

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ ИЗ СОИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ ДЛЯ ИФА

**Эшбоев Фарход Бакир угли**

*мл. науч. сотр., Институт химии растительных веществ АН РУз,  
Узбекистан, г. Ташкент  
E-mail: [farkhod.eshboev@gmail.com](mailto:farkhod.eshboev@gmail.com)*

**Юсупова Элвир Гайнатовна**

*канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Институт химии растительных веществ АН РУз,  
Узбекистан, г. Ташкент*

**Пякина Галина Аликсандровна**

*канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Институт химии растительных веществ АН РУз.,  
Узбекистан, г. Ташкент*

**Межлумян Лариса Гайковна**

*канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Институт химии растительных веществ АН РУз.,  
Узбекистан, г. Ташкент*

**Зиявитдинов Жамолитдин Фазлитдинович**

*канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Центр передовых технологий,  
Узбекистан, г. Ташкент*

**Ишимов Учкун Жомуродович**

*канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Центр передовых технологий,  
Узбекистан, г. Ташкент*

**Азимова Шахноз Садыковна**

*док. биол. наук, проф., Институт химии растительных веществ АН РУз,  
Узбекистан, г. Ташкент*

## ISOLATION AND STUDY OF THE AMINO ACID COMPOSITION OF PROTEINS FROM SOYABEAN FOR PRODUCING CONJUGATES FOR ELISA

**Farkhod Eshboev**

*junior researcher of the Institute of the Chemistry of Plant Substances,  
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,  
Uzbekistan, Tashkent*

**Elvira Yusupova**

*PhD., senior researcher of the Institute of the Chemistry of Plant Substances,  
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,  
Uzbekistan, Tashkent*

**Galina Piyakina**

*PhD., senior researcher of the Institute of the Chemistry of Plant Substances,  
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,  
Uzbekistan, Tashkent*

**Larisa Mejlumyan**

*PhD., senior researcher of the Institute of the Chemistry of Plant Substances,  
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,  
Uzbekistan, Tashkent*

**Djamaliddin Ziyaviddinov**

*PhD., senior researcher of the Center for Advanced Technologies,  
Uzbekistan, Tashkent*

**Uchkhun Ishimov**

*PhD., senior researcher of the Institute of the Center for Advanced Technologies,  
Uzbekistan, Tashkent*

**Shakhnoz Azimova**

*DSc., Professor, Institute of the Chemistry of Plant Substances, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,  
Uzbekistan, Tashkent*

### АННОТАЦИЯ

Проведено выделение, очистка и изучение аминокислотного состава белков из сои с целью синтеза конъюгата морфин-белок для разработки диагностического теста с целью выявления антител, связывающих производные алкалоидов группы опиата на основе твердофазного иммуноферментного анализа.

### ABSTRACT

Isolation, purification and study of amino acid composition of soybean protein in order to synthesis of morphine-protein conjugate for developing a test-system for detection of antibodies to alkaloids of the group of opiates on the basis of enzyme-linked immunosorbent assay.

**Ключевые слова:** белок, аминокислота, ВЭЖХ, гаптен, конъюгат, ИФА.

**Keywords:** protein, amino acid, HPLC, hapten, conjugate, ELISA.

### Введение

Актуальной задачей медицинской диагностики является разработка высокочувствительных и специфичных методов анализа наркотических веществ и антител к ним в биологических жидкостях организма [1]. Известно, что наиболее широкое распространение в практике для диагностики наркомании получили иммунохимические [2] и ВЭЖХ-МС [3] методы определения наркотических веществ. К ним относятся: иммунохроматографический, иммунофлуоресцентный, радиоиммунный методы анализа. Перечисленные методы анализа, используемые для диагностики наркомании, основаны на определении в биологической жидкости человека продуктов метаболизма употребляемого наркотического препарата.

Такой подход к диагностике наркомании имеет существенный недостаток, поскольку позволяет диагностировать наркотическую интоксикацию только в течение 24-48 часов с момента принятия препарата. Этот факт связан с быстрым выведением из организма наркотических соединений и их производных [4]. Однако, известно [5], что к опиатам вырабатываются специфические белки, вызывающие привыкание к наркотику. Наиболее оптимальным методом является метод ИФА диагностики, позволяющий определять наличие белков, связывающих наркотики, так как эти белки, образованные к опиатам, сохраняются в организме человека в течение 2-3 месяцев.

Для разработки ИФА диагностического теста необходим белковый носитель-конъюгат белка с морфином, поскольку низкомолекулярный опиат (гаптен) невозможно адсорбировать на поверхности полимерного носителя. Диагностический ИФА набор, используемый для определения наркотических ве-

ществ, состоит из нескольких компонентов, среди которых основной - это иммуносорбент, содержащий конъюгат гаптен - белок.

Целью данной работы является подбор белкового носителя для разработки ИФА диагностического теста. Имеются работы, [6,7.] по использованию в качестве белка-носителя - БСА, ЧСА, овальбумина, лизоцима и фибриногена для получения конъюгатов белок-гаптен при создании ИФА диагностических тестов. В нашей работе был выбран соевый белок в связи с тем, что на него нет перекрестных реакций антител с сывороткой крови человека, что позволяет избежать ложноположительных результатов.

### Методы

**Выделение белка.** Соевые бобы измельчали с помощью гомогенизатора (PX-MFC 90D) и обезжиривали ацетоном (10:1) в течение одного часа. Обезжиренный гомогенат экстрагировали при комнатной температуре в течение 2 часов при соотношении 10/1 0,2 М буфером (0,5 М трис-ОН рН 7,4; 10% SDS; 0,5 М ЭДТА). Затем экстракт центрифугировали в течение 30 минут при 6000 об/мин и супернатант диализовали в течение 12 часов против дистиллированной воды. После диализа супернатант высушивали лиофильно и определяли содержание белка в образцах методом Лоури [8].

**Гель фильтрация.** Гель-фильтрацию белка проводили на колонке (2,5 x 70 см) с Сефадексом G-75. В качестве элюирующего буфера использовали 1 кратный рН 7,4 фосфатный буфер (PBS), при скорости потока 1 мл/мин.

**Электрофоретический анализ белков.** Электрофоретический анализ белков проводили в 10% ПААГ по методу Леммли [9].

### Определение аминокислотного состава.

Гидролиз образцов белковых фракций

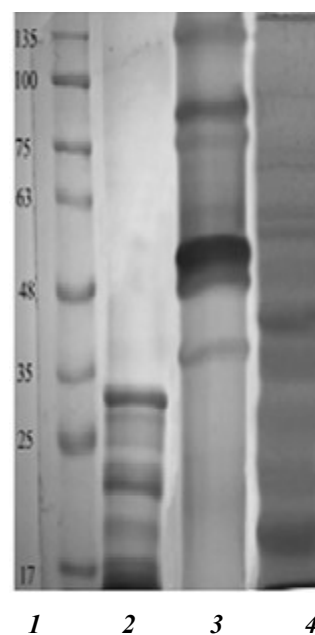
проводили с помощью 5,7 н HCl в вакууме, в течение 24 ч при 110 °С.

Синтез и определение фенилтиокарбонил (ФТК) производных аминокислот проводили по методу Steven A., Cohen D [10]. Идентификацию ФТК-аминокислот проводили на хроматографе Agilent Technologies 1200 на колонке 75x4,6 Discovery HS C<sub>18</sub>. Раствор А: 0,14 М CH<sub>3</sub>COONa + 0,05 % ТЭА, рН 6,4; В: CH<sub>3</sub>CN. Скорость потока 1,2 мл/мин, поглощение 269 нм. Градиент %В/мин: 1-6 %/0-2,5 мин; 6-30 % /2,51- 40 мин; 30-60 %/40,1-45 мин; 60-60 %/45,1-50 мин; 60-0 %/50,1-55 мин.

#### Результаты и обсуждение.

Суммарный соевый белок получали по методу как описано [8]. Затем соевый белок разделяли методом гель-фильтрации на низко- и высокомолекулярные фракции, которые анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ. Результаты электрофореза приведены на рисунке (рис. 1).

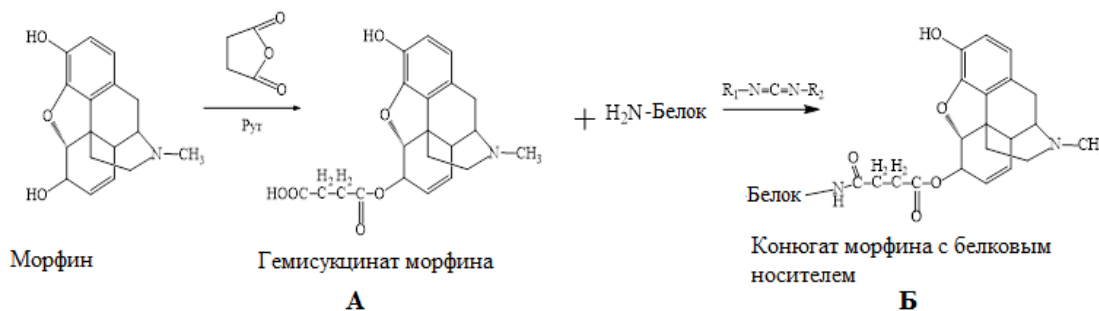
Как видно из рис.1, высокомолекулярная фракция (3) содержит белки с молекулярной массой от 50 до 100 кД и низкомолекулярная (2)- ниже 30 кД.



**Рисунок 1.** Гель – электрофореграмма белковых фракций сои в 10 % ПААГ

1-маркер, 2- вторая фракция, 3- первая фракция, 4- суммарный белок сои.

Для того чтобы морфин провзаимодействовал с белком-носителем на первом этапе следует получить гемисукцинат морфина (см.рис.2 А). Далее получали конъюгат морфина с белком, в результате образования ковалентной связи между аминокетонами белка и карбоксильной группой гемисукцината морфина (см.рис. 2 Б).



**Рисунок 2.** Схема получения конъюгата морфина

Несомненно, чем больше в белке свободных аминокетонных групп, способных взаимодействовать с карбоксильными группами гемисукцината морфина, тем больше молекул морфина свяжется с одним молекулом белка-носителя. В этой связи, исследование аминокетонного состава белковых фракций сои, используемых для получения конъюгатов имеет важное значение.

Аминокетонный состав фракций белков сои сорт Узбек-6 (см. рис1) определяли методом ВЭЖХ [10]. Исследование аминокетонного состава фракций соевых белков показало, что наибольшее количество ε-аминокетонных (лизин, аргинин), содержится

в высокомолекулярной фракции сои. Очевидно, что наличие вышеперечисленных аминокетонных групп в большем количестве в составе этой фракции сои повышает эффективность получения конъюгатов гаптен-белок (см. табл.1).

Таким образом, высокомолекулярную фракцию соевого белка можно использовать в качестве носителя для получения конъюгата для диагностических ИФА тест-систем, для определения низкомолекулярных соединений (алкалоиды группы опиатов и их производные и др.).

Таблица 1.

## Аминокислотный состав белковых фракций соевого белка, в %.

АМИНОКИСЛОТЫ	ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ФРАКЦИЯ (1)	НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ФРАКЦИЯ (2)
АСПАРАГИНОВАЯ КИСЛОТА	4,9436	7,9863
ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА	0	10,735
СЕРИН	3,2848	2,7102
ГЛИЦИН	3,923	2,4028
АСПАРАГИН	0	0
ГЛУТАМИН	0	0
ЦИСТЕИН	0,5014	0,7322
ТРЕОНИН	2,2597	1,632
АРГИНИН	6,8781	3,6215
АЛАНИН	2,9997	1,9397
ПРОЛИН	2,69	1,8186
ТИРОЗИН	2,159	1,3291
ВАЛИН	3,9094	2,0003
МЕТИОНИН	0	0,2945
ИЗОЛЕЙЦИН	5,502	3,1467
ЛЕЙЦИН	6,7436	3,1123
ГИСТИДИН	0	0
ТРИПТОФАН	0	0
ФЕНИЛАЛАНИН	2,4034	1,3404
ЛИЗИН	1,2983	0,7047

## Список литературы:

1. А.Д. Фурсова, М.А. Мягкова, А.И. Воложин. С.Н. Петроченко, Г.В. Виха., Диагностическое значение иммуноферментного анализа иммуноглобулинов класса А в слюне и сыворотке крови больных наркоманией. *Стоматология*, (2008).
2. Н.М. Солодухина, М.А. Мягкова, Т.В. Амбраменко, И.А. Грицкова. Анализ Наркотических Веществ в Физиологических Жидкостях Человека Методом Латексной Агглютинации. *Вестник МИТХТ*, т. 6, №4, (2011).
3. A. B. Ruzilawati\*, W. N. Wan Yusuf, N. Ramli, Z. Hussain, A. H. G. Rasool. Determination of Morphine in Human Urine by A Simple Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography Method with UV Detection. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*; 5(1): 18, (2013).
4. Мягкова М.А. Копоров Д.С. Морозова В.И Паршин А.Н. Абраменко Т.В. Панченко О.Н. № 3 – С. 82-84, (2004).
5. Мягкова М.А. Панченко Л.Ф., *Наркология*. № 6. (2004).
6. Anton P, Leff G., Mex. Pat. EP 1767221 A2 (2007), European Patent Application, Art.158(3) EPA. (2007).
7. K. V. Singh, Jasdeep Kaur, Grish C. Varshney, Manoj Raje, and C. Raman Suri. *Molecules Bioconjugate Chem.*, 15, 168. (2004).
8. Р. Скоупс. методы очистки белков. «МИР», Москва, 197. 1985.
9. Laemmli, U. K. *Nature* 227(5259): 680, (1970).
10. Steven A., Cohen Daviel J. *Analytical Biochemistry*, (1988). V.17.-№ 1. P.1