text{NaOAc}$ , pH 5,0, содержащем 0,2 М  $\text{NaCl}$ , при скорости потока 0,3 мл/мин. Молекулярную массу образующихся при конъюгации олигомеров определяли методом [12], используя набор соответствующих маркерных белков.

Гидрофобную хроматографию препаратов конъюгата Av—HRP проводили на колонке ( $7,5 \times 7,5$  мм) TSK Phenyl SPW. В исходный препарат конъюгата добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,5 М. Препарат хроматографировали в понижающемся градиенте сульфата аммония от 1,5 М до 0 в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,5, при скорости потока 0,5 мл/мин.

*Определение чувствительности конъюгатов при детекции* проводили твердофазным способом [10]. В лунки планшета (Tytetek, США) наносили в концентрациях  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  мкг/мл b-BSA в 100 мкл 0,1 М карбонатного буфера, pH 9,0, и сорбировали в течение ночи при 4° С (указанные концентрации детектируемого полимера отмечены на оси абсцисс рис. 5).

Блокирование свободных мест связывания проводили 0,2% BSA в буфере А в течение 1 ч при 37° С. Конъюгат Av—HRP в буфере А с 0,1% BSA вносили в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали 30 мин при 37° С. После отмывки буфером А, содержащим 0,1% твин-20, в лунку добавляли субстратную смесь (0,005%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,01% ABTS) в 0,1% цитратном буфере, pH 4,5. Поглощение раствора измеряли при 405 нм на многолучевом спектрофотометре Multiskan (Tytetek, США).

*Расчет теоретических значений R конъюгатов Av—HRP различной структуры* проводили исходя из значений молекулярных масс 68 и 40 кДа и величин  $A_{280}$  растворов белка с концентрацией 1 мг/мл, равных 1,54 и 1, а для  $A_{403}$  — 0 и 2,7 для авидина и пероксидазы соответственно. Значение вероятных молекулярных масс образующихся полимерных конъюгатов рассчитывали в рядах:



Другие экспериментально возможные варианты являлись производными этих значений. Теоретические значения  $R_z$  конъюгатов определяли из соотношения

$$R_z = \frac{M_{\text{HRP}} / (M_{\text{Av}_i} \cdot M_{\text{HRP}_k}) \cdot 2,7}{M_{\text{HRP}} / (M_{\text{Av}_i} \cdot M_{\text{HRP}_k}) + M_{\text{Av}} / (M_{\text{Av}_i} \cdot M_{\text{HRP}_k}) \cdot 1,54},$$

где  $M_{\text{Av}}$  и  $M_{\text{HRP}}$  — молекулярные массы авидина и пероксидазы,  $M_{\text{Av}_i}$  и  $M_{\text{HRP}_k}$  — молекулярные массы соответствующих полимерных конъюгатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wilchek M., Bayer E. A. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 171. № 1. P. 1—32.
2. Hsu S.-M., Raine L. // *Advances in Immunochimistry* / Ed. De Lellis. N. Y.: Masson Publ., 1983. P. 31—42.
3. Kendall C., Ionescu-Matui I., Dreesman G. R. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 56. № 3. P. 329—339.
4. *Enzyme-mediated immunoassay* / Eds Ngo T. T., Lenhoff H. M. N. Y.—L.: Plenum Press, 1985. P. 174—176.
5. Nakane P. K., Kawaoi A. // *J. Histochem. Cytochem.* 1974. V. 22. № 3. P. 1084—1091.
6. Boorsma D. M., Streefkerk J. G. // *J. Immunol. Methods.* 1979. V. 30. № 1. P. 245—255.
7. O'Sullivan M. J., Gnemmi E., Morris D., Chieragatti G., Simmonds A. D., Bridges J. W., Marks V. // *Anal. Biochem.* 1979. V. 100. № 1. P. 100—108.
8. Melamed M., Green N. M. // *Biochem. J.* 1963. V. 89. № 2. P. 591—599.
9. Green N. M. // *Methods in Enzymology.* V. 18 / Eds McCormick D. B., Wright L. D. N. Y.: Acad. Press, 1970. P. 418—424.
10. Ильина А. В., Рабинков А. Г., Вихрева Е. В., Габитов А. Г. // *Биоорганическая химия.* 1989. Т. 15. № 3. С. 354—357.
11. Bayer E. A., Ben-Ur H., Wilchek M. // *Anal. Biochem.* 1986. V. 154. № 2. P. 367—370.
12. Andrews P. // *Biochem. J.* 1965. V. 96. № 2. P. 595—606.

Поступила в редакцию  
11.I.1990

После доработки  
19.VII.1990

G. V. GOLOLOBOV, A. M. SHUSTER\*, I. K. ZALITE\*, A. G. GABIBOV,  
A. G. RABINKOV

#### SYNTHESIS AND HPLC ISOLATION OF HIGHLY SENSITIVE OLIGOMERS OF AVIDIN—PEROXIDASE

V. A. Engelhardt *Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow:*

\* *Institute of Applied Biochemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Riga*

Optimal conditions for the preparation of avidin—peroxidase conjugates by the periodate method were studied. A method based on hydrophobic interaction chromatography was developed for the isolation of the active oligomers. The probable structure of oligomers with highest sensitivity is discussed.