

АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

Институт биоорганической химии

На правах рукописи

ЛЕПЕШЕВА Галина Ивановна

УДК 577.112:57.083.3:577.352.2.

**ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И
ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЛЕНОК
ЛЭНГМЮРА-БЛОДЖЕТТ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G.**

Специальность 02.00.10 - Биоорганическая химия,
химия природных и физиологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

МИНСК - 1993 г.

Работа выполнена в Институте
Академии наук Беларуси

Кб. 36 483
ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00760727 (Т)

Научные руководители:

доктор химических наук В.Л. Чащин,
кандидат химических наук И.В. Турко

Официальные оппоненты:

доктор химических наук Киселев П.А.
кандидат химических наук Лапко В.Н.

Ведущая организация:

Белорусский Государственный университет, г. Минск

Защита диссертации состоится "25" ноября 1993 г.
в ч. на заседании специализированного совета Д 006.22.01. по
защите докторских диссертаций на соискание ученой степени доктора
наук при Институте биоорганической химии Академии наук Беларуси по
адресу: 220141, Минск, ул. Жединская 5/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биоорганической химии АН Беларуси

Автореферат разослан "___" _____ 1993 г.

Ученый секретарь специализированного
совета канд. хим. наук

Н.М. Литвинко

Институт биоорганической химии
АН Беларуси

Актуальность проблемы. Интерес к белковым пленкам Лэнгмюра-Блоджетт (ЛБ) обусловлен как развитием фундаментальных исследований - моделирование биологических мембран, специфического взаимодействия белков со своими лигандами, изучение процессов сорбции и свойств белковых молекул на границе раздела фаз, - так и открывающимися в последнее время возможностями их практического использования. Одной из интенсивно развивающихся областей применения ЛБ-технологии является создание биосенсорных устройств. Необходимость использования нетрадиционных поверхностей при организации индикаторных фаз биосенсоров требует поиска нетрадиционных способов иммобилизации биоматериала. ЛБ-метод позволяет получать на самых разнообразных поверхностях упорядоченные на молекулярном уровне ультратонкие пленки заданной толщины с максимально возможной плотностью упаковки иммобилизованных молекул. К настоящему времени получены ЛБ-пленки некоторых белков, исследуется вопрос о возможности их использования в биосенсорах. Однако работы в этой области пока находятся на начальной стадии, нет общей теории образования белковых монослоев, не изучены их физико-химические свойства, вопросы стабильности, сохранения биологической активности. В предлагаемых единичных моделях биосенсоров на основе ЛБ-пленок пока используется узкий круг белков, в основном ферментов.

Цель работы - получение функционально активных ЛБ-пленок IgG и исследование возможности их использования для прямой детекции антигена.

Работа проводилась в рамках программы АН СССР "физико-химические основы биологии и биотехнологии" N II-6: "Биология рецепторных систем, биосенсоры" и тематики ИБОХ АНБ: "Разработка новых типов опто-волоконных иммуносенсоров".

Научная новизна. Показано, что IgG способны формировать на границе раздела фаз вода/воздух плотно упакованный монослой, который методом горизонтального касания может быть перенесен на различного вида твердые подложки с образованием мультислойных структур регулируемой толщины (ЛБ-пленок), обладающих иммунохимической активностью. Оптимизированы условия получения ЛБ-пленок IgG, установлено, что их стабильность возрастает с увеличением плотности упаковки молекул IgG в монослое.

Исследованы флуоресцентные характеристики ЛБ-пленок IgG, моди-



фицированных ФИТЦ/РИТЦ, КП и ДАНС-хлоридом. Показано, что в ЛБ-пленке, составленной из смеси ФИТЦ/РИТЦ-IgG, осуществляется перенос энергии флуоресценции от донора к акцептору. Предложен метод активации копропорфирина для синтеза его конъюгатов с белками. Установлено, что флуоресцентные характеристики КП метки изменяются при переходе от свободного состояния к раствору КП-IgG и далее к ЛБ-пленкам. Зарегистрировано увеличение интенсивности флуоресценции ДАНС-метки в ЛБ-пленке IgG.

Показано, что после взаимодействия с антигеном снижается эффективность переноса энергии в ЛБ-пленках ФИТЦ/РИТЦ-IgG; увеличивается интенсивность флуоресценции монослоя КП-IgG.

Разработаны способ получения (А.С. N1503508) и способ стабилизации (А.С. N1505195) ферритинспецифичных антител. Предложена модель пьезоэлектрического сенсора на основе ЛБ-пленок ферритинспецифичных антител для определения концентрации ферритина.

Практическая ценность. Получение иммунохимически активных ЛБ-пленок IgG открывает новые возможности для создания индикаторных фаз иммуносенсоров. Легкость переноса монослоя на различные твердые подложки позволяет использовать нетрадиционные для иммуноанализа поверхности, применяемые часто в молекулярной электронике. Восстановление иммунохимической активности IgG на серебряной поверхности при увеличении числа монослоев в ЛБ-пленке делает возможным создание прямого оптического сенсора на основе метода поверхностного плазмонного резонанса.

Предложенные модели индикаторных фаз для прямой безреагентной детекции антигенов (флуоресцентные и пьезоэлектрическая) способны упростить процедуру анализа, поскольку не требуют дополнительного добавления к системе меченного компонента. Описанные в работе способы получения, стабилизации и оценки антигенсвязывающей способности аффинно очищенных антител к ферритину внедрены и используются на ОП ИБОХ АНБ. Кроме того, они могут быть применены для получения и оценки функциональной активности других антигенспецифичных антител. Улучшение аналитических характеристик иммунохимических тест-систем за счет использования ЛБ-пленок аффинно очищенных антител, показанное в работе на примере пьезоэлектрического сенсора, может быть применено для формирования индикаторных фаз других типов иммуносенсоров.

Апробация работы. Основные результаты работы докладыва-

лись на Всесоюзном симпозиуме "Структура, биосинтез и функции молекулярных элементов иммунной системы (Пушино, 1987 г.), Международной конференции по опто-волоконным сенсорам (Ухань, Китай, 1991 г.), 1-й Европейской конференции по оптическим химическим сенсорам и биосенсорам (Грац, Австрия, 1992 г.), Международном симпозиуме "Европейская биомедицинская оптика '93" (Будапешт, Венгрия, 1993 г.),

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ (4 статьи, 4 тезиса докладов и 2 авторских свидетельства).

Объем работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов и списка цитируемой литературы. В главе 1 приводится обзор литературных данных по типам разрабатываемых иммуносенсоров, методам иммобилизации IgG на детектирующей поверхности преобразователя энергии и ЛБ-технологии как альтернативному методу иммобилизации белков на нетрадиционных поверхностях. В главе 2 представлены результаты исследований и их обсуждение, в главе 3 - экспериментальные методы. Работа изложена на 168 страницах машинописного текста, содержит 40 рисунков и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 227 наименований.

1. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунные антисыворотки получали иммунизацией кроликов. Фракцию иммуноглобулинов G (IgG) выделяли из антисывороток осаждением каприловой кислотой с последующим высаливанием сульфатом аммония (45% насыщения). Ферритин из селезенки человека получали по методу (Crichton et al., 1973). При получении ферритинспецифичных антител иммунную сыворотку обрабатывали 1-лизин-сефарозой для удаления протеаз (АС N1505195), хроматографировали на ферритин-сефарозе 4В и очищали на биогеле Р (АС N1503508).

Модификацию IgG ¹⁴C-малеиновым ангидридом, флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), родамин(В)-изотиоцианатом (РИТЦ) и диаминонафтилсульфонилхлоридом (ДАНС-хлорид) проводили в 0,1 М гидрокарбонате натрия, рН 9,2 с использованием различных молярных избытков модификаторов, растворенных в диметилформамиде. Модифицированные IgG очищали от избытка модификаторов гелехроматографией на сефадексе G-50 (fine). Активированные производные копропорфирина I (КПИ) получали с помощью реагента Будворда К в

смеси с мольным соотношением КПИ : реагент Вудворда К : триэтиламин = 1 : 2 : 10, очищали от избытка реагента Вудворда К хроматографией на силикагеле Silufol UV254 и использовали для модификации IgG. Модификацию проводили в 25 мМ фосфатном буфере, pH 8,1 (Лепешева Г.И. и соавт., 1993 г.). Степень модификации во всех случаях, кроме модификации ^{14}C -малеиновым ангидридом, определяли спектрально. При модификации ^{14}C -малеиновым ангидридом степень модификации определяли по интенсивности β -счета.

Сравнительную оценку антигенсвязывающей способности IgG (общей фракции, аффинно очищенных и модифицированных) осуществляли в конкурентном иммуноферментном тесте. В качестве эталонного конкурента использовали конъюгат аффинно очищенных антител к ферритину с пероксидазой хрена, полученного по методу (Nakane et al., 1974) с небольшими изменениями. При расчете усредненных констант связывания антигена исходили из соотношения:

$$k_o/k_x = h_x/h_o,$$

где k_o и k_x - равновесные константы связывания, а h_o и h_x - концентрации, необходимые для вытеснения одинакового количества эталонного конкурента, исходных и исследуемых антител соответственно (Лепешева Г.И. и соавт., 1990).

ЛБ-пленки IgG получали на ЛБ-установке, включающей ванну Лэнгмюра с одним подвижным барьером, датчик поверхностного давления и блок управления. IgG наносились на поверхность субфазы микрошприцем из 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, в концентрации 0,5 мг/мл. Образование монослоя IgG оценивали с помощью РА-изотерм (зависимости поверхностного давления в пленке (P) от площади, занимаемой одной молекулой белка (A)). Сформированные монослои IgG методом горизонтального касания переносили на очищенные твердые подложки: кремниевые, кварцевые, ситаловые пластинки ($1 \times 0,5 \text{ см}^2$), гидрофильные, гидрофобизованные диметилдихлорсиланом, обработанные 3-аминопропилтриэтоксисиланом или с напыленным методом термического резистивного испарения слоем серебра толщиной $500 \pm 20 \text{ \AA}$. Коэффициент переноса равнялся в среднем 1,1. Перенесенные пленки промывали в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, сушили на воздухе в вертикальном положении и использовали для дальнейших экспериментов. Определение плотности упаковки молекул IgG в монослое проводили методом иммуноблотинга механически удаленных с поверхности пластинок IgG с меченым ^{125}I белком А на нитроцеллюлозе (Усанов С.А. и

соавт., 1987).

Антигенсвязывающие свойства ЛБ-пленок IgG оценивали с помощью ^{125}I -меченных антигенов в растворе 10 мМ фосфатного буфера, содержащего 0.2% бычий сывороточный альбумин (БСА). В качестве неспецифического рассматривалось взаимодействие ЛБ-пленок неиммунных IgG с теми же антигенами.

Измерения поглощения в ультрафиолетовой и видимой области спектра препаратов IgG, исходных и модифицированных флуоресцентными красителями, а также ЛБ-пленок IgG выполнены на спектрофотометре Specord M-40 (Karl Zeiss, Германия). При хроматографических операциях поглощение элюата при 280 нм контролировали с помощью денситометра Uvicord S (LKB, Швеция). ИК-спектры ЛБ-пленок IgG на пластинках из низколегированного кремния КЭФ-40 записывали на спектрофотометре Specord IR 70. Для измерения флуоресценции использовали флуориметр (Hitachi, Япония). Время жизни флуоресценции измеряли импульсным методом на импульсном флуориметре PRA 3000.

Пьезоэлектрическая система для определения ферритина на основе ЛБ-пленок IgG, собранная в Институте электроники АН Беларуси, включала кварцевые резонаторы с частотой колебаний 3,2 МГц, блок питания (Б5-43), частотомер и генератор высокочастотных колебаний на интегральной схеме (К155ЛА3).

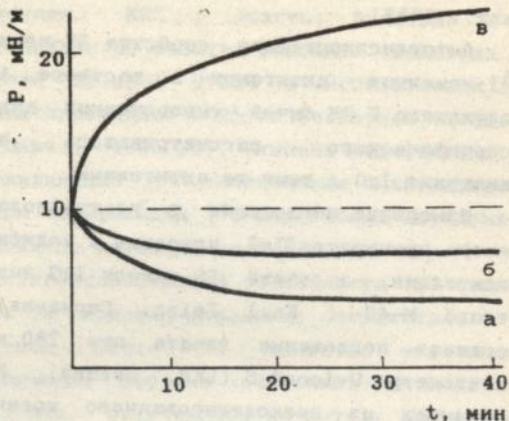
2. ПОЛУЧЕНИЕ ЛБ-ПЛЕНОК IgG

Одним из преимуществ ЛБ-технологии является простота изготовления пленок. Процесс осуществляется при комнатной температуре, атмосферном давлении и не требует трудоемких промежуточных стадий. Для получения ЛБ-пленок какого-либо амфифильного соединения необходимо: а) сформировать плотно упакованный монослой исследуемого вещества на поверхности жидкой субфазы; б) оптимизировать условия его переноса на твердые подложки.

Возможность образования монослоя белка на поверхности субфазы определяется прежде всего его структурой (жесткость - лабильность, гидрофильность - гидрофобность), но зависит также и от ряда других факторов. Одним из таких факторов является состав субфазы (рис.1).

Так, при нанесении IgG на поверхность 1 М сульфата аммония,

Рис.1. Зависимость поверхностного давления в монослое от времени нахождения IgG на поверхности субфазы: (а) вода; (б) 10 мМ фосфатный буфер, рН 7,4; (в) 1 М сульфат аммония, рН 7,4



предлагаемого в качестве стабилизирующей субфазы для некоторых водорастворимых белков, поверхностное давление в пленке с течением времени произвольно возрастает. Произвольный рост поверхностного давления в пленке, занимающей постоянную площадь, предполагает денатурацию белковых молекул вследствие стремления белковой глобулы к разворачиванию. В случае же использования в качестве субфазы воды или 10 мМ фосфатного буфера, рН 7,4, изменений, указывающих на денатурацию IgG на границе раздела фаз, не происходит. Довольно резкое снижение поверхностного давления в начальный момент времени вызвано, вероятно, сольватацией части молекул IgG, обусловленной их существенной гидрофильностью, и уходом некоторого количества белка в объем субфазы. При этом на поверхности воды молекулы IgG тонут сильнее, что вероятнее всего связано с влиянием рН или ионной силы. В обоих случаях в дальнейшем пленка стабилизируется, процесс произвольного падения поверхностного давления прекращается.

Влияние состава субфазы отражается и на форме РА-изотерм IgG (Рис.2), хотя во всех трех случаях в исследуемом диапазоне поверхностного давления происходит формирование плотно упакованного монослоя белка (рост давления при уменьшении занимаемой молекулой площади, отсутствие коллапса). Разница между тремя кривыми состоит в том, что в случае использования в качестве субфазы 1 М сульфата аммония расчетная площадь, занимаемая одной молекулой белка, оказывается в два раза выше и отсутствует изгиб, характерный для

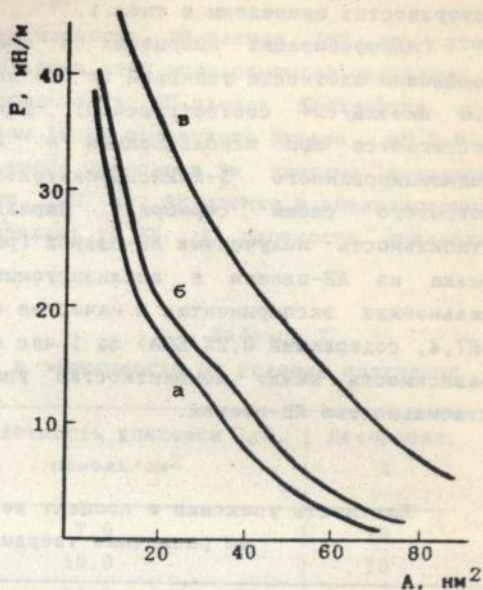


Рис. 2. P-A изотермы IgG на поверхности (а) воды; (б) 10 мМ фосфатного буфера, рН 7,4; (в) 1М сульфата аммония, рН 7,4

переориентации молекул в монослой в максимально компактную структуру. Значения площади, приходящейся на одну молекулу IgG после формирования пленки Лэнгмюра на субфазе из 10 мМ фосфатного буфера, рН 7,4 (32 нм²), соответствует опубликованным данным о размерах молекулы IgG (Amzel L.M. et al., 1979) в случае их вертикального расположения в монослой.

При переносе монослоев IgG на твердые подложки были получены мультислойные структуры с линейной зависимостью количества перенесенного белка от числа монослоев. Иначе говоря, плотность упаковки IgG в каждом монослое мультислойной ЛБ-пленки, перенесенной при одинаковых условиях на одинаковые твердые подложки, оказалась постоянной, что свидетельствует о хорошем качестве получаемых мультислоев. ИК-спектры ЛБ-пленок IgG на пластинках из прозрачного в ИК-области кварца показали отсутствие видимых изменений на уровне вторичной структуры белковых молекул.

При работе с белковыми ЛБ-пленками наиболее часто варьируемыми параметрами являются поверхностные свойства подложки (электрический заряд, гидрофобность), а также условия получения. Значения плотности упаковки белка в монослой ЛБ-пленок IgG на различных

поверхностях приведены в табл.1.

Гидрофобизация кварцевых и кремниевых подложек приводит к повышению плотности упаковки (с 6,5 до 8,0 пкмоль/см² и с 5,5 до 7,0 пкмоль/см² соответственно). Еще более высокая плотность достигается при использовании в качестве подложек кремния, модифицированного 3-аминопропилтриэтоксисиланом, или кремния, покрытого слоем серебра. Параллельно контролировалась и стабильность полученных ЛБ-пленок (рассчитывался процент десорбции белка из ЛБ-пленки в анализируемый раствор, использующийся в дальнейших экспериментах в качестве буфера (10 мМ фосфатный буфер, рН7,4, содержащий 0,2% БСА) за 1 час инкубации). Установлена прямая зависимость между компактностью упаковки IgG в монослое и стабильностью ЛБ-пленок.

Таблица 1

Плотность упаковки и процент десорбции IgG в ЛБ-пленках на различных твердых подложках

Поверхность	Плотность упаковки IgG, пкмоль/см ²	Десорбция, %
Кварц	6,5	20
ДДС-кварц	8,0	16
Ситал	4,0	37
Кремний	5,5	25
ДДС-кремний	7,0	15
АПС-кремний	10,0	10
Ag-кремний	14,0	10

ДДС и АПС - предварительная обработка кремниевых подложек диметилдихлорсиланом и 3-аминопропилтриэтоксисиланом соответственно.
Ag-кремний - кремний, покрытый слоем серебра

Для достижения более компактной упаковки IgG в монослое при получении ЛБ-пленок мы изменяли 2 параметра: поверхностное давление и рН субфазы. В обоих случаях низкая стабильность образцов была взаимосвязана с низкой плотностью IgG на поверхности подложки. Увеличение поверхностного давления или рН субфазы сопровождалось

ростом плотности упаковки, стабильность ЛБ-пленок IgG при этом также возрастала. Лучшие результаты этих экспериментов приведены в таблице 2, максимальная стабильность ЛБ-пленок достигнута при использовании в качестве субфазы 10 мМ фосфатного буфера, pH 8,8 и поверхностном давлении при переносе монослоев на твердые подложки 30 мН/м. При этом десорбция IgG из ЛБ-пленки в анализируемый раствор за 1 час инкубации снизилась до 3%, а плотность упаковки составила 14 пкмоль/см².

Таблица 2

Характеристики ЛБ-пленок IgG в зависимости от условий получения

Условия получения	Плотность упаковки IgG, пкмоль/см ²	Десорбция, %
ДДС-кремний, pH 7,4; 20мН/м	7,0	15
ДДС-кремний, pH 8,8; 20мН/м	10,0	10
ДДС-кремний, pH 8,8; 30мН/м	14,0	3

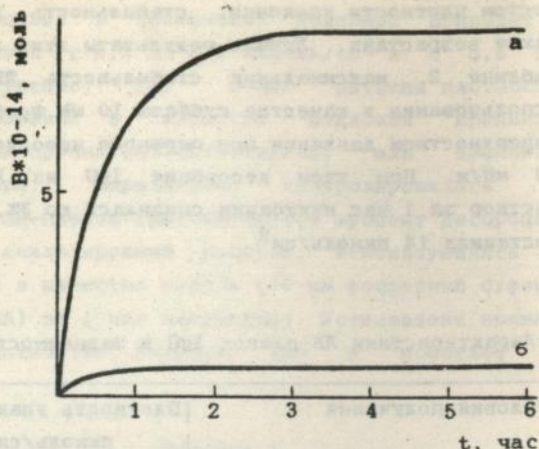
Таким образом, IgG способны формировать на границе раздела фаз пленку Ленгмюра - плотно упакованный монослой предположительно вертикально ориентированных молекул, который методом горизонтального касания может быть перенесен на различные твердые подложки с созданием мультислойных структур регулируемой толщины, стабильность которых возрастает с ростом плотности упаковки молекул IgG в монослой. Отсутствие выраженной денатурации белка в монослой предполагает сохранение им функциональной активности. Для IgG это прежде всего способность взаимодействовать с антигеном.

3. АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ЛБ-ПЛЕНОК IgG

О наличии у ЛБ-пленок IgG иммунохимической активности позволяют судить кинетические и калибровочные кривые связывания ¹²⁵I-антигенов.

Кинетика взаимодействия ферритина с ЛБ-пленками из 4 монослоев IgG, перенесенных на гидрофобизованные кремниевые пластинки, показана на рис.3. В качестве неспецифического здесь рассматрива-

Рис. 3. Кинетика связывания ^{125}I -антигенов ЛБ-пленками IgG: (а) IgG к ферритину + ферритин; (б) неиммунные IgG + ферритин

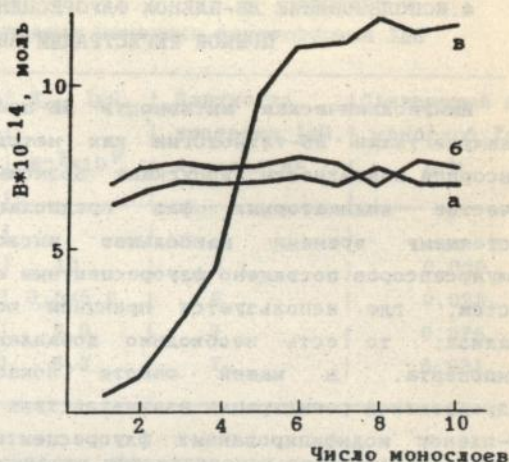


лось связывание ^{125}I -ферритина ЛБ-пленками неиммунных IgG. После двух часов инкубации соотношение сигнал/шум составило 13, причем 50%-ное связывание антигена достигалось за 20 минут.

Калибровочные кривые связывания ферритина ЛБ-пленками IgG (общей фракции и аффинно очищенных) на различных поверхностях строились в диапазоне концентраций добавленного антигена 10^{-11} - 10^{-9}M , большее количество ферритина связывали ЛБ-пленки с большей плотностью упаковки IgG в монослое, причем максимальное значение отношения связанный антиген/IgG верхнего слоя (моль/моль) при добавлении 2 пкмоль ^{125}I -ферритина в пробу составило 0,05 для общей фракции IgG и 0,15 для аффинно очищенных ферритинспецифичных антител, что находится в пределах опубликованных данных по иммунохимической активности твердых фаз, полученных методами физической адсорбции и ковалентной пришивки.

При рассмотрении антигенсвязывающей активности ЛБ-пленок IgG в зависимости от числа составляющих их монослоев были получены следующие результаты (рис. 4). На кремниевых и кварцевых подложках количество антигена, связанного ЛБ-пленкой IgG, не зависит от числа монослоев в ней, что соответствует представлению об ЛБ-пленке как о плотно упакованных слоях белковых молекул и позволяет сделать вывод о том, что в иммунохимической реакции с антигеном участвует лишь верхний слой IgG. При использовании же в качестве подложки серебря-

Рис. 4. Зависимость количества связанного антигена от числа монослоев в ЛБ-пленке IgG на различных поверхностях: (а) гидрофобизованный кремний; (б) гидрофобизованный кварц; (в) тонкая пленка Ag на кремнии



ной поверхности количество связанного антигена сначала очень мало (на уровне неспецифического), затем оно возрастает, достигая максимума у пленок из 6 монослоев, и далее остается постоянным. Вероятно, это связано с денатурирующим воздействием на IgG высокоэнергетической металлической поверхности. Удаление активного слоя IgG от поверхности серебра на расстояние нескольких монослоев, где действие критического поверхностного натяжения прекращается, приводит к восстановлению антигенсвязывающей способности. Следовательно, с использованием ЛБ-технологии возможно создание прямого оптического иммуносенсора на основе метода поверхностного плазмонного резонанса. К настоящему времени макеты иммуносенсоров, использующих поверхностный плазмонный резонанс, представлены лишь обратными системами, где иммобилизованные традиционными методами на поверхности напыленного на кремниевую пластинку слоя серебра IgG выступают в роли антигенов, то есть регистрируется их взаимодействие с антивидами антителами.

Итак, молекулы IgG в ЛБ-пленке сохраняют иммунохимическую активность, она находится в пределах антигенсвязывающей способности твердых фаз, пролучаемых традиционными методами иммобилизации, и не зависит от числа монослоев в ЛБ-пленке. Исключение составляет серебряная поверхность, где увеличением числа монослоев может быть предотвращена денатурация активного слоя IgG.

4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛБ-ПЛЕНОК ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫХ IgG ДЛЯ ПРЯМОЙ РЕГИСТРАЦИИ АНТИГЕНА

Имунохимическая активность ЛБ-пленок IgG в сочетании с преимуществами ЛБ-технологии как метода иммобилизации белков на сенсорной поверхности допускают возможность их использования в качестве индикаторных фаз предполагаемых иммуносенсоров. К настоящему времени наибольшее число работ по созданию иммуносенсоров посвящено флуоресцентным системам. В отличие от этих систем, где используются принципы конкурентного или сэндвич-анализа, то есть необходимо добавление в пробу меченного компонента, в нашей работе показана возможность прямой безреагентной регистрации взаимодействия антиген-антитело на основе ЛБ-пленок модифицированных флуоресцентными красителями IgG. В качестве флуоресцентных меток использовались пара ФИТЦ/РИТЦ, КПІ и ДАНС-хлорид.

Модификацию IgG флуоресцентными красителями осуществляли по ϵ -аминогруппам остатков лизина, поскольку модификация COOH- и OH-групп, углеводного компонента приводит к снижению антигенсвязывающей активности, а восстановление дисульфидной связи - к лабильности молекулы антител. Предварительно проводилась модификация IgG ^{14}C -малеиновым ангидридом. С помощью иммуноферментной конкурентной тест-системы показано, что модификация до 24 аминокислотных групп в молекуле IgG не приводит к изменениям константы связывания антигена. Следовательно, модификация NH_2 -групп IgG удобна для включения в молекулу метки и какие-либо изменения в проявлении иммуноглобулинами G Fab-активности после модификации аминокислотных групп следует связывать либо с природой конкретного модификатора, либо с влиянием условий реакции модификации. Данные по антигенсвязывающей способности IgG, модифицированных ФИТЦ, РИТЦ, КПІ и ДАНС-хлоридом, приведены в таблице 3. Здесь же показаны плотность упаковки и иммунохимическая активность полученных из них ЛБ-пленок.

Рассматривая возможность использования смеси IgG, меченных ФИТЦ, и IgG, меченных РИТЦ (ФИТЦ/РИТЦ-IgG), для прямой регистрации антигена, мы исходили, во-первых, из того, что плотность упаковки белка в ЛБ-пленке достаточно высока, чтобы между данными флуорофорами мог осуществляться безызлучательный перенос энергии флуоресценции, в котором ФИТЦ выступал бы донором, а РИТЦ - акцеп-

Таблица 3

Характеристики ЛБ-пленок меченных флуорофорами IgG

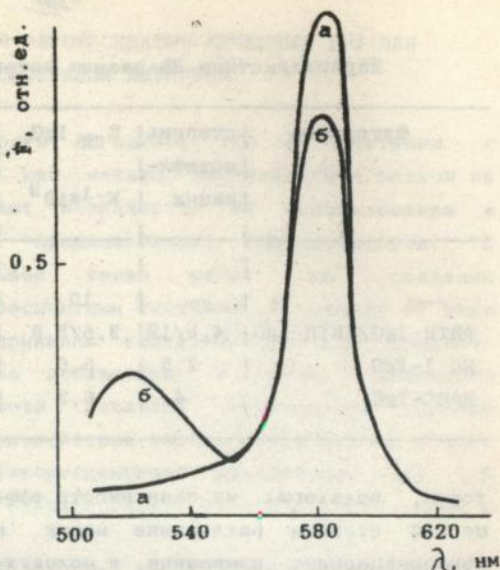
Флуорофор	степень модифи- кации	K _{св} IgG, М-1×10 ⁹	Плотность упаковки IgG, пкмоль/см ²	Связанный АГ/ монослой IgG, М/М
—	—	10	8	0,050
ФИТЦ-IgG/РИТЦ-IgG	4,5/12	3,5/5,8	9	0,023
КП I-IgG	2,5	5,0	7	0,026
ДАНС-IgG	4	6,3	7	0,031

тором, во-вторых, из зависимости эффективности переноса энергии от шестой степени расстояния между метками, в связи с чем конформационные изменения в молекуле антител при взаимодействии с антигеном, сопровождающиеся изменением этого расстояния, могут отражаться на форме спектров флуоресценции.

При возбуждении ЛБ-пленок ФИТЦ/РИТЦ-IgG светом с длиной волны, поглощаемой ФИТЦ (470 нм), в спектрах флуоресценции действительно наблюдался безызлучательный перенос энергии флуоресценции, отсутствующий в растворе. Эффективность его зависела от молярного соотношения названных флуорофоров. В качестве оптимального было избрано соотношение РИТЦ/ФИТЦ, равное 8:1, при котором, начиная с ЛБ-пленок из 3 монослоев, пик флуоресценции ФИТЦ гасился полностью, а 90% интенсивности РИТЦ обуславливалось переносом энергии с ФИТЦ. При дальнейшем увеличении числа монослоев в ЛБ-пленке интенсивность флуоресценции РИТЦ возрастала линейно.

Взаимодействие ЛБ-пленки из 3 монослоев ФИТЦ/РИТЦ-IgG с антигеном (ферритином) сопровождалось снижением эффективности переноса энергии: в спектре флуоресценции появлялся пик с максимумом в области 520 нм, соответствующий эмиссии ФИТЦ (рис.5). Снижение эффективности переноса энергии может быть следствием конформационных изменений в молекуле IgG, либо эффектов экранирования высокомолекулярным антигеном флуоресцентных меток. В любом случае изменения носили специфический характер, поскольку погружение таких пленок в контрольный раствор БСА не приводило к

Рис. 5. Спектры флуоресценции
 ЛБ-пленок ФИТЦ/РИТЦ-IgG
 (а) до взаимодействия;
 (б) после взаимодействия
 с антигеном
 $\lambda_{\text{возб}} = 470 \text{ нм}$



отклонениям в форме спектра.

Выбор копропорфириновой и дансильной меток для исследования возможности прямой регистрации антигена с помощью ЛБ-пленок IgG связан с тем, что параметры флуоресценции данных хромофоров зависят от полярности микроокружения и, следовательно, при образовании комплекса антиген-антитело могут изменяться.

При активации КП реагентом Вудворда К была получена смесь моно- и дизамещенных производных КП, по данным тонкослойной хроматографии, очищенных от избытка реагента Вудворда К и непрореагировавшего КП. Обработка данной смесью IgG в водном растворе приводила к ковалентному связыванию КП с белком.

Сравнение флуоресцентных характеристик копропорфириновой метки в трех различных состояниях (свободный КП, КП-IgG в растворе и в ЛБ-пленке) дало следующие результаты. В спектрах флуоресценции названных образцов наблюдалось смещение наиболее интенсивной полосы флуоресценции с 613 нм у свободного КП и 616 нм у КП-IgG в растворе до 621 нм у КП-IgG в ЛБ-пленке из одного монослоя. Кроме того, в спектре раствора КП-IgG появлялся низкоинтенсивный пик, а в спектре монослоя КП-IgG - новая полоса флуоресценции в области 646 нм, отражающая, вероятно, стремление КП к ассоциации при его пространственной фиксации. Время жизни флуорес-

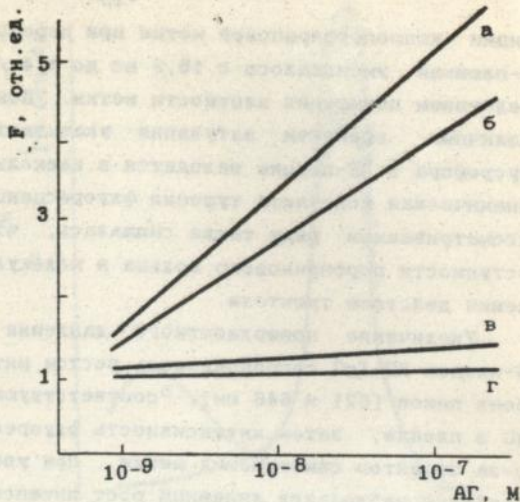
ценции копропорфириновой метки при переходе от свободного КП к ЛБ-пленкам уменьшалась с 15,9 нс до 1,4 / 6,4 нс, что может быть следствием повышения плотности метки. Появление двух компонент с различным временем затухания указывает на то, что молекулы флуорофора в ЛБ-пленке находятся в нескольких различных окружениях. Динамическая константа тушения флуоресценции КП ионами I^- в рассматриваемом ряду также снижалась, что указывает на уменьшение доступности порфиринового кольца в молекуле IgG, а затем и в ЛБ-пленке действию тушителя.

Увеличение поверхностного давления до 25 мН/м при получении ЛБ-пленок КП-IgG сопровождалось ростом интенсивности флуоресценции обоих пиков (621 и 646 нм), соответствующем упорядочиванию молекул IgG в пленке, затем интенсивность флуоресценции падала, возможно, из-за эффектов самотушения метки. При увеличении числа монослоев в ЛБ-пленке наблюдался линейный рост интенсивности флуоресценции.

Взаимодействие ЛБ-пленок КП-IgG с антигеном (ферритин) приводило к дополнительному снижению константы тушения и росту интенсивности флуоресценции. Относительный прирост интенсивности флуоресценции после взаимодействия с антигеном экспоненциально уменьшался с ростом числа монослоев в ЛБ-пленке, что подтверждает сделанный выше вывод об участии в реакции с антигеном лишь верхнего слоя IgG. На рис.6 показаны зависимости между интенсивностью флуоресценции (621 нм) монослоя КП-IgG и концентрациями соответствующих антигенов: ферритина, тиреоглобулина и тестостерона. В качестве контрольной приводятся значения интенсивности флуоресценции неиммунных IgG после инкубации с ферритином. Прирост интенсивности флуоресценции наблюдается в диапазоне концентраций 10^{-7} - 10^{-9} М для высокомолекулярных антигенов, но отсутствует с гаптенем.

Из рисунка видно, что для получения значительных изменений флуоресценции необходимы большие избытки антигенов, то есть описанная система требует для своей практической реализации значительного повышения соотношения сигнал/шум, а также увеличения чувствительности. Тем не менее, грубое определение различных концентраций высокомолекулярных антигенов с помощью данного подхода возможно. Следовательно, измерения интенсивности флуоресценции ЛБ-пленок КП-IgG может быть использовано при разработке иммуносенсора для прямой регистрации высокомолекулярных антигенов.

Рис. 6. Зависимость интенсивности флуоресценции монослоя КПИ-IgG после взаимодействия с антигеном от концентрации добавленного антигена: (а) антиферритин-IgG + ферритин; (б) анти-тиреоглобулин-IgG + тиреоглобулин; (в) анти-тестостерон-IgG + тестостерон; (г) неиммунные IgG + ферритин



Реакция включенной в молекулу IgG дансильной метки на изменение микроокружения выразалась в 29-кратном (в пересчете на суммарное количество хромофора) увеличении интенсивности ДАНС-IgG в ЛБ-пленке по сравнению с раствором. Кроме того, в ЛБ-пленке наблюдалось смещение максимума флуоресценции ДАНС в коротковолновую область (с 530 до 505 нм). Вероятно, эти изменения обусловлены вытеснением полярных молекул воды из окружения дансила в плотно упакованных монослоях.

Взаимодействие ЛБ-пленок ДАНС-IgG с антигеном не отражалось на интенсивности флуоресценции, происходило лишь некоторое дополнительное голубое смещение максимума (с 505 до 490 нм). Возможно, это связано с ростом интенсивности флуоресценции в пленках по сравнению с раствором, иначе говоря, окружение ДАНС в ЛБ-пленках оказывается настолько благоприятным для эмиссии флуоресценции данного хромофора, что дополнительное вытеснение растворителя антигеном уже не влияет на интенсивность флуоресценции, а лишь несколько отражается на ее максимуме.

Итак, в результате проведенных исследований обнаружены эффекты, позволяющие сделать вывод о возможности прямой безреагентной детекции антигена в ЛБ-пленках флуоресцентно меченных IgG: получены модели флуоресцентных систем, реагирующих на взаимодействие антиген-антитело а) снижением эффективности переноса

энергии между входящими в состав индикаторной фазы донором и акцептором флуоресценции (ФИТЦ/РИТЦ-IgG); б) увеличением интенсивности флуоресценции (КП-IgG).

5. ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЕТЕКЦИИ АНТИГЕНА НА ОСНОВЕ ЛБ-ПЛЕНОК ФЕРРИТИНСПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ

В отличие от предложенных выше прямых методов детекции антигена на основе измерения параметров входящих в состав индикаторной фазы флуоресцентных меток, в немеченных иммуносенсорных системах регистрируемый преобразователем сигнал должен обеспечиваться исключительно иммунохимической специфичностью антитела к соответствующему антигену.

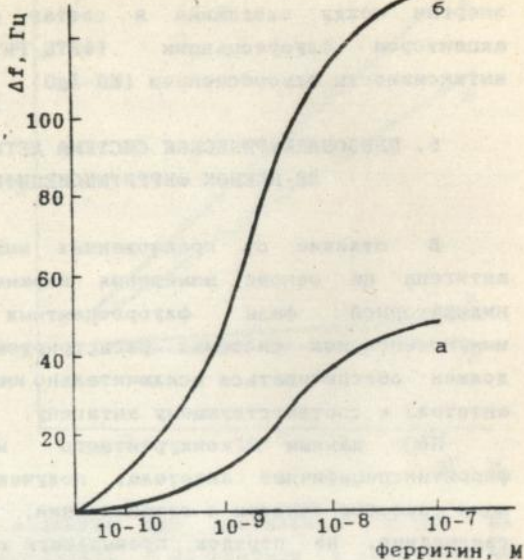
По данным конкурентного иммуноферментного анализа, ферритинспецифичные антитела, полученные с помощью предложенных нами способов очистки и стабилизации, имеют усредненную константу связывания, на порядок превышающую константу связывания антигена общей фракции IgG. Для сравнения аналитических параметров индикаторных фаз на основе ЛБ-пленок суммарных и аффинно очищенных IgG в качестве модели была избрана пьезоэлектрическая система, в основе которой лежит зависимость резонансной частоты колебаний пьезокристалла от дополнительной массы на его поверхности.

Монослой общей фракции и аффинно очищенных IgG при поверхностном давлении 20 мН/м переносили на поверхность кварцевого резонатора и измеряли частоту колебаний в системе, включающей источник питания, генератор колебаний, резонатор и частотомер. Точность измерений составляла ± 1 Гц. Увеличение числа монослоев в ЛБ-пленке приводило к линейному снижению частоты колебаний резонатора, при этом добавление одного монослоя IgG к ЛБ-пленке как аффинно очищенных, так и общей фракции IgG сопровождалось изменением частоты колебаний в среднем на 130 Гц.

Взаимодействие нанесенной на поверхность кварцевого резонатора ЛБ-пленки из 4 монослоев IgG с антигеном (ферритин) вызывало дальнейшее снижение частоты колебаний кварцевого резонатора (Δf). Зависимость Δf от концентрации антигенов в растворе для кварцевых резонаторов, содержащих ЛБ-пленки общей фракции IgG и ферритинспецифичных антител представлены на рис.7, (а) и (б) соответственно.



Рис. 7. Изменение частоты колебаний кварцевого резонатора с нанесенными на него ЛБ-пленками после взаимодействия с антигеном: (а) ЛБ-пленки общей фракции IgG; (б) ЛБ-пленки аффинно очищенных ферритинспецифичных антител



Как видно из рисунка, в случае использования в качестве индикаторной фазы ЛБ-пленок аффинно очищенных антител чувствительность системы по сравнению с ЛБ-пленками общей фракции IgG возрастает, диапазон определяемых концентраций ферритина расширяется.

Следовательно, ЛБ-пленки IgG могут быть использованы для прямой регистрации антигена в пьезоэлектрической системе. Аналитические характеристики данной системы определяются константой связывания используемых для получения ЛБ-пленок антител.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально доказан факт формирования молекулами IgG на границе раздела фаз вода/воздух плотно упакованного монослоя. Оптимизированы условия переноса монослоя IgG на твердые подложки. Показано, что степень десорбции IgG из ЛБ-пленки в анализируемый раствор зависит от рода поверхности подложки, условий получения монослоев, увеличение плотности упаковки молекул IgG в ЛБ-пленке приводит к повышению ее стабильности.
2. Установлено, что IgG в ЛБ-пленке сохраняют антигенсвязывающую

активность. Количество связываемого пленкой антигена не зависит от числа монослоев. Иммунохимически активен только верхний слой IgG.

3. Показано, что для ЛБ-пленок IgG на поверхности напыленного в вакууме серебра удаление активного слоя IgG от металлической поверхности путем увеличения числа монослоев в ЛБ-пленке приводит к восстановлению антигенсвязывающей способности. Обнаруженная зависимость может быть использована для создания прямых иммуносенсоров на основе метода поверхностного плазмонного резонанса.
4. Исследована возможность прямой детекции антигена с помощью ЛБ-пленок модифицированных флуоресцентными красителями IgG. Показано, что после взаимодействия с антигеном в ЛБ-пленках ФИТЦ/РИТЦ-IgG снижается эффективность переноса энергии; в ЛБ-пленках КП-IgG уменьшается константа тушения и увеличивается интенсивность флуоресценции; в ЛБ-пленках ДАНС-IgG интенсивность флуоресценции не изменяется, но наблюдается некоторое смещение максимума в коротковолновую область.
5. Предложена модель флуоресцентной индикаторной фазы для прямого количественного определения высокомолекулярных антигенов, основанного на увеличении интенсивности флуоресценции ЛБ-пленок из монослоя КП-IgG после их взаимодействия с антигеном.
6. Разработаны способ получения и способ стабилизации ферритинспецифичных антител с усредненной $K_{св}$ на порядок превышающей $K_{св}$ общей фракции IgG.
7. Предложена модель пьезоэлектрического сенсора для определения концентрации ферритина. Экспериментально обоснована возможность улучшения аналитических характеристик иммуносенсорных систем путем использования в качестве биоматериала индикаторной фазы ЛБ-пленок аффинно очищенных антител.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Марцев С.П., Лепешева Г.И., Чейкина А.В., Кириллова Н.М., Жоров О.В., Прейгерзон В.А., Чащин В.Л. Антигенсвязывающие свойства антител, меченных изотопными, ферментными и флуоресцентными метками, в двухцентровых иммунохимических системах // Всесоюз. симп "Структура, биосинтез и функции молекулярных элементов иммунной системы": Пудино. 1987. с.59.
2. А.с. N 1505195 МКИ⁴ G 01 N 33153 (СССР) / Способ получения фер-

ритинспецифичных антител / Марцев С. П., Лепешева Г. И., Гапеева Е. Б.

3. А. с. N 1503508 МКИ⁴ G 01 N 331531 (СССР) / Способ получения ферритинспецифичных антител // Марцев С. П., Лепешева Г. И., Чейкина А. В., Василевский В. И., Пивень Н. В., Вигдорович И. П.
4. Turko I. V., Lepesheva G. I., Chashchin V. L. Direct fluoroimmunoassay in Langmuir-Blodgett films of IgG // International Conference on Optical Fibre Sensors: Abstracts, Wuhan, China, 9-16 October, 1991.-Wuhan, 1991. P.85-86.
5. Turko I. V., Lepesheva G. I., Chashchin V. L. Direct fluoroimmunoassay in Langmuir-Blodgett films of immunoglobulin G // SPIE.-1991.- V.1572.- P.419-423.
6. Turko I. V., Lepesheva G. I., Chashchin V. L. Direct antigen detection in Langmuir-Blodgett films of fluorescently labeled immunoglobulin G // 1st European Conference on optical Chemical sensors and Biosensors: Abstracts, Grazes Congress, Austria, April, 12-15, 1992.-Graz, 1992. P.165.
7. Turko I. V., Lepesheva G. I., Chashchin V. L. Direct antigen detection in Langmuir-Blodgett films of IgG modified with coproporphyrin I // Anal.Chim.Acta.-1992.- V.265.- P.21-26.
8. Лепешева Г. И., Турко И. В., Шестаков В. Л., Чашин В. Л. IgG, модифицированный КП I, и возможность прямой регистрации комплекса антиген-антитело // Биохимия.-1993.- Т.58, N6.- С.938-944.
9. Turko I. V., Lepesheva G. I., Chashchin V. L. Stability and stabilization of immunoglobulin G Langmuir-Blodgett films // Thin Solid Films.-1993.-N230.- P.70-72.
10. Lepesheva G. I., Turko I. V., Chashchin V. L. Langmuir-Blodgett films of Immunoglobulin G as immunosensing elements// Conf.on Biomed.and Med.Sensors: Abstracts, Budapest, Hungary, September, 3-8, 1993.- Budapest, 1993. P.148.

Подписано в печать 3.10.93. формат 60x84/16. Зак.68. Тираж 100 экз.

Отпечатано на ротапринте Института геологии, геохимии и геофизики АН Беларуси.
220141. Минск, ул.Жодинская,7.



440196

AB 36.485

AB 36.485