

ХИМИЯ

УДК 547.92+547-386

*А. Л. САВЧУК, О. С. КУПРИЕНКО, Р. П. ЛИТВИНОВСКАЯ, О. В. СВИРИДОВ,
академик В. А. ХРИПАЧ*

**НОВЫЙ ПОДХОД К ИММУНОХИМИЧЕСКОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ
БРАССИНОСТЕРОИДОВ***Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск**Поступило 15.12.2014*

Введение. Брассиностероиды выполняют функции низкомолекулярных биорегуляторов в растениях [1]. Количественное определение этих фитогормональных стероидов важно для выяснения особенностей их естественного распределения и закономерностей метаболизма в растениях, а также для целей эффективного применения синтетических фитогормонов в качестве агропрепаратов, лекарственных средств и биологических добавок. Наиболее чувствительным, специфичным и удобным методом определения концентрации брассиностероидов в природных объектах и биопрепаратах в настоящее время является иммуноферментный анализ (ИФА) [2–5]. Однако использование ИФА при исследовании растительных экстрактов имеет ряд ограничений. Так, вместе с брассиностероидами в раствор могут переходить различные соединения растительного происхождения, которые имеют возможность выступать в роли конкурирующих антигенов и/или взаимодействовать с антителами или ферментом, частично ингибируя их активность. Этим обусловлена необходимость предварительной очистки экстракта и выделения стероидов. Для уменьшения влияния матрикса предложен другой подход к проведению ИФА. На первой стадии анализа проводят биоспецифическую адсорбцию стероидов иммобилизованными в лунках планшета антителами, а затем добавляют ферментный конъюгат. Такой вариант ИФА хоть и является более сложным, но позволяет существенно упростить подготовку образца растительного происхождения [6].

Лантанидный иммунофлуориметрический анализ (ЛИФМА), в котором в качестве метки вместо фермента используется комплексопат редкоземельного металла, в частности Eu^{3+} , а флуоресцентный сигнал лантанида регистрируется в условиях затухшей фоновой флуоресценции реакционной среды, может выступать в качестве альтернативы ИФА при количественном определении малых биомолекул в сложных смесях. Предложены системы ЛИФМА для определения стероидных гормонов животного происхождения: кортизола [7], прогестерона [8], тестостерона и эстрадиола [9]. Тест-система для определения кортикостероида 17- α -гидроксипрогестерона в сухом пятне крови методом ЛИФМА в формате коммерческого набора реагентов широко используется в клинико-диагностических лабораториях при проведении скрининговых обследований новорожденных [10; 11]. В литературе нет сведений о ЛИФМА брассиностероидов, хотя описаны флуоресцентные конъюгаты 24-эпикастастерона с нитробензофурозаном, 24-эпибрассинолида с индолилуксусной кислотой [12], кастастерона с дансилкадаверином [13], пригодные для обычного иммунофлуориметрического анализа. Особенности используемого в ЛИФМА детектируемого соединения, в принципе, могут существенно уменьшить матрикс-эффект при определении брассиностероидов в растительных экстрактах. Кроме того, синтез брассиностероидов, меченных органическими комплексами редкоземельных металлов, и исследование их взаимодействий с полипептидами (антитела, транспортные белки, рецепторы) позволяют не только расширить арсенал методов количественного определения, но и получить новые реагенты для изучения фитогормональной функции брассиностероидов в растениях и у животных.

Цель работы – разработка нового подхода для определения брассиностероидов на примерах 24-эпикастастерона и 24-эпибрассинолида, а также получение реагентов полезных в исследованиях белоксвязывающих активностей этих фитогормонов с использованием биоконъюгатов на основе комплексонов европия в качестве молекулярных меток.

Материалы и методы исследования. N-сукцинимидный эфир 6-(О-карбоксиметил)оксима 24-эпикастастерона (**1**), а также Eu^{3+} -комплексонаты N^1 -(2-аминоэтил)амида (**2**) и N^1 -(2-(*n*-сукцинимидилкарбокси)бензоиламино)этиламида (**4**) диэтилентриаминпентауксусной кислоты, необходимые для получения конъюгатов, синтезированы, как описано ранее [2; 14].

На всех стадиях синтеза конъюгатов и при выполнении ЛИФМА применяли воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 Мом · см, очищенную в модульной установке Water Pro Plus (Labconco, США). На стадии измерения интенсивности флуоресценции использовали диссоциативно-усиливающий раствор фирмы PerkinElmer (США).

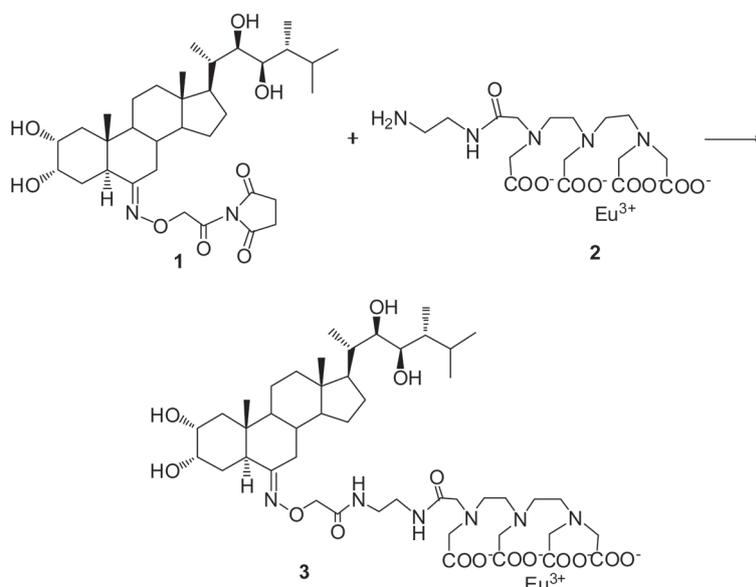
Хроматографический анализ проводили на приборе Agilent 1200 с масс-селективным детектором Agilent 6120.

Синтез конъюгата 24-эпикастастерона с комплексонатом Eu^{3+} (3). Раствор 50 мг (78 мкмоль) активированного эфира (**1**) в 10 мл диоксана добавляли к раствору 67 мг (87 мкмоль, в расчете на N^1 -(2-аминоэтил)амид диэтилентриаминпентауксусной кислоты) комплексоната Eu^{3+} (**2**) в 10 мл 0,1 М NaHCO_3 . Перемешивали в течение 18 ч при комнатной температуре. За ходом реакции наблюдали по ТСХ в системе метанол : 10 % ацетат аммония 3 : 1. Растворитель упаривали, остаток растворяли в воде, экстрагировали этилацетатом, водный слой упаривали. Получали 105 мг продукта (**3**). Масс-спектр, m/z : 1103 и 1105 $[\text{M}+2\text{H}]^+$. Дополнительную очистку конъюгата проводили методом препаративной ТСХ в системе ацетонитрил : вода 1 : 4.

Получение комбинированного конъюгата 24-эпикастастерона и комплексоната Eu^{3+} с альбумином человека (5). К 0,25 мл раствора 4,9 г/л чистого альбумина сыворотки крови человека (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Беларусь) в 0,1 М NaHCO_3 добавляли 27 мкл раствора 8,8 г/л эфира (**1**) в диоксане и 30 мкл раствора 27 г/л комплексоната (**4**) в воде. После тщательного перемешивания выдерживали смесь при температуре 4 °С в течение 18 ч. Затем проводили очистку конъюгата на колонке (1 × 30 см) с сорбентом Superose 12 в системе проточной эффективной жидкостной хроматографии среднего давления FPLC (Pharmacia Biotech, Швеция) используя 0,15 М NaCl в качестве элюента. Степень модификации белка комплексонатом Eu^{3+} определяли по флуоресценции раствора синтезированного конъюгата (**5**) в диссоциативно-усиливающем растворе. Содержание брассиностероида, способного взаимодействовать со специфическими антителами, оценивали с помощью соответствующей системы ИФА.

Методики ИФА и ЛИФМА. Для проведения ЛИФМА и ИФА использовали микропланшеты, покрытые поликлональными антителами к 24-эпикастастерону, которые имеют кросс-реактивность с 24-эпибрассинолидом 80–100 % [2]. При выполнении ИФА в лунки планшета с иммобилизованными антителами вносили по 0,05 мл калибровочных проб 24-эпибрассинолида, растворов конъюгатов (**3**) или (**5**) в качестве исследуемых проб и 0,1 мл рабочего раствора конъюгата 24-эпикастастерона с пероксидазой из корней хрена, синтезированного по известной методике [2]. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при температуре 37 °С, затем удаляли жидкость из лунок и промывали их 1 %-ным раствором NaCl , содержащим 0,02 % Tween-20. Вносили по 0,15 мкл хромоген-субстратного раствора, содержащего 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и пероксид водорода (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси») и инкубировали планшет в течение 15 мин при 37 °С без доступа света. Добавляли в лунки по 0,05 мл стоп-реагента (5 % H_2SO_4) и измеряли оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм с помощью фотометра универсального Ф 300 ТП (Витязь, Беларусь).

ЛИФМА проводили по аналогичной схеме, используя буферные растворы, пригодные для этого вида анализа. В качестве меченого 24-эпикастастерона использовали конъюгаты (**3**) и (**5**). После удаления из лунок несвязавшихся компонентов вносили по 0,2 мл диссоциативно-усиливающего раствора. Встряхивали в течение 10 мин при 20–25 °С и через 20 мин измеряли флуоресценцию при длине волны возбуждения и регистрации соответственно 340 и 615 нм с временной задержкой 400 мкс с использованием многоканального микропланшетного флуориметра DELFIA 1234 (Wallac Oy, Финляндия).



Синтез прямого конъюгата 24-эпикастестерона с комплексоном Eu^{3+}

Результаты и их обсуждение. Главными компонентами двух разработанных вариантов иммунохимической системы являлись прямой (низкомолекулярный) (3) или комбинированный (белковый) (5) конъюгаты 24-эпикастестерона с комплексоном Eu^{3+} . Соответственно, два подхода использованы для получения браassinостероида, меченного комплексоном Eu^{3+} . Первый основан на непосредственном взаимодействии N-сукцинимидного эфира (1) с европиевой солью (2) (схема). Как известно, N-сукцинимидные эфиры неустойчивы в водной среде. В ранее описанном синтезе конъюгата 17- α -гидроксипрогестерона с комплексоном Eu^{3+} [15] в качестве реакционной среды использовали полярный апротонный растворитель диметилсульфоксид. Однако соединение (2) представляет собой гигроскопичное вещество, малорастворимое в органических растворителях. К тому же удаление из реакционной среды высококипящего диметилсульфоксида зачастую представляет собой сложную задачу. Поэтому реакцию, представленную на схеме, проводили в смеси диоксана с 0,1 М раствором NaHCO_3 в воде (1 : 1). Такая среда обеспечивает растворимость производного стероида (1), комплексонов (2) и продукта их взаимодействия (3). Выбранный порядок внесения реагентов снижает вероятность деактивации эфира (1) в результате гидролиза. Использование раствора с pH 8,3 обеспечивает активацию аминогрупп комплексонов (2) путем ее депротонирования. Конъюгат (3) очищали от 6-(O-карбоксиметил)оксима 24-эпикастестерона экстракцией этилацетатом. Результаты ВЭЖХ с масс-селективным детектором показали, что продукт содержит исходный стероид. Очистка методом препаративной ТСХ позволила отделить примесь.

Высокомолекулярный конъюгат 24-эпикастестерона с комплексоном Eu^{3+} (5) получен с использованием инертного белка-носителя. ϵ -Аминогруппы остатков лизина полипептидной цепи альбумина человека одновременно модифицировали N-сукцинимидными эфирами (1) и (4). Реакцию проводили в одну стадию, поскольку использовались схожие по ацилирующей активности реагенты.

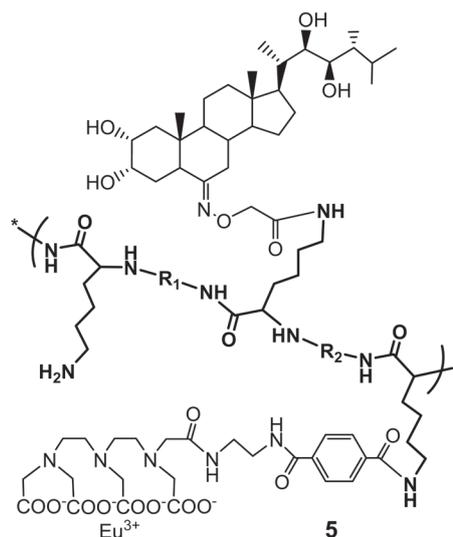
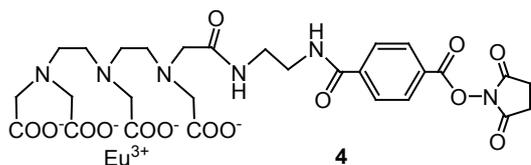


Рис. 1. Общая структура комбинированного конъюгата 24-эпикастестерона с комплексоном Eu^{3+}

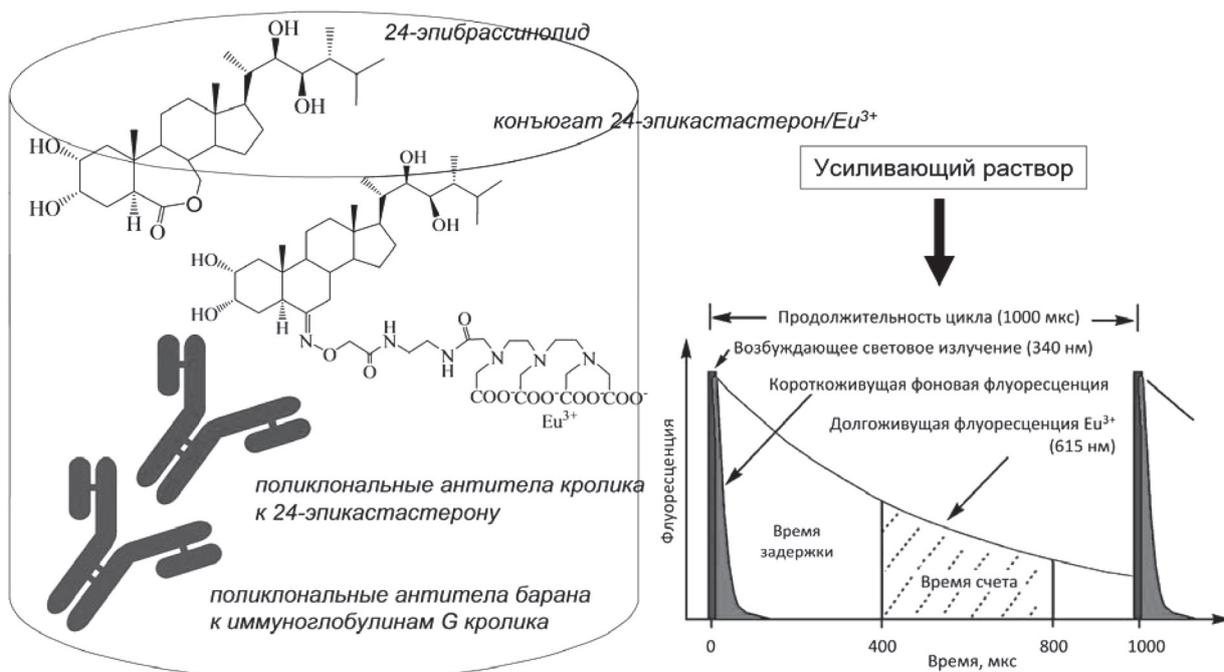


Рис. 2. Схема ЛИФМА для определения концентрации 24-эпибрасинолида

При добавлении к раствору белка активированного эфира (1) наблюдали выпадение осадка, который отделяли центрифугированием перед стадией очистки. Гель-фильтрация супернатанта на колонке с сорбентом Superose 12 в специальном режиме быстрой хроматографии белков позволила отделить модифицированный альбумин от неприсоединившихся к нему компонентов реакционной среды. Удельная активность конъюгата (5) (в терминах содержания способных к флуоресценции групп) составила 7 моль ионов Eu^{3+} на 1 моль белка (рис. 1). Иммунореактивность полученных флуоресцентных производных 24-эпикастестерона (3) и (5) по отношению к специфическим антителам оценивали в тест-системе ИФА.

Конструкция иммунохимической системы ЛИФМА на примере использования низкомолекулярного конъюгата (3) и принцип регистрации флуоресцентного сигнала показаны на рис. 2.

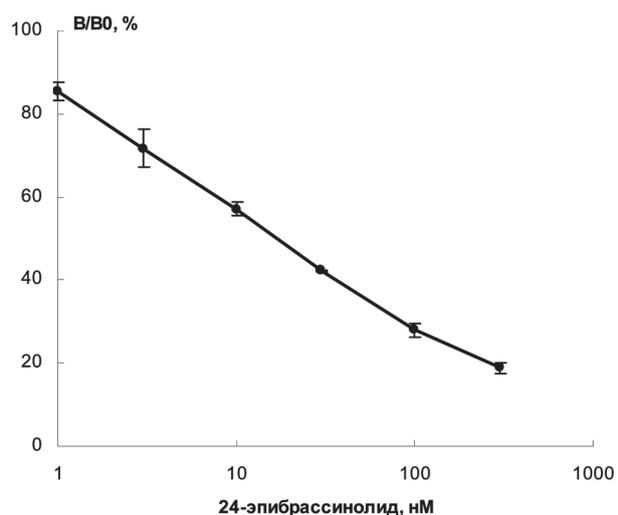


Рис. 3. Зависимость связывания конъюгата (5) с антителами к 24-эпикастестерону от концентрации 24-эпибрасинолида в лунках микропланшета. В и B_0 – сигналы в присутствии и в отсутствие определяемого антигена в системе

Результаты иммуноанализа приведены на рис. 3. В ЛИФМА использовали растворы соединений (3) и (5) с концентрацией брасиностероида 3 нМ, вычисленной по результатам ИФА. Следует отметить, что при использовании соединения (3), в котором на одну молекулу стероида приходится один ион Eu^{3+} , наблюдается невысокая флуоресценция связанного с антителами конъюгата (около 30000 импульсов). Такой уровень сигнала не позволяет достичь необходимой чувствительности определения. Дополнительная очистка комплексоната Eu^{3+} (3) препаративной ТСХ не привела к существенному изменению аналитических характеристик ЛИФМА.

Включение комбинированного конъюгата (5) в иммунохимическую систему ЛИФМА привело к увеличению максимального специфического сигнала примерно до 160000 импульсов. Из рис. 3 видно, что калибровочный график

имеет линейный характер в широком диапазоне концентраций 24-эпибрасинолида (от 1 до 300 нМ). Чувствительность определения брасиностероидов составила 0,5 нМ, коэффициент вариации – не более 8 %. Достигнутые характеристики ЛИФМА, сопоставимые с разработанным ранее ИФА 24-эпибрасиностероидов [2], позволяют предвидеть возможность дальнейшего развития предложенного подхода и изучить его аналитические возможности в отношении растительных экстрактов и агропрепаратов.

Заключение. Нами впервые синтезированы и исследованы в разработанной системе ЛИФМА конъюгаты брасиностероида 24-эпикастастерона с полиаминополикарбоксилатным комплексоном европия. Высокомолекулярный конъюгат (**5**), в котором 24-эпикастастерон соединен с несколькими молекулами комплексоновата Eu^{3+} посредством полипептидной цепи альбумина, оказался подходящим для иммунохимической системы меченым соединением в терминах чувствительности и диапазона определяемых концентраций 24-эпибрасиностероида в калибровочных пробах. Низкомолекулярный конъюгат (**3**), содержащий производное 24-эпикастастерона и комплексоноват редкоземельного металла в мольном соотношении 1 : 1, при связывании с иммобилизованными антителами давал существенно меньший по интенсивности флуоресцентный сигнал, чем (**5**). Не исключено, однако, что меченый 24-эпикастастерон (**3**) может оказаться полезен в поиске и исследованиях природных связывающих брасиностероиды белков.

Литература

1. *Khripach V. A., Zhabinskii V. N., de Groot A.* Brassinosteroids. A new class of plant hormones. San Diego: Acad. Press, 1999.
2. *Хрипач В. А., Свиридов О. В., Прядко А. Г.* и др. // Биоорг. химия. 2007. Т. 33, № 3. С. 371–378.
3. *Хрипач В. А., Литвиновская Р. П., Драч С. В.* и др. // Докл. НАН Беларуси. 2009. Т. 53, № 6. С. 74–77.
4. *Khripach V., Zhabinskii V., Antonchick A.* et al. // Natural Product Commun. 2008. Vol. 3, N 5. P. 735–748.
5. *Khripach V. A., Zhabinskii V. N., Litvinovskaya R. P.* // Brassinosteroids: a Class of Plant Hormones / eds. S. Hayat and A. Ahmad. Dordrecht, 2011. P. 375–392.
6. *Pradko A. G., Litvinovskaya R. P., Sauchuk A. L.* et al. // Steroids. 2014. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.08.022.
7. *Mikola H., Miettinen P.* // Steroids. 1991. Vol. 56. P. 17–21.
8. *Mikola H., Takalo H., Hemmilä I.* // Bioconjugate Chem. 1995. Vol. 6, N 3. P. 235–241.
9. *Mikola H., Sundell A.-C., Hänninen E.* // Steroids. 1993. Vol. 58. P. 330–334.
10. *Бекман Н. И., Ларичева С. Ю., Помелова В. Г., Осин Н. С.* // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. № 12. С. 33–35.
11. *Peuralahti J., Suonpää K., Blomberg K.* et al. // Bioconjugate Chem. 2004. Vol. 15, N 4. P. 927–930.
12. *Райченко Т. Ф., Литвиновская Р. П., Жабинский В. Н.* и др. // Химия природных соединений. 2012. № 2. С. 1–4.
13. *Irani N. G., Rubbo S. D., Mylle E.* et al. // Nature Chemical Biology. 2012. Vol. 8, N 6. P. 583–589.
14. *Гарбуз О. С., Дубовская Л. В., Свиридов О. В.* // Докл. НАН Беларуси. 2014. Т. 58, № 1. С. 68–74.
15. *Гарбуз О. С., Семенов Д. А.* // Молодежь в науке–2013: прил. к журн. «Весті НАН Беларусі»: в 5 ч. 2014. Ч. 1. С. 13–19.

A. L. SAUCHUK, O. S. KUPRIENKO, R. P. LITVINOVSKAYA, O. V. SVIRIDOV, V. A. KHRIPACH

alina_kyrtikova@mail.ru; olga_garbuz@iboch.bas-net.by; litvin@iboch.bas-net.by;
sviridov@iboch.bas-net.by; khripach@iboch.bas-net.by

A NEW APPROACH TO IMMUNOCHEMICAL DETERMINATION OF BRASSINOSTEROIDS

Summary

For the first time, reagents have been synthesized and a technique has been developed for a lanthanide immunofluorometric assay of phytohormonal steroids of 24-epicastasterone and 24-epibrassinolide. A low-molecular-weight conjugate of the brassinosteroid and an Eu^{3+} complexonate was synthesized by the reaction of 24-epicastasterone-6-(O-carboxymethyl) oxime N-succinimide ester with the europium salt of the diethylenetriaminepentaacetic acid N^1 -(aminoethyl)amide. A protein conjugate with a high specific fluorescent activity was the product of a simultaneous acylation of primary amino groups in albumin with activated esters of carboxyl derivatives of 24-epicastasterone and an Eu^{3+} complexonate. Using the high-molecular weight conjugate in an immunochemical system, a linear relationship was obtained between a fluorescent signal of labeled 24-epicastasterone bound to immobilized antibodies and 24-epibrassinolide concentration in the range of 1 to 300 нМ.