

О. Б. КУЗОВЛЕВА

**ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ПРИ ПОМОЩИ НОВЫХ
ИММУНОСОРБЕНТОВ, СПОСОБНЫХ ПРИСОЕДИНЯТЬ БОЛЬШИЕ
КОЛИЧЕСТВА АНТИГЕНА**

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 17 VI 1971)

Одновременно с синтезом иммуносорбентов, в состав которых входили антигены, предпринимались попытки синтеза сорбентов, в состав которых входили антитела (¹⁻¹¹). Синтез их осуществлялся либо путем «сшивания» белков антисыворотки различными биполярными реагентами (^{2, 3}), либо присоединением антител к нерастворимой основе, а именно к полистиролу (¹), целлюлозе (^{5, 6}), агарозе или сефарозе (^{7, 8}). Большое количество работ в этой области связано с тем, что применение таких сорбентов открывает совершенно новые методические возможности не только для иммунохимических, но и биохимических и, вероятно, химических работ.

Перевод антител в нерастворимое состояние с сохранением их биологической активности может дать возможность: 1) быстро и полно удалять из сложной смеси любой антиген в физиологических условиях без добавления каких-либо химических агентов, 2) определять количество индивидуальных антигенов в сложной смеси; 3) извлекать антигены или гаптены из комплекса с сорбентом и получать эти препараты в чистом виде.

Таблица 1

Свойства иммуносорбентов, в состав которых входит антитела, в зависимости от условий синтеза

№№ сорбентов	Условия синтеза			Свойства сорбентов					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	200	—	2,0	274	140	4200	200	1,2	4,4
2	400	—	1,5	70	70	430	100	2,2	6,1
3	400	—	0,6	43	50	560	71	2,6	13,0
4	—	600	2,7	315	130	670	186	1,0	2,1

Примечание. 1, 2 — количество ОЭСАА (1) или НБОМШ (2) в мг, взятое в реакцию на 1 г агара; 3 — конечная концентрация кроличьих антител против САЧ в реакции с производными агара в %; 4 — количество кроличьих антител в мг, вошедшее в состав 1 г сорбента; 5, 6 — емкость в мг (количество антигена (САЧ) (5) и ослиных антител против кроличьих иммуноглобулинов (6), которое может обратимо присоединиться на 1 г сорбента); 7 — молярная емкость, т. е. количество антигена (в 10^{-8} мол.), которое может присоединиться на 1 г сорбента; 8, 9 — количество (в мол.) антигена (8) и ослиных антител (9), которое может присоединиться на 1 моль антител, входящих в состав сорбента

Отсюда следует, что иммуносорбенты должны быть устойчивыми к изменению рН, обладать низкой неспецифической адсорбцией и высокой емкостью по отношению к соответствующему антигену. Если первым двум условиям отвечали большинство описанных ранее сорбентов, то емкость их была невелика; поэтому такие сорбенты можно использовать, например, при работе с применением высокочувствительных изотопных методов или при работе с ферментами, гормонами и т. д.

Целью настоящей работы явилась синтез высокочувствительных иммуносорбентов

тов, в состав которых входят антитела, и применение их для выделения чистых антигенов.

Нами было показано, что емкость иммуносорбента не зависит от природы вещества-связки, входящего в его состав ⁽¹²⁾, а в основном зависит от суммарной поверхности сорбентов.

Увеличивая поверхность, нам удалось увеличить емкость иммуносорбентов в 30—100 раз ^(13, 14). В том случае, когда в состав иммуносорбента входят антитела, эта зависимость должна проявляться в гораздо большей

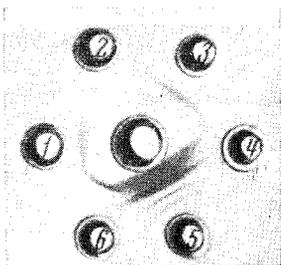


Рис. 1. Препитация в агаре элюатов, полученных с иммуносорбента № 4 (табл. 1). В центре — лошадиная антисыворотка против цельной сыворотки человека. В лунках: 1, 3 — кристаллический САЧ 50 мг/мл и 100 мг/мл соответственно; 5 — сыворотка человека, разведение 1 : 4; 2, 4, 6 — элюаты с сорбента после контакта его с 0,85% NaCl (2), дифтерийным анатоксином (4) и сывороткой человека (6)

степени, поскольку антитела лишь двухвалентны по отношению к антигену, в то время как антигены являются поливалентными. В качестве основы для синтеза высокочемических иммуносорбентов мы выбрали гель и, в частности, гель агара. Приведенные нами ранее опыты показали, что на каждую молекулу сывороточного альбумина человека (САЧ), входящего в состав гель-сорбента, присоединяется по 2—5 молекул антител ⁽¹⁵⁾. Это свидетельствовало о том, что антиген, присоединенный к углеводу, имеющему непрерывную сетчатую структуру геля, в большей степени сохраняет свою способность реагировать с антителами, чем тот же антиген, фиксированный, например, на целлюлозе. Кроме того, агар устойчив к изменению pH, образует плотный гель в низкой концентрации (1%), что делает его легко проницаемым для молекул любой величины. Предварительные опыты показали, что на 1 г гель-сорбента, в состав которого входили антитела против САЧ, присоединялось до 140 мг САЧ ⁽¹⁵⁾.

Настоящая работа является продолжением этих исследований.

Синтез эфиров агара с остатками хлористого N-(*m*-нитробензилокси)-метилпиридиния (НБОМП) или сернокислого эфира 4-β-оксиэтилсульфонил-2-аминноанизола (ОЭСАА) проводился так же, как было описано нами ранее ⁽¹⁵⁾. Для приготовления сорбентов использовались разные соотношения агара с указанными веществами (табл. 1). Из полученных производных агара готовили 1% гель, к которому после диазотирования ⁽¹⁵⁾ присоединяли антитела. Полученный сорбент отмывали от несвязавшихся антител до отсутствия белка ^(16, 17) в надосадочной жидкости после ночи настаивания в 0,85% NaCl при 4°. О количестве присоединившихся к сорбенту антител судили по убыли их в растворе после реакции.

Антитела против САЧ, вводимые в реакцию азосочетания с агаром, в этих опытах были выделены из сыворотки кроликов, иммунизированных САЧ или донорской сывороткой. Для этого были синтезированы соответствующие иммуносорбенты. Элюцию антител с них проводили 0,01 N HCl в 0,85% NaCl (pH 2,2). Элюат нейтрализовали 0,1 N NaOH, добавляли борно-боратный буфер (pH 8,6; $\mu = 0,15$) и полученные антитела сразу вводили в реакцию азосочетания с гелем агара.

Емкость приготовленных таким образом сорбентов определяли по методу, описанному ранее ^(17, 18) с небольшими изменениями. А именно, отмывку сорбентов проводили на бумажных фильтрах под вакуумом. Эти фильтры помещали затем в 2 мл 0,1 N HCl и в элюатах определяли количество белка ^(16, 17).

Полученные данные представлены в табл. 1. Как видно, емкость сорбентов зависит как от концентрации антител, взятых в реакцию с эфиром агара, так и от способа приготовления последних. Наиболее емкие оказались способными обратимо присоединять 130—140 мг САЧ на 1 г своего

веса. Эти количества соизмеримы с количеством антигена в преципитатах. Так, на 1 г антител, входящих в состав преципитата в зоне эквивалентности, приходится, например, 310 мг сывороточного альбумина крыс или 133 мг яичного альбумина (¹⁹).

В опытах при определении емкости всегда ставился контроль на неспецифическую адсорбцию. В качестве неспецифического белка к сорбенту добавляли дифтерийный анатоксин. Разницы в количестве белка, отщепившегося от сорбента, контактировавшего с анатоксином и с 0,85% NaCl, нам обнаружить не удалось. Это свидетельствует об очень незначительной неспецифической адсорбции сорбентов.

Для выделения антигена к 54 мг иммуносорбента № 4 (табл. 1) при pH 7 добавляли 5 мл донорской сыворотки. Смесь оставляли на ночь при 4°. После этого сорбент отмывали на бюкхеровской воронке 0,85% NaCl, pH 7. Для элюции антигена на ту же воронку добавляли HCl-глициновый буфер pH 2,2 (³) и через 10—15 мин. раствор отсасывали, а сорбент промывали еще несколькими порциями свежего буфера. Элюаты диализовали против дистиллированной воды и в них определяли белок (¹⁶). Сорбент же промывали 0,85% NaCl, pH 7 до нейтральных промывных вод, добавляли новую порцию донорской сыворотки и процедуру повторяли. При использовании свежего сорбента удалось выделить 5,76 мг САЧ, а при повторном выделении с помощью того же сорбента 4,42 мг САЧ. Таким образом, с помощью 54 мг сорбента, в состав которого входит 17 мг антител против САЧ, за 2 раза удалось выделить 10,18 мг белка-антигена (САЧ).

Как видно на рис. 1, методом преципитации в агаре ясно обнаруживается линия САЧ в элюате с иммуносорбента. Методом иммунофореза выявляется также лишь одна линия САЧ.

Была проведена специальная серия опытов методом преципитации в агаре с целью исследования чистоты выделенного препарата САЧ. Антигенов, неспецифически связавшихся с сорбентом, в препарате обнаружить не удалось. Возможная примесь не превышает 1% от общего белка.

Таким образом, предлагаемые иммуносорбенты могут использоваться для одноступенчатого выделения больших количеств антигенов, практически свободных от неспецифических примесей.

Необходимо отметить, что количество антигена, выделяемого с помощью иммуносорбентов, в большой степени зависит от молекулярного веса этого антигена. Чем больше молекулярный вес антигена, тем большее его количество присоединяется к одному и тому же количеству антител. Поэтому для характеристики иммуносорбентов, в состав которых входят антитела, целесообразно ввести вместе с понятием «емкость» понятие «молярная емкость». Молярной емкостью можно предложить называть количество молей антигена, умноженное на 10^{-8} , способное обратимо присоединиться на 1 г сухого веса сорбента.

По молярной емкости предлагаемые иммуносорбенты примерно на порядок превосходят описанные до сих пор.

Следует добавить, что поскольку антитела с совершенно различной иммунологической специфичностью не отличаются по своим химическим свойствам, предложенный метод синтеза является универсальным для получения сорбентов любой специфичности.

Нами было показано, что иммуносорбенты, синтезированные на основе агарового геля, сохраняют свойства этого геля и могут быть использованы для любых реакций в геле (¹⁵). Это открывает совершенно новые возможности применения описанных выше сорбентов.

Приношу глубокую благодарность А. И. Гусеву за приведенные исследования чистоты выделенного нами препарата.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. H. Kent, J. H. R. Slade, *Nature*, **183**, 325 (1959). ² S. Avrameas, Th. Ternynck, *Immunochem.*, **6**, 1, 53 (1969). ³ J. W. Chidlow, J. Stephen, H. Smith, *Biochem. J.*, **117**, 1, 49 (1970). ⁴ A. T. Yagendorf, A. Patchornik, M. Sela, *Biochim. et biophys. acta*, **78**, 516 (1963). ⁵ О. В. Рохлин, Р. С. Незлин, *Вопр. мед. хим.*, **15**, 439 (1969). ⁶ T. O. Anderson, R. H. Zschocke, G. L. Bach, *J. Immunol.*, **105**, 1, 146 (1970). ⁷ В. Bonavida, S. Fuchs, M. Sela, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 5, 1335 (1970). ⁸ J. Akanuma, T. Kuzuya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 5, 947 (1970). ⁹ S. S. Stone, C. R. Williams, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **71**, 386 (1957). ¹⁰ А. М. Оловников, *ДАН*, **158**, 1202 (1964). ¹¹ J. H. Silman, E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 873 (1966). ¹² О. Б. Кузовлева, А. Е. Гурвич и др., *Вопр. мед. хим.*, **12**, 1, 106 (1966). ¹³ А. Е. Гурвич, О. Б. Кузовлева, А. Е. Туманова, *Биохимия*, **26**, 934 (1961). ¹⁴ О. Б. Кузовлева, А. Е. Гурвич, *Вопр. мед. хим.*, **12**, 3, 316 (1966). ¹⁵ О. Б. Кузовлева, *Вопр. мед. хим.*, **18**, 2, 166 (1972). ¹⁶ O. N. Lowry, N. J. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951). ¹⁷ А. Е. Гурвич, О. Б. Кузовлева, В кн.: *Иммунохимический анализ*, М., 1968, стр. 54. ¹⁸ А. Е. Гурвич, О. Б. Кузовлева, А. Е. Туманова, *Биохимия*, **27**, 246 (1962). ¹⁹ О. Б. Кузовлева, В кн.: *Иммунохимический анализ*, М., 1968, стр. 44 и 46.