

УДК 577.112.083.3:577.27

НОВАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ TNF- α В ОБРАЗЦАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Т.В. Кузнецова, Б.И. Шевелев*, Я.С. Керученко, А.Б. Шевелев

(Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; e-mail: shevelev@inbi.ras.ru)

Путем экспрессии искусственных генов TNF- α в клетках *E. coli* в виде тел включения получены полноразмерный TNF- α человека и его укороченная форма, в которой 18 а.о. с N-конца заменены на tag-пептид фага T7. Отработана методика очистки и ренатурации рекомбинантных белков, показана их биологическая активность. Получены поликлональные антитела против TNF- α . Сконструирована тест-система ИФА типа "сэндвич" для определения TNF- α с чувствительностью 100 пг/мл. Показана пригодность тест-системы для обнаружения повышенного уровня TNF- α в крови человека.

Белок-антиген TNF- α был изначально охарактеризован как белок, вызывающий некроз экспериментальных опухолей у мышей [1]. В настоящее время накоплены данные о том, что TNF- α является одним из центральных белковых иммуномедиаторов, продуцируемым в основном активированными макрофагами. TNF- α биологически активен в форме тримера, что, как предполагается, необходимо для реализации его множественных функций [2]. Как противовоспалительный цитокин TNF- α играет ключевую роль в патогенезе некоторых заболеваний и состояний, таких как ревматоидный артрит, псориаз и септический шок [3, 4]. Повышенный по сравнению с нормой уровень TNF- α встречается при ряде заболеваний как инфекционной (туберкулез), так и аутоиммунной (склероз, саркоидоз) этиологии [5]. Динамика TNF- α в крови больного может служить индикатором развития инфекционного процесса и последующих стадий болезни. Этот факт можно с успехом использовать в клинической практике для диагностики различных инфекционных заболеваний человека.

Несмотря на доступность целого ряда коммерческих систем количественного определения TNF- α , имеется незначительное число сообщений об их применении в клинической практике. Возможно, это связано с повышенной чувствительностью систем, в некоторых случаях достигающей 0,5 пг/мл, тогда как уровень TNF- α в крови больных измеряется сотнями пикограмм. Перед нами стояла задача создать новую иммунохимическую систему детекции TNF- α

в образцах крови больных и здоровых людей, пригодную для использования в клинике.

Материалы и методы

Для экспрессии в *E. coli* использовали векторные системы на основе промотора T7 (pET23a, Novagen). Плазмидную ДНК выделяли, как описано в работе [6], *E. coli* выращивали на стандартной питательной среде LB. Экспрессию и первичную очистку проводили, как описано в работе [7]. При денатурации белка содержание влажного осадка тел включения составляло 0,5 г на 10 мл буфера (50 мМ Tris-HCl, 7 М мочевины). Восстановление белка проводили при концентрации ДТТ 10 мМ (pH 8,0), сульфитолиз – при концентрации тетрагидрата натрия 50 мМ и сульфита натрия 50 мМ (pH 8,8). Нерастворившийся остаток удаляли центрифугированием. Для нанесения на DEAE-ToyoPearl раствор белка разводили в 5–10 раз хроматографическим буфером (10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 4 М мочевины). Элюцию проводили градиентом NaCl от 0 до 1 М в хроматографическом буфере. Содержание продукта во фракциях анализировали при помощи ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях. Количественное содержание белка в растворе определяли по модифицированному методу Лоури с использованием бицихонинового реагента [8].

Процедуру ренатурации проводили по принципу одноступенчатого разбавления денатурированного белка в 17 раз. Панель буферов для ренатурации была приготовлена согласно протоколу [[*Московский городской центр профилактики и борьбы со СПИДом.](http://www.athenaen-</p></div><div data-bbox=)

vironmental.com/]. Концентрацию общего белка, оставшегося в растворе после отделения агрегатов, определяли по модифицированному методу Лоури.

Иммунизация кроликов рекомбинантным TNF- α описана в работе [7]. Имобилизацию рекомбинантного TNF- α на бромциан-агарозе (“Amersham Pharmacia Biotech”) проводили по инструкции производителя. Аффинную очистку поликлональных антител проводили, как описано в работе [9]. Полученный препарат антител RA-TNF имел концентрацию 1 мг/мл. Биотинилирование антител осуществляли с помощью биотингидроксисукцинимиды (“Amersham Pharmacia Biotech”) по инструкции производителя.

Для определения биологической активности препаратов TNF- α использовали стандартный тест на индукцию апоптоза на клетках линии мышины фибросаркомы L929, обработанных актиномицином D [10]. Клетки рассевали по 30 тысяч на лунку в 2 плоскодонных 12-луночных планшета (“Costar”) в культуральной среде (50% DMEM, 50% F12, 1% сыворотка, “Панэко”) и культивировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, до образования монослоя на дне лунок. Затем культуральную среду удаляли и вносили по 2 мл свежей культуральной среды, содержащей актиномицин D в концентрации 10 мкг/мл, а также испытуемые препараты TNF- α в конечной концентрации 50 нг/мл. Параллельно вносили те же препараты, предварительно нейтрализованные антителами RA-TNF. Нейтрализация достигалась инкубацией испытуемых препаратов TNF- α в конечной концентрации 10 мкг/мл с антителами в концентрации

100 мкг/мл в буфере PBS (20 mM Na-фосфат, pH 7,5, 100 mM NaCl) при 4°C в течение 20 ч. Планшеты инкубировали в течение 16 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В качестве контроля использовали клетки в культуральной среде с добавлением буфера PBS, а также клетки со свободными антителами RA-TNF. По окончании инкубации среду удаляли, а клетки окрашивали 0,1%-м раствором кристаллического фиолетового в 2%-м этаноле. Оптическую плотность измеряли при длине волны 595 нм.

Калибровка чувствительности тест-системы “Сандвич”

Полистироловые 96-луночные планшеты (“Costar”) активировались антителами RA-TNF в концентрации 10 мкг/мл в 50 mM буфере NCA (натрий-карбонат-бикарбонатный буфер, pH 9,6) в течение ночи при 4°C. Для блокирования неспецифического связывания использовали 1%-й раствор БСА (бычий сывороточный альбумин) в буфере NCA и инкубировали в течение 1,5–2,0 ч при комнатной температуре. Затем в присутствии сыворотки крови здорового донора, разведенной в 5–20 раз буфером PBS, изготавливали серию разведений полноразмерного TNF- α из 6 точек с шагом в 5 раз (от 20 000 до 6 пг/мл). Инкубация происходила в течение 2 ч при комнатной температуре. Биотинилированные антитела B-RA-TNF вносили в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Конъюгат стрептавидин-пероксидазы (“ИМТЕК”, Москва, кат. номер P-S Avs) вносили в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре.

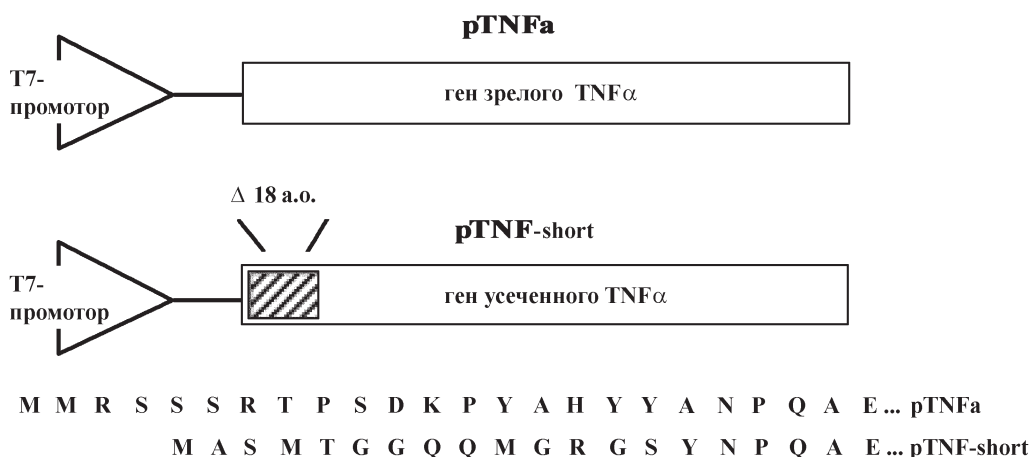


Рис. 1. Схемы экспрессионных конструкций pTNF α и pTNF short на базе pET23a, кодирующих полноразмерный и укороченный вариант TNF- α человека; N-концевые последовательности продуктов обеих конструкций

Цветную реакцию на пероксидазу проводили при помощи субстратного буфера (400 мкг/мл *o*-фенилендиамина, 0,015% H_2O_2 , 100 мМ Na-цитрат, pH 5,0), реакцию останавливали добавлением 30 мкл 10% H_2SO_4 . Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм.

Исследование разрешающей способности сконструированной тест-системы в отношении клинических образцов проводили так же, как при определении чувствительности (см. выше). В эксперименте были использованы сыворотки 100 здоровых доноров, каждую из которых разводили в 5 раз буфером PBS.

Результаты и обсуждение

Белок-антиген для иммунологической тест-системы детекции TNF- α был получен с помощью ранее описанных конструкций на базе вектора pET23a, кодирующих полноразмерный зрелый TNF- α (конструкция pTNFa), и вариант, укороченный на 18 а.о. с N-конца (конструкция pTNF-short) [7]. Продукт конструкции pTNF-short содержал на N-конце 15 а.о. из белка 10 фага T7 взамен собственных (рис. 1).

Рекомбинантные белки накапливались в виде тел включения с выходом до 200 мг/л. Солюбилизацию тел включения в денатурирующих условиях проводили либо традиционным методом, размыкая дисульфидные связи при помощи восстановления ДТТ,

либо окислительным сульфитоллизом с образованием сульфонатного производного белка [11]. Предполагалось, что восстановленная и сульфонатная формы денатурированного белка будут отличаться по эффективности очистки в денатурированных условиях и ренатурации. Осветленные препараты денатурированного белка подвергали анионообменной хроматографии в денатурирующих условиях. Хроматографию проводили в буфере с содержанием мочевины 4 М. Преимуществом снижения концентрации денатурирующего агента является то, что при использовании для ренатурации метода разбавления исходный препарат достаточно разбавлять в два раза (до конечной концентрации мочевины 2 М), за счет чего раствор ренатурированного белка оказывается в конечном итоге более концентрированным.

Хроматографию полноразмерного TNF- α после обработки ДТТ на DEAE-Toyopearl проводили при pH 8,2. Десорбция белка градиентом NaCl достигалась при концентрации соли 120 мМ, а десорбция ДНК – при 450 мМ. Анионообменную хроматографию полноразмерного TNF- α после реакции сульфирования проводили в тех же условиях, однако при этом наблюдалось три пика на хроматограмме, которые предположительно представляют собой различные продукты сульфитолиза двух дисульфидных связей молекулы TNF- α . Десорбция белка с колонки проходила при

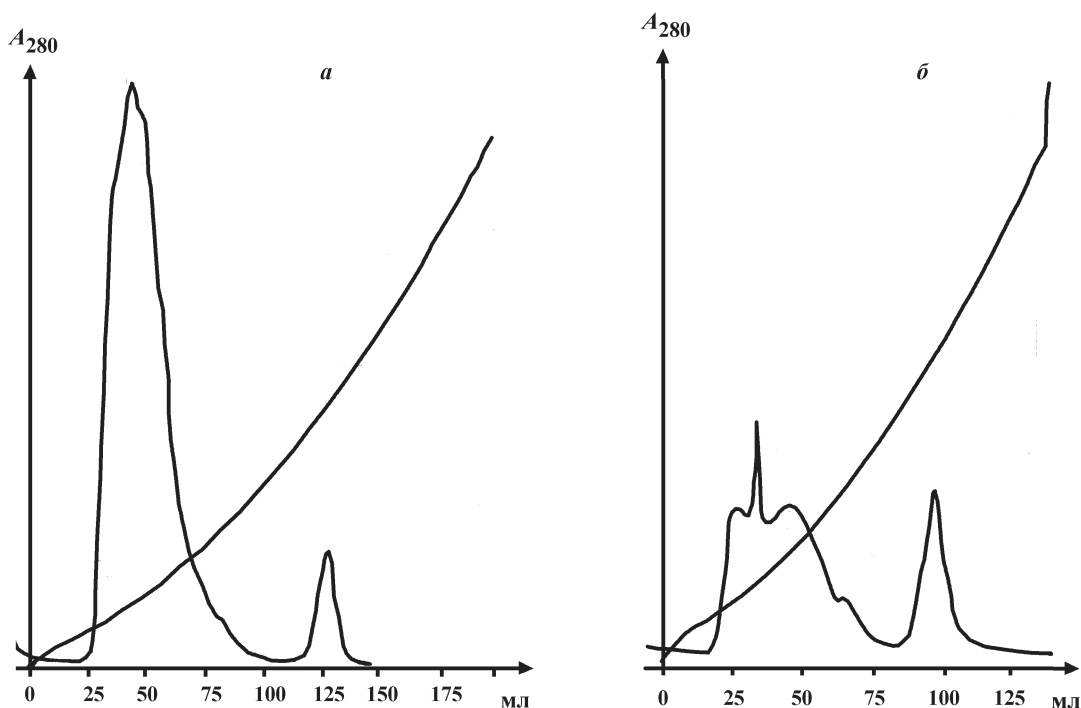


Рис. 2. Профиль хроматографии TNF- α в денатурирующих условиях на DEAE-Toyopearl. Солюбилизацию тел включения в растворе мочевины перед нанесением на колонку проводили одновременно с восстановлением ДТТ (а) и сульфитоллизом (б)

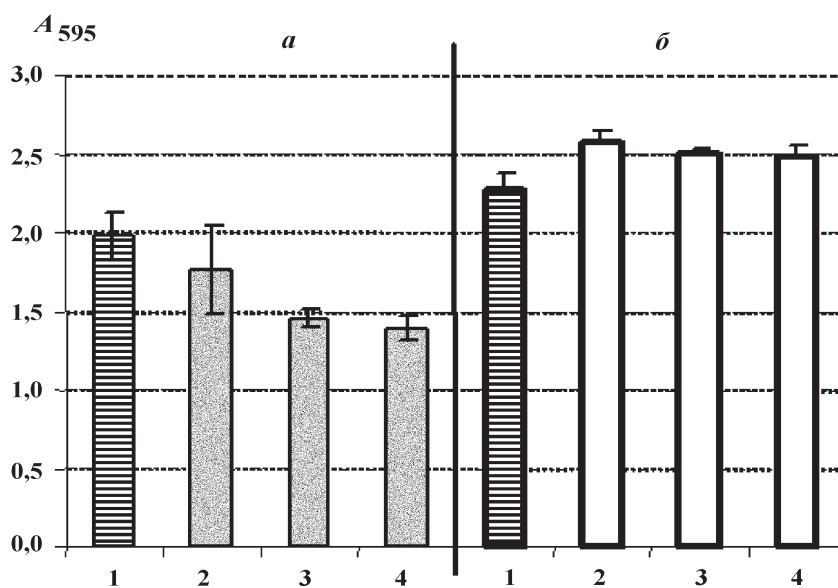


Рис. 3. Цитотоксический эффект ренатурированного TNF-α на клеточную линию мышинной фибросаркомы L-929 (а: 1 – отрицательный контроль, 2 - TNF-α, ренатурированный в буфере № 7, 3 – TNF-α, ренатурированный в буфере № 13, 4 – TNF-α-short, ренатурированный в буфере № 13; б – то же в присутствии антител против TNF-α

концентрации соли 80–160 мМ, а десорбция ДНК – при 420 мМ (рис. 2). Поскольку полученный препарат не был достаточно гомогенным, в дальнейшем мы пользовались процедурой восстановления при помощи ДТГ. Аналогичным образом был очищен продукт конструкции рTNF short.

Ренатурацию белков проводили с использованием набора буферов [http://www.athenaenvironmental.com/]. Эффективность ренатурации TNF-α оценивали по выходу растворимого белка и с помощью цитотоксического теста на клеточной линии мышинной фибросаркомы [10]. Наибольшая удельная биологическая активность обнаружена у белков, ренатурированных с помощью буферов № 7 и № 13 (рис. 3).

Для оценки специфичности действия полученных форм TNF-α был проведен тест на нейтрализацию его активности аффинно очищенными кроличьими антителами против TNF-α человека. Приведенные на рис. 3 результаты позволяют сделать вывод о том, что цитотоксический эффект ренатурированных препаратов TNF-α не связан с примесями, поскольку полностью подавляется очищенными антителами, не способными взаимодействовать с этими примесями. Анализируя наличие цитотоксической активности у укороченного белка TNF-short, необходимо отметить, что в числе остатков, отсутствующих в усеченном варианте TNF-α по сравнению с природным белком,

находился Lys-11, участвующий в стабилизации тримера TNF-α [12]. Поскольку в работе [2] было высказано предположение о необходимости тримерной структуры для связывания TNF-α с рецепторами, наличие биологической активности у белка TNF-short можно считать неожиданным. Не исключено, что этот белок имеет аномальную по сравнению с природным лигандом структуру комплекса с рецептором и, возможно, необычный спектр физиологической ак-

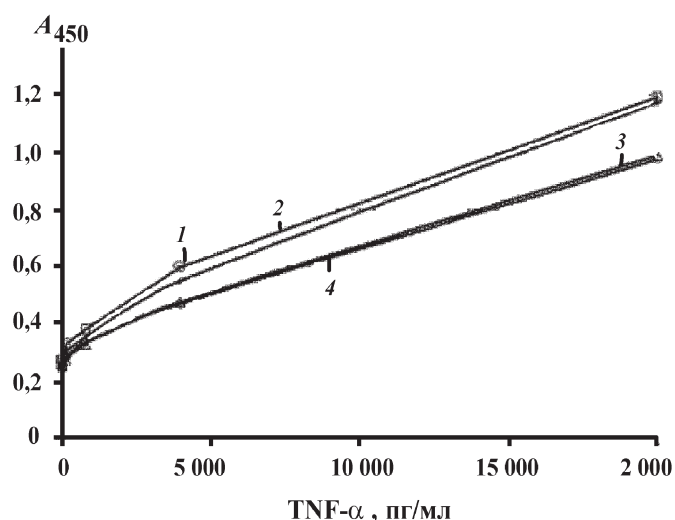


Рис. 4. Калибровка чувствительности тест-системы ИФА “сэндвич” для определения содержания TNF-α (содержание донорской сыворотки в образце, %: 1 – 5, 2 – 7, 3 – 10, 4 – 20)

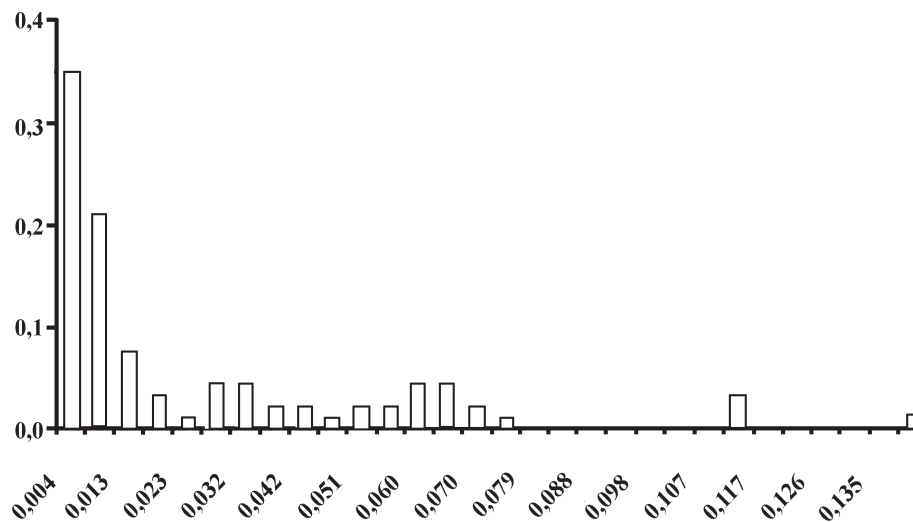


Рис. 5. Распределение уровня TNF- α в сыворотках крови здоровых доноров, выявляемое тест-системой ИФА “сэндвич”

тивности, что может иметь значение для фундаментальных исследований в области биологической роли TNF- α , изучения механизмов передачи информации лиганд-рецепторными комплексами, а также может оказаться полезным при диагностике и лечении ряда заболеваний, связанных с работой иммунной системы.

С использованием полноразмерного TNF- α были получены кроличьи моноклональные антитела. После очистки на сорбенте, содержащем иммобилизованный полноразмерный белок TNF- α , часть антител была биотинилирована. Схема иммунологического теста типа “сэндвич” включала в себя сорбцию на поверхность иммунологического планшета небиотинилированных антител в насыщающей концентрации, блокировку неспецифической емкости бычьим сывороточным альбумином, внесение источника антигена (донорских сывороток), маркировку связавшегося антигена биотинилированными антителами и визуализацию с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена. Для определения чувствительно-

сти и специфичности тест-системы была проведена калибровка с использованием серийных разведений полноразмерного TNF- α в присутствии конкурента – сыворотки крови здорового донора, разведенной в 5–20 раз (рис. 4). Построение калибровочного графика показало, что результирующий сигнал прямо пропорционален количеству TNF- α в образце в диапазоне концентраций в исходном материале от 100 до 5000 пг/мл и не зависит от количества конкурента.

Уровень детектируемого тест-системой сигнала был проверен на выборке сывороток здоровых доноров (100 человек). При разведении сыворотки в 5 раз примерно половина значений A_{492} оказалась ниже 0,01. Другая половина значений A_{492} находилась в диапазоне от 0,01 до 0,08, несколько значений достигали 0,12. Таким образом, наша система детектирует слабые, но достоверно отличные от нуля сигналы. Такая чувствительность позволяет достоверно выявлять повышение уровня TNF- α в крови человека по сравнению с нормой при любых патологиях.

Работа выполнена при поддержке Государственного контракта № 02.467.11.3001 (ЖС-КП 6/002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. **72**. P. 3666.
2. Reed C., Fu Z.Q., Wu J., Xue Y.N., Harrison R.W., Chen M.J., Weber I.T. // Protein Eng. 1997. **10**. P. 1101.
3. Wildbaum G., Youssef S., Karin N. // J. Immunol. 2000. **165**. P. 5860.
4. Шингарова Л.Н., Сагайдак Л.Н., Турецкая П.Л., Недоснагов С.А., Есупов Д.С., Коробко В.Г. // Биоорг. хим. 1996. **22**. P. 243.
5. Erkut Z.A., Endert E., Huitinga I., Swaab D.F. // Mult. Scler. 2002. **8**. P. 229.
6. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor. 1982.
7. Суровцева Е.В., Кузнецова Т.В., Хоменков В.Г., Домогатский С.П., Шевелев А.Б. // Биоорг. хим. 2005. **31**. С. 474.
8. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. // Anal Biochem. 1985. **150**. P. 76.

9. *Bashkov G.V., Stepanova I.P., Domogatsky S.P.* // *Thromb. Res.* 1994. **74**. P. 321.
10. *Kramer S.M., Carver M.E.* // *J. Immunol. Methods.* 1986. **93**. P. 201.
11. *Patrick J.S., Lagu A.L.* // *Anal. Chem.* 1992. **64**. P. 507.
12. *Eck M.J., Beutler B., Kuo G., Merryweather J.P., Sprang S.R.* // *J. Biol. Chem.* 1988. **263**. P. 12816.

Поступила в редакцию 23.11.07

NEW SYSTEM FOR TNF-ALPHA QUANTIFICATION IN CLINICAL SAMPLES

T.V. Kuznetsova, B.I. Shevelev, J.S. Keruchenko, A.B. Shevelev

(Division of Chemical Enzymology)

Full-length TNF-alpha and its truncated derivative with 18 N-terminal amino acids replaced to T7-tag were produced in *E. coli* using artificial genes and rendered inclusion bodies. Purification and refolding methods were established for the recombinants, their biological activity was demonstrated. Polyclonal antibodies against TNF-alpha were raised. ELISA-Sandwich test-system for TNF-alpha quantification with 100 pg/ml sensitivity was engineered. The system was shown to be applicable for detection of the TNF-alpha elevation in human blood.