

УДК 57.083.3; 577.112

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

О. В. Колясников<sup>1,2#</sup>, В. Г. Григоренко<sup>2\*\*</sup>, А. М. Егоров<sup>2</sup>, S. Lange<sup>3</sup>, R. D. Schmid<sup>3</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Специализированный учебно-научный центр, кафедра химии, 121357, Москва, ул. Кременчугская, 11<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3<sup>3</sup>Institute 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 секреторируемой форме существенно упрощает масштабирование процесса для биотехнологических приложений [17].

Недавний прогресс в функциональной экспрессии HRP и антител в секреторируемой 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 вариабельных цепей Fab-фрагментов антител (простая замена вариабельной части тяжелой и легкой цепи любого другого антитела с помощью реклонирования по сайтам PstI/BstEII и BamHI/XhoI соответственно) в секреторируемой 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](http://www.openoffice.org)), а также GIMP (GNU Image Manipulation Program).

### Микроорганизмы, среды, плазмиды и олигонуклеотиды

Штамм DH5α *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 pPICZαB («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,  $\beta$ -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 –  $\beta$ -галактозидаза и щелочная фосфатаза, легко экспрессируемые в растворимой форме в клетках *E. coli*, а также некоторые другие ферменты. Основная проблема, связанная с использованием  $\beta$ -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.

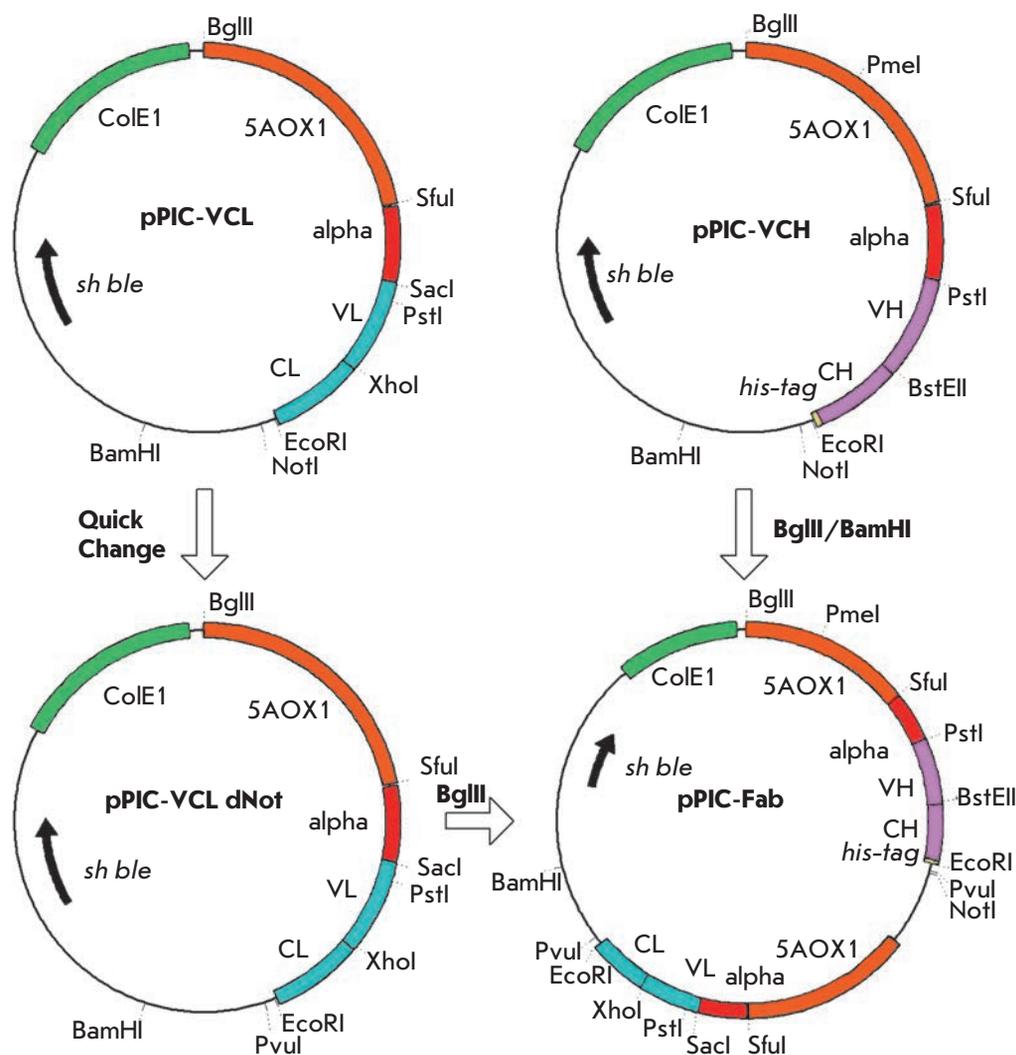


Рис. 1. Схема получения плазмиды pPIC-Fab.

**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 линейаризации 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 <b>AT</b> GGCCG CCAGC-3'
<i>HRP</i>	NotI	F	5' -GCTGGCGGCC <b>AT</b> 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 <b>A</b> CCGCATGA AGGCTGC <b>T</b> GT CG-3'
«-«	PstI, BspCI	F	5' -AC <b>A</b> GCAGCCT TCATGCG <b>G</b> TC G-3'
«-«	BstEII, ApaI	R	5' -AC <b>T</b> CTAGCCG GCGG <b>T</b> CCCTC-3'
«-«	BstEII, ApaI	F	5' -GG <b>A</b> CCGCCGG CTAG <b>A</b> GTGAC-3'
«-«	XhoI	R	5' -GA <b>A</b> CCG <b>T</b> TCG AGTGATCTAG-3'
«-«	XhoI	F	5' -AGATCACTCG <b>A</b> ACGGTTCAG-3'
«-«	SacI	R	5' -GATCAGGAGC <b>T</b> GTCTCATC-3'
«-«	SacI	F	5' -AA <b>C</b> AGCTCCT GATCAGATTG-3'
<i>Fab VCL</i>	NotI	R	5' -ATCGGTACCT CGATCGAGCC GCG <b>AT</b> 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 pPIC, 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 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 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 pPIC-Fab по сайтам PmeI/BstEII и BstEII/NotI соответственно. Взаимное расположение генов в плаزمиде pPIC-Ab-

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

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

Клетки *P. pastoris* X33 трансформировали плазмидными векторами pPIC-Ab-HRP и pPIC-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 pPIC-Ab-HRP, и одного (8), соответствующего pPIC-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].

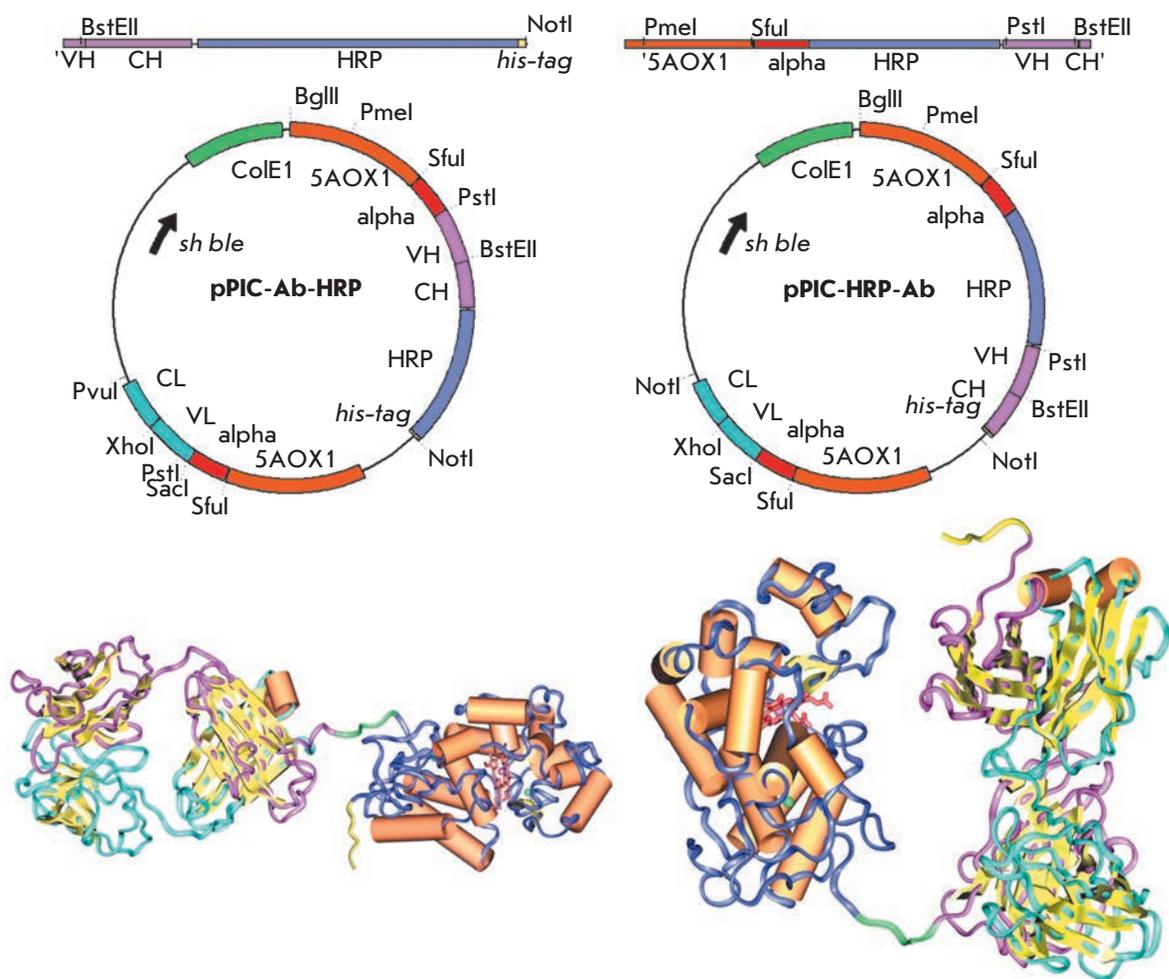


Рис. 2. Схемы клонирования гена *HRP* в плазмидный вектор pPIC-Fab. Пространственные модели рекомбинантных конъюгатов Fab-HRP и HRP-Fab приведены на левой и правой панели соответственно.

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

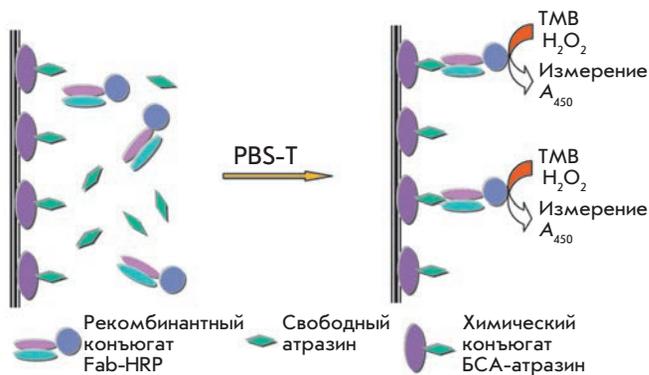


Рис. 3. Схема ИФА для определения атразина.

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.

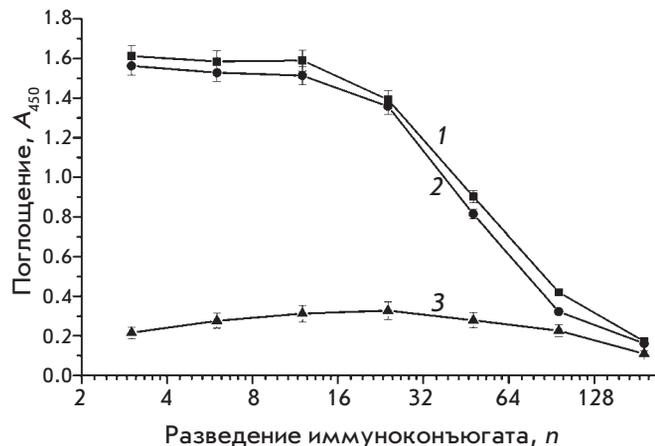


Рис. 4. Титрование рекомбинантных конъюгатов: 1 – клон Fab-HRP 1.1; 2 – клон Fab-HRP 1.2; 3 – клон HRP-Fab 8.

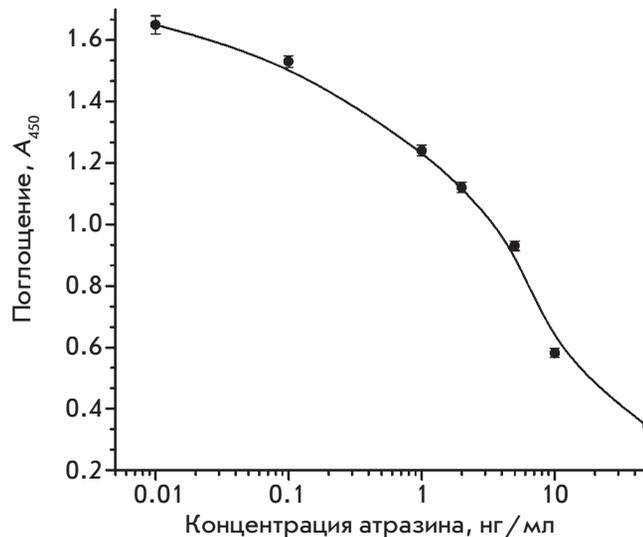


Рис. 5. Градуировочная кривая для определения атразина методом ИФА с использованием рекомбинантного конъюгата (клон Fab-HRP 1.1).

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., Gaviñondo 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.