

УДК 57.083.3; 577.112

Получение рекомбинантного конъюгата пероксидазы хрена с Fab-фрагментом антител с использованием экспрессионной системы *Pichia pastoris*

О. В. Колясников^{1,2#}, В. Г. Григоренко^{2**}, А. М. Егоров², S. Lange³, R. D. Schmid³¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Специализированный учебно-научный центр, кафедра химии, 121357, Москва, ул. Кременчугская, 11²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3³Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Stuttgart, Allmandring, 31, Germany, 70569

*E-mail: vitaly@immunotek.ru

Вклад авторов в публикацию равноценен.

Поступила в редакцию 05.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Рекомбинантные иммуноконъюгаты ферментов-маркеров с антигенами или антителами обладают рядом преимуществ перед конъюгатами, полученными традиционными методами химического синтеза: они гомогенны по составу, имеют строго определенную стехиометрию и сохраняют функциональную активность как белка-маркера, так и антигена/антитела. На основе челночного вектора pPICZαВ нам удалось впервые получить рекомбинантный конъюгат пероксидазы хрена (HRP) с Fab-фрагментом антитела против атразина. Получена генетическая конструкция, которая позволяет изменять последовательность антительной части путем реклонирования вариабельных частей. Возможно также изменение ферментной части. Иммуноконъюгаты успешно экспрессированы в системе метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Наличие у иммуноконъюгатов активности – как ферментативной, так и антигенсвязывающей – подтверждено методом ИФА.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА пероксидаза хрена, антитела, рекомбинантные конъюгаты, экспрессия в системе *P. pastoris*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HRP – пероксидаза хрена; ИФА – иммуноферментный анализ; БСА – бычий сывороточный альбумин; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; АБТС – 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолино-6-сульфоная кислота).

ВВЕДЕНИЕ

Разработка методов ИФА связана с необходимостью получения конъюгатов ферментов-маркеров, таких, как пероксидаза хрена (HRP, [КФ 1.11.1.7]), с антигенами или антителами, в которых антиген или антитело сохраняет иммунологическую активность и не происходит инактивации фермента. Однако все основные подходы, используемые для химического конъюгирования белков и гаптен, приводят к частичной инактивации ферментов и гетерогенности конъюгатов, что влияет на специфичность и чувствительность иммуноферментного анализа. Методами генной инженерии можно получать рекомбинантные конъюгаты белков с антигенами или антителами. Такие конъюгаты имеют ряд преимуществ – они гомогенны

по составу, имеют стехиометрию 1 : 1 и сохраняют функциональную активность как белка-маркера, так и антигена/антитела, а также воспроизводимость и относительную простоту получения. Рекомбинантные конъюгаты антител со щелочной фосфатазой [1–3], люциферазой [4] и пероксидазой *Arthromyces ramosus* [5] получены ранее.

Рекомбинантный конъюгат HRP с белком-переносчиком жирных кислот (FABP) [6], полученный нами ранее, экспрессировали в клетках *Escherichia coli* и использовали в качестве иммуотрейсера при проведении иммуноферментного анализа с целью ранней диагностики инфаркта миокарда.

Функциональная экспрессия рекомбинантного конъюгата HRP и фрагментов антител в *E. coli* сопря-

жена с рядом трудностей, поскольку в клетках *E. coli* отсутствует посттрансляционное гликозилирование белков, что приводит к низкой растворимости и агрегации получаемого белка. Эта проблема может быть решена сменой экспрессионной системы. Например, показано, что метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* более подходят для экспрессии антител, чем клетки *E. coli* [7, 8].

HRP [9] и фрагменты антител [10] – как в одноцепочечной форме scFv [11, 12], так и в форме Fab [13] – успешно экспрессировали в клетках *P. pastoris* по отдельности. Более того, с использованием этой экспрессионной системы созданы некоторые иммуноконъюгаты [14–16]. Показано также, что экспрессия генов в системе *P. pastoris* в секретируемой форме существенно упрощает масштабирование процесса для биотехнологических приложений [17].

Недавний прогресс в функциональной экспрессии HRP и антител в секретируемой форме открывает путь к созданию рекомбинантных конъюгатов HRP с антителами для использования в иммуноанализе. С целью изучения возможностей такого подхода мы впервые получили рекомбинантные конъюгаты HRP с Fab-фрагментами антител против атразина. В этих химерных белках пероксидазная часть объединена с N- и C-концевой частью тяжелой цепи антитела через короткую гибкую линкерную последовательность. Получены универсальные векторы для экспрессии конъюгатов HRP и переменных цепей Fab-фрагментов антител (простая замена переменных частей тяжелой и легкой цепи любого другого антитела с помощью реклонирования по сайтам PstI/BstEII и BamHI/XhoI соответственно) в секретируемой форме в клетках *P. pastoris*. Получен функционально активный конъюгат HRP с Fab (атразин), обладающий антигенсвязывающими свойствами, аналогичными свойствам моноклональных антител, что подтверждено методом одностадийного конкурентного иммуноанализа атразина ($IC_{50} \sim 3$ нг/мл).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты

Реагенты были приобретены у компаний «Sigma», «Fluka», «Difco» и использовались без дальнейшей очистки. Белковый электрофорез (SDS-PAGE) проводили по стандартной методике с использованием набора белков с низкой молекулярной массой (LMW, «Bio-Rad»). Препаративную работу с ДНК проводили с использованием наборов QIA prep Spin Miniprep Kit и QIAquick Gel extraction Kit («Qiagen», Германия). Использовали ферменты рестрикции и модификации ДНК фирм «New England Biolabs», «Boehringer-Mannheim», «GIBCO-BRL-Life technologies», «MBI».

Олигонуклеотиды для секвенирования и ПЦР заказывали в фирмах «ARK Scientific», «MWG Biotech» или «Interactiva» (Германия).

Обработка и представление результатов

Генно-инженерную часть работы планировали с помощью программы CloneManager (Scientific & Educational Software, Cary, США). Пространственные структуры иммуноконъюгатов были смоделированы и визуализированы в пакете программ InsightII («BioSym Inc.», США) на рабочей станции SGI R4400. Экспериментальные данные подготовлены к публикации с использованием программ, входящих в пакет OpenOffice.org (www.openoffice.org), а также GIMP (GNU Image Manipulation Program).

Микроорганизмы, среды, плазмиды и олигонуклеотиды

Штамм DH5 α *E. coli* использовали для генетических манипуляций, для промежуточной продукции белка – *E. coli* BL21(DE3) pLysS («Novagen»). Клетки культивировали в среде LB (1% экстракт дрожжей, 1% пептон, 0,5% NaCl), дополненной 25 мг/л зеоцина («Invitrogen»).

Получение компетентных клеток. Клетки *E. coli* растили в течение ночи до OD_{600} 0,4–0,6 в 50 мл среды LB и отделяли от культуральной среды центрифугированием (3500 об/мин, 4°C) в течение 10 мин. Осадок клеток ресуспендировали в буфере TSS (буфер на основе среды LBS, содержащий в 100 мл 10 г ПЭГ-6000, 5 мл DMSO и 0,6 г $MgCl_2$; pH 6,5), выдерживали в течение 1 ч на льду, расфасовывали на аликвоты по 200 мкл и быстро замораживали при $-80^\circ C$.

Рекомбинантные антитела и их конъюгаты с HRP экспрессировали с использованием *P. pastoris* X33 («Invitrogen») и челночного вектора pPICZ α B («Invitrogen») для клонирования. Сайт NotI мы удаляли с использованием прямых и обратных праймеров (таблица). Для встраивания гена HRP за геном тяжелой цепи антитела и удаления сайтов рестрикции BspCI, ApaI, PstI, BstEII, BglII, XhoI, BamHI, SacI и PvuI использовали метод трехстадийной ПЦР с применением праймеров, также перечисленных в таблице.

Модификация ДНК и трансформация клеток

Для работы с ДНК использовали стандартные процедуры [18]. Клетки *E. coli* трансформировали, добавляя плазмиды или лигазную смесь к размороженным компетентным клеткам. Клетки *P. pastoris* трансформировали плазмидами, предварительно линеаризованными по сайту PmeI, методом электропорации.

Культивирование *P. pastoris* и секрция рекомбинантного конъюгата

Клетки *P. pastoris* наращивали в среде YPD (1% экстракт дрожжей, 2% пептон, 2% D-глюкоза). Целевой белок синтезировали в среде YP без глюкозы с использованием в качестве индуктора 0.5 об.% метанол. При трансформации клеток *P. pastoris* использовали среду YPDS (YPD, содержащая 1 М сорбита). Твердая среда содержала 1.5% бактоагара. Трансформанты выращивали в среде YPDS при 30°C и перемешивании (200 об/мин) до $OD_{600} = 15$ ед. Клетки центрифугировали при 3000 g и 4°C, промывали средой YP и доводили OD_{600} до 1. Индукцию проводили в течение 96 ч, добавляя 0.5 об.% метанола каждые 24 ч. Супернатант концентрировали ультрафильтрацией на мембране («Amicon», 10 кДа).

Синтез конъюгата бычьего сывороточного альбумина (БСА) с атразином

Смесь 1 мг производного атразина (4-хлор-6-(изопропиламино)-1,3,5-триазин-2-(6-аминокапроновой кислоты)) (~ 3.2 мкмоль), 1.7 мг N-гидроксисукцинимиды (~15 мкмоль), 6.6 мг N,N'-дициклогексилкарбодиимида (~ 30 мкмоль) в 130 мкл 1,4-диоксана перемешивали в течение 8 ч при комнатной температуре. Осадок отделяли центрифугированием на настольной центрифуге (12 000 об/мин, 30 с). Супернатант по каплям добавляли к раствору БСА (2 мг) в 3 мл 0.13 М $NaHCO_3$. Реакционную смесь оставляли в темном месте на 3 ч. Продукт реакции наносили на колонку PD-10, предварительно уравновешенную фосфатно-солевой буферной смесью (PBS), pH 7.5. Собраны и проанализированы спектрофотометрически (при 220 и 260 нм) 16 фракций объемом по 0.5 мл. Фракции с наибольшим отношением $OD_{220/260}$ объединяли и использовали в дальнейших опытах.

Определение активности рекомбинантного конъюгата методом иммуноферментного анализа

ИФА проводили с использованием планшетов («NUNC» MAXI-SORP) с предварительно сорбированным конъюгатом БСА-атразин (разведение 1 : 100) или БСА (10 мкг/мл) в 10 мМ карбонатном буфере, pH 9.0, при 4°C в течение ночи. Образцы супернатанта культуральной среды *P. pastoris* последовательно разводили в PBS, добавляли в лунки планшета и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Далее планшет промывали 3 раза PBS, содержащим 0.1% Твин-20 (PBS-T), добавляли по 50 мкл субстратной смеси ТМВ (0.6 мг/мл ТМВ и 8 мМ H_2O_2 в 0.1 М ацетатном буфере, pH 5). Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 2 М H_2SO_4 , оптическую плотность измеряли при 450 нм.

Конкурентный ИФА для определения атразина

150 мкл калибровочной пробы (0.1, 1.0, 10, 20, 50, 100, 500 нг/мл атразина в PBS-T) и 40 мкл раствора рекомбинантного конъюгата вносили в лунки планшета с предварительно сорбированным конъюгатом БСА-атразин и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Планшет промывали 3 раза PBS-T и добавляли по 50 мкл субстратной смеси ТМВ. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 2 М H_2SO_4 , оптическую плотность измеряли при 450 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные конъюгаты – это химерные белки, в которых объединены структурные части как фермента-маркера, так и антигена/антитела. Использование современных подходов практически решило проблему получения таких рекомбинантных ферментов, как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, люцифераза, пероксидаза хрена, использующихся в качестве маркеров в методах ИФА. Однако получение рекомбинантных конъюгатов – задача довольно сложная, поскольку на сегодняшний день невозможно достоверно предсказать структуру получаемого конъюгата, поэтому возможна потеря функциональной активности как фермента-маркера, так и антигена из-за неправильного фолдинга двух составных частей химерного белка.

Ранее были получены рекомбинантные конъюгаты, в состав которых входят бактериальные ферменты – β-галактозидаза и щелочная фосфатаза, легко экспрессируемые в растворимой форме в клетках *E. coli*, а также некоторые другие ферменты. Основная проблема, связанная с использованием β-галактозидазы и щелочной фосфатазы в составе конъюгатов, – их тетрамерная и димерная структуры соответственно, что приводит к существенному увеличению аффинности конъюгата по сравнению со свободным антителом. Это особенно нежелательно при разработке конкурентных схем ИФА. В то же время пероксидаза хрена, один из наиболее широко применяемых в ИФА ферментов-маркеров, экспрессируется в клетках *E. coli* только в форме телец включения, что до недавнего времени затрудняло получение активного фермента.

Достигнутые за последние годы успехи в гетерологической экспрессии генов антител в клетках метилотрофных дрожжей *P. pastoris* открывают перспективы использования этой системы для синтеза конъюгатов пероксидазы хрена с антителами в секретируемой растворимой и функционально активной форме.

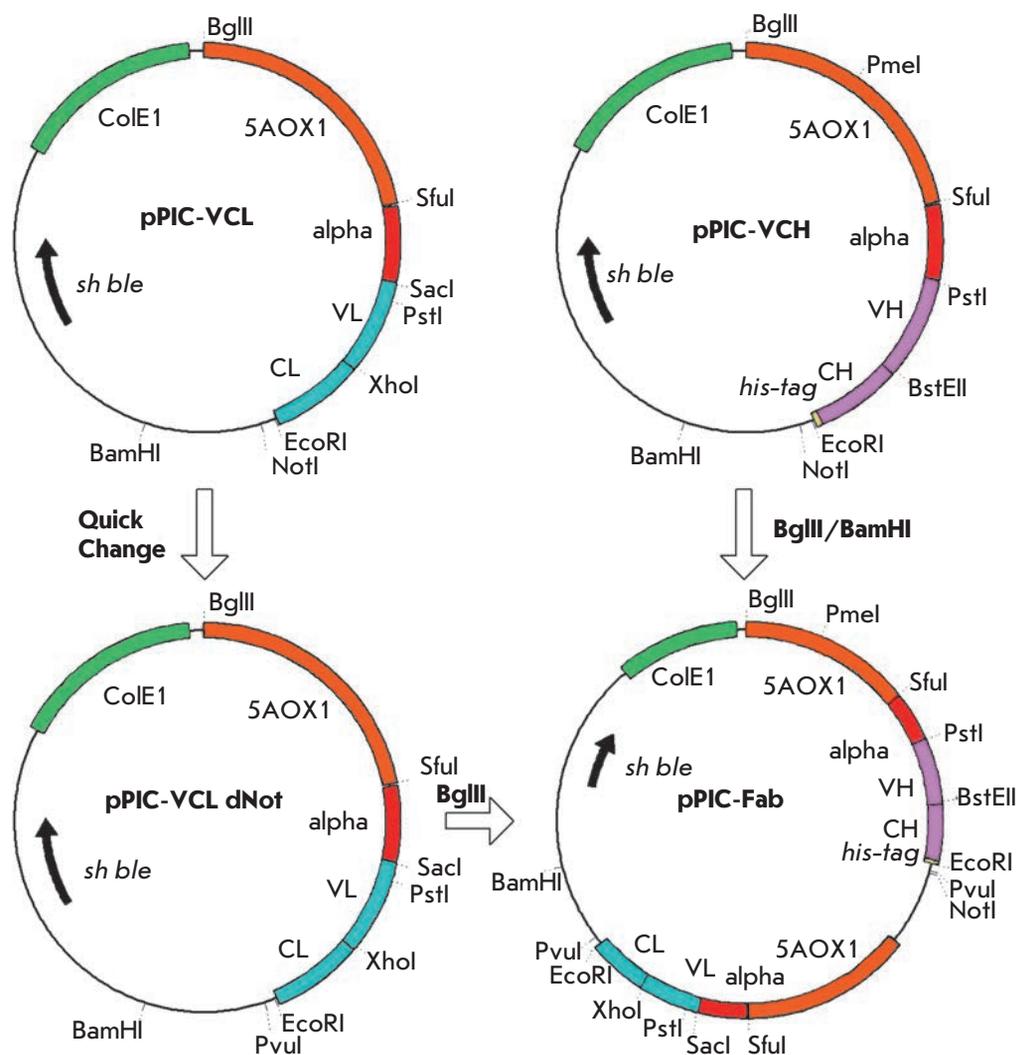


Рис. 1. Схема получения плазмиды pPIC-Fab.

Дизайн экспрессионного вектора для получения рекомбинантного конъюгата HRP с Fab-фрагментом антител в *P. pastoris*

Экспрессионная система для получения рекомбинантных конъюгатов HRP и Fab-фрагментов антител была разработана на основе вектора pPICZαB. Генетическую конструкцию поместили под контроль промотора AOX, содержащего сайт PmeI, для последующей линейризации и рекомбинации в геном дрожжей. Вектор также содержит сигнальную последовательность α-фактора, необходимую для направленной секреции рекомбинантного белка в культуральную среду. Ген *sh ble* обеспечивает устойчивость к зеоцину как клеток *E. coli*, так и *P. pastoris*. Предусмотрена возможность введения гексагистидиновой последовательности на С-конце рекомбинантного белка для упрощения выделения и очистки продукта.

В качестве исходного материала были использованы ранее полученные плазмиды pPIC-VCL и pPIC-

VCH [19], содержащие соответствующие фрагменты переменных участков легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела К4Е7 против атразина [20] соответственно (рис. 1). Оба эти вектора содержали сайт NotI после клонированного гена.

Для создания универсальной конструкции мы планировали оставить в векторе только один сайт NotI после гена тяжелой цепи антитела. Мы удалили сайт NotI из плазмиды pPIC-VCL с помощью ПЦР в формате QuickChange [21] с использованием специальной пары праймеров (таблица). Полученный таким способом вектор назвали pPIC-VCL dNot. Затем фрагмент BglIII/BamHI плазмиды pPIC-VCH, содержащий ген тяжелой цепи, клонировали по сайту BglIII плазмиды pPIC-VCL dNot перед геном легкой цепи. Таким образом получили экспрессионный вектор pPIC-Fab. Схема клонирования приведена на рис. 1.

Полученный универсальный вектор pPIC-Fab содержит пары сайтов SacI/XhoI и PstI/BstEII для про-

Прямые (F) и обратные (R) праймеры, использованные для создания генетических конструкций методом ПЦР

| Ген | Удаляемый сайт рестрикции | | Праймер* |
|----------------|---------------------------|---|---|
| <i>HRP</i> | NotI | R | 5' -CGATCGAGCC GCG AT GGCCG CCAGC-3' |
| <i>HRP</i> | NotI | F | 5' -GCTGGCGGCC AT CGCGGCTC GATCG-3' |
| <i>Fab VCH</i> | | R | 5' -AGGCACAGCT ATAGGTACG-3' |
| <i>Fab VCH</i> | | F | 5' -TGAGAACCTC CACCGCCGCA GTCGCGCGGT ACG-3' |
| <i>HRP</i> | | R | 5' -GCGGCGGTGG AGGTTCTCAG TTAACGCCGA CTTTCTACG-3' |
| <i>HRP</i> | PstI, BspCI | R | 5' -G A CCGCATGA AGGCTGC T GT CG-3' |
| «-« | PstI, BspCI | F | 5' -AC A GCAGCCT TCATGCG G TC G-3' |
| «-« | BstEII, ApaI | R | 5' -AC T CTAGCCG GCGG T CCCTC-3' |
| «-« | BstEII, ApaI | F | 5' -GG A CCGCCGG CTAG A GTGAC-3' |
| «-« | XhoI | R | 5' -GA A CCG T TCG AGTGATCTAG-3' |
| «-« | XhoI | F | 5' -AGATCACTCG A ACGGTTCAG-3' |
| «-« | SacI | R | 5' -GATCAGGAGC T GTCTCATC-3' |
| «-« | SacI | F | 5' -AA C AGCTCCT GATCAGATTG-3' |
| <i>Fab VCL</i> | NotI | R | 5' -ATCGGTACCT CGATCGAGCC GCG AT GG-3' |
| <i>Fab VCL</i> | NotI | F | 5' -TGAAGTGGTA CGGCGATGC-3' |

*Выделены измененные участки нуклеотидной последовательности.

стого клонирования генов тяжелой и легкой цепи, кодирует С-концевой гексагистиридиновый фрагмент для упрощения очистки целевого белка металлохелатной хроматографией, а также сайт NotI для клонирования белка-маркера (такого, как HRP, зеленого флуоресцентного белка (EGFP), люциферазы и др.) на С-конце тяжелой цепи антитела.

Параллельно создан вектор для экспрессии рекомбинантного конъюгата пероксидазы с Fab-фрагментами антител. Для удобства клонирования из исходного гена *HRP* [22], предварительно клонированного в соответствующем векторе рPIC, мы удалили сайты рестрикции PstI, BstEII, BglII, XhoI, SacI, PvuI, ApaI, BamHI и BspCI с использованием ранее перечисленных праймеров (таблица). Одновременно перед геном *HRP* или после него клонировали фрагменты генов антител. Таким образом с помощью трехстадийной ПЦР получены две генетические конструкции, в которых ген *HRP* был соединен короткой гибкой линкерной последовательностью (Gly₄Ser)₃ с последовательностью, кодирующей N-концевую область варибельной части тяжелой цепи Fab или С-концевую область константной части тяжелой цепи (рис. 2). Следует отметить, что тяжелая цепь была выбрана для клонирования гена маркерного белка, чтобы избежать образования нефункциональных димеров легкой цепи. Генетические конструкции клонировали в векторе рPIC-Fab по сайтам PmeI/BstEII и BstEII/NotI соответственно. Взаимное расположение генов в плаزمиде рPIC-Ab-

HRP и рPIC-HRP-Ab подтверждено рестрикционным анализом и секвенированием.

Экспрессия и очистка рекомбинантных конъюгатов Fab-HRP и HRP-Fab

Клетки *P. pastoris* X33 трансформировали плазмидными векторами рPIC-Ab-HRP и рPIC-HRP-Ab методом электропорации с эффективностью около 100 клонов на 10 мкг плазмидной ДНК. Экспрессию целевого белка отслеживали по увеличению пероксидазной активности в супернатанте культуральной среды с выходом на плато на 5-й день культивирования. Проанализировано по 10 клонов с каждой конструкцией. Активность HRP в отношении субстрата ТМБ отмечена только у трех клонов из 20 – двух (1.1, 1.2), соответствующих рPIC-Ab-HRP, и одного (8), соответствующего рPIC-HRP-Ab, – эти клоны были отобраны для дальнейшего рассмотрения.

Как показано с помощью SDS-PAGE-электрофореза (данные не представлены) рекомбинантным конъюгатам HRP-VCH и VCH-HRP соответствуют размытые полосы, расположенные ниже полосы 100 кДа. Эта размытость полос связана с микрогетерогенностью конъюгатов, обусловленной избыточным гликозилированием, характерным для *P. pastoris*, что коррелирует с нашими и опубликованными данными об экспрессии гена *HRP* [9]. Мы наблюдали также существенно больший избыток молекул легкой цепи (полоса в районе 25 кДа), чем при экспрессии Fab-фрагмента [19].

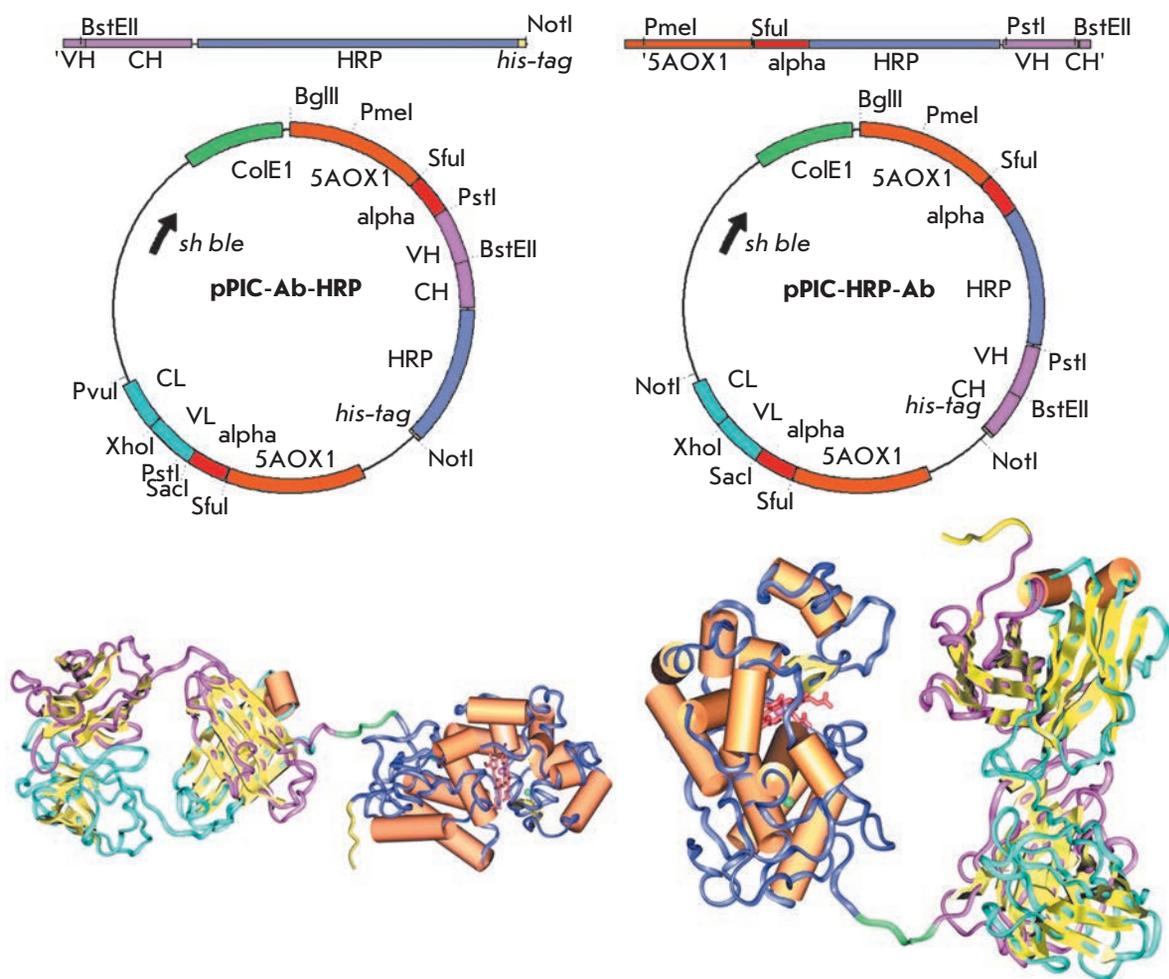


Рис. 2. Схемы клонирования гена *HRP* в плазмидный вектор pPIC-Fab. Пространственные модели рекомбинантных конъюгатов Fab-HRP и HRP-Fab приведены на левой и правой панели соответственно.

Неожиданным оказалось, что рекомбинантные конъюгаты не проявляли ферментативной активности по отношению к другому субстрату пероксидазы – АБТС, в отличие от ТМВ. Известно, что сайт связывания АБТС находится в гидрофобной области на поверхности HRP – в так называемой зоне «Phe patch» [23]. Эта область заметно удалена от активного центра HRP, и можно предположить, что связывание субстрата с ней затруднено по стерическим причинам – вследствие избыточного гликозилирования либо присутствия Fab-фрагмента антитела. Более вероятно первое предположение, так как тот же эффект наблюдается при обоих положениях тяжелой цепи антитела относительно HRP. Более того, сходный эффект мы наблюдали ранее при экспрессии гена *HRP* в *P. pastoris* (данные не опубликованы).

Общий выход рекомбинантных конъюгатов составил около 3–10 мг на 1 л культурального супернатанта *P. pastoris*. Относительно низкий выход секретируемых конъюгатов коррелирует с выходом при экспрессии одного гена *HRP*. Мы полагаем, что один из факторов, негативно влияющих на выход

секретируемого продукта – избыточное гликозилирование пероксидазной части конъюгата, характерное для клеток *P. pastoris*. Для проверки этой гипотезы целесообразным может быть удаление всех сайтов N-гликозилирования в HRP либо замена HRP репортерным белком, например EGFP.

Характеристика рекомбинантных конъюгатов методом ИФА

Для подтверждения антигенсвязывающей активности рекомбинантных конъюгатов мы выбрали схему непрямого конкурентного одностадийного ИФА (рис. 3), проводимого на планшетах с иммобилизованным конъюгатом атразина с БСА. Предварительно было изучено связывание рекомбинантных конъюгатов с атразином (рис. 4). Полученные данные подтверждают наличие как каталитической, так и антительной активности у всех трех вариантов. Однако низкая активность у образца HRP-Fab (клон 8) в сравнении с С-концевым конъюгатом Fab-HRP (клоны 1.1 и 1.2) может свидетельствовать о том, что взаимное пространственное расположение двух

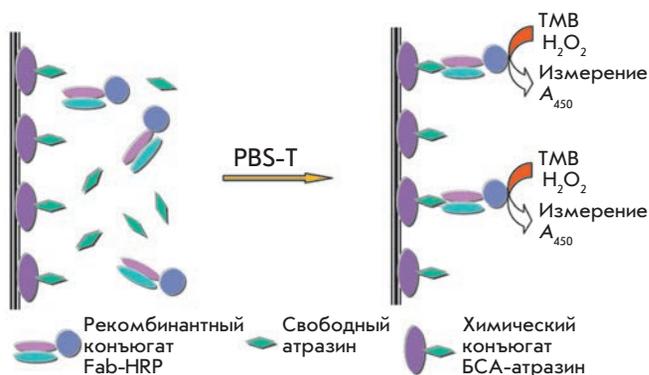


Рис. 3. Схема ИФА для определения атразина.

составных частей химерного белка в этом случае приводит к снижению каталитической активности пероксидазы. Образцы рекомбинантных конъюгатов Fab-HRP (клоны 1.1 и 1.2) обладают сходными характеристиками, и в дальнейшем для определения атразина методом ИФА использовали образец 1.1. Типичный градуировочный график (рис. 5) позволяет определять концентрацию атразина в широком диапазоне – от 0.1 до 50 нг/мл, коэффициент вариации не превышает 8%. IC_{50} составляет 3 нг/мл, что хорошо согласуется с результатами определения атразина в двухстадийном ИФА с использованием рекомбинантных Fab-фрагментов того же антитела K411B [19], а также с данными по одноцепочечному мини-антителу (scFv), полученному ранее в *E. coli* [24]. В то же время у исходного моноклонального антитела значение IC_{50} составило 0.2 нг/мл [19]. Как и в большинстве подобных случаев, отличие на порядок величины IC_{50} от рекомбинантных антител, вероятнее всего, связано с бивалентностью исходного моноклонального антитела.

Таким образом, полученные в настоящей работе рекомбинантные конъюгаты пероксидазы с Fab-фрагментами антитела против атразина обладают функциональной активностью и могут использоваться для определения атразина методом ИФА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показана возможность получения рекомбинантного функционально-активного конъюгата HRP в качестве фермента-маркера с Fab-фрагментами антитела против атразина. В представленной работе получены рекомбинантные конъюгаты, в которых Fab-фрагмент антитела соединен как с N-, так и с C-концом фермента-маркера. Оба эти варианта обладают иммунологической и каталитической активностью.

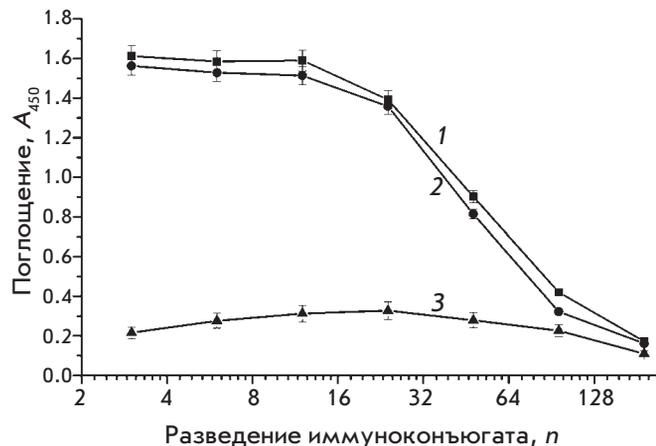


Рис. 4. Титрование рекомбинантных конъюгатов: 1 – клон Fab-HRP 1.1; 2 – клон Fab-HRP 1.2; 3 – клон HRP-Fab 8.

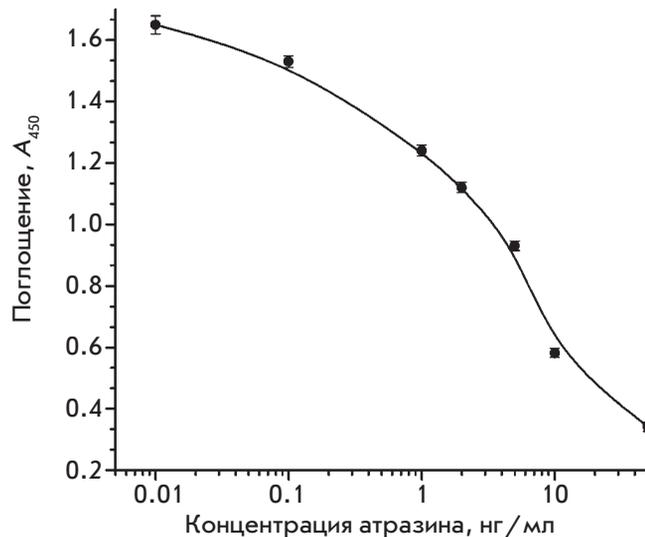


Рис. 5. Градуировочная кривая для определения атразина методом ИФА с использованием рекомбинантного конъюгата (клон Fab-HRP 1.1).

Функциональная секреция рекомбинантных конъюгатов HRP с Fab-фрагментами антител открывает путь к их широкому применению в ИФА. Полученные нами результаты могут быть использованы для разработки высокочувствительных иммунобиосенсоров нового поколения, основанных на технологии рекомбинантных ДНК. ●

Исследование частично финансировалось Германским федеральным министерством науки и технологии (BMBF, грант № 0311574).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rau D., Kramer K., Hock B. // *J. Immunoassay Immunochem.* 2002. V. 23. № 2. P. 129–143.
2. Tachibana H., Takekoshi M., Cheng X.J., Nakata Y., Takeuchi T., Ihara S. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004. V. 11. № 1. P. 216–218.
3. Mousli M., Turki I., Kharmachi H., Saadi M., Dellagi K. // *J. Virol. Meth.* 2007. V. 146. №1–2. P. 246–256.
4. Patel K.G., Ng P.P., Kuo C.C., Levy S., Levy R., Swartz J.R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 390. № 3. P. 971–976.
5. Joosten V., Roelofs M.S., van den Dries N., Goosen T., Verrips C.T., van den Hondel C.A., Lokman B.C. // *J. Biotechnol.* 2005. V. 120. № 4. P. 347–359.
6. Grigorenko V., Andreeva I., Borchers T., Spener F., Egorov A. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. № 6. P. 1134–1139.
7. Robin S., Petrov K., Dintinger T., Kujumdzieva A., Tellier C., Dion M. // *Mol. Immunol.* 2003. V. 39. № 12. P. 729–738.
8. Cupit P.M., Whyte J.A., Porter A.J., Browne M.J., Holmes S.D., Harris W.J., Cunningham C. // *Lett. Appl. Microbiol.* 1999. V. 29. № 5. P. 273–277.
9. Morawski B., Lin Z., Cirino P., Joo H., Bandara G., Arnold F.H. // *Protein Eng.* 2000. V. 13. № 5. P. 377–384.
10. Pennell C.A., Eldin P. // *Res. Immunol.* 1998. V. 149. № 6. P. 599–603.
11. Fischer R., Drossard J., Emans N., Commandeur U., Hellwig S. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999. V. 30. Pt 2. P. 117–112.
12. Freyre F.M., Vazquez J.E., Ayala M., Canaan-Haden L., Bell H., Rodriguez I., Gonzalez A., Cintado A., Gavilondo J.V. // *J. Biotechnol.* 2000. V. 76. № 2–3. P. 157–163.
13. Takahashi K., Yuuki T., Takai T., Ra C., Okumura K., Yokota T., Okumura Y. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. V. 64. № 10. P. 2138–2144.
14. Andrade E.V., Albuquerque F.C., Moraes L.M., Brigido M.M., Santos-Silva M.A. // *J. Biochem. (Tokyo).* 2000. V. 128. № 6. P. 891–895.
15. Luo D., Geng M., Schultes B., Ma J., Xu D.Z., Hamza N., Qi W., Noujaim A.A., Madiyalakan R. // *J. Biotechnol.* 1998. V. 65. № 2–3. P. 225–228.
16. Powers D.B., Amersdorfer P., Poul M., Nielsen U.B., Shalaby M.R., Adams G.P., Weiner L.M., Marks J.D. // *J. Immunol. Meth.* 2001. V. 251. № 1–2. P. 123–135.
17. Hellwig S., Emde F., Raven N.P., Henke M., van der Logt P., Fischer R. // *Biotechnol. Bioeng.* 2001. V. 74. № 4. P. 344–352.
18. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
19. Lange S., Schmitt J., Schmid R.D. // *J. Immunol. Meth.* 2001. V. 255. P. 103–114.
20. Giersch T. // *J. Agric. Food Chem.* 1993. V. 41. № 6. P. 1006–1011.
21. Braman J., Papworth C., Greener A. // *Methods Mol. Biol.* 1996. V. 57. P. 31–44.
22. Grigorenko V., Chubar T., Kapeliuch Yu., Borchers T., Spener F., Egorov A. // *Biocatal. Biotransform.* 1999. V. 17. P. 359–397.
23. Ferrari R.P., Traversa S., de Gioia L., Fantucci P., Suriano G., Ghibaudi E.M. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 1999. V. 4. № 1. P. 12–20.
24. Kramer K., Hock B. // *Food Agric. Immunol.* 1996. V. 8. P. 97–109.