

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КОНЬЮГАТЫ ДЛЯ НЕИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО ИММУНОАНАЛИЗА



М.Б. Раев,
*доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН*



М.С. Бочкова,
*кандидат биологических наук,
научный сотрудник,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН*



В.П. Тимганова,
*кандидат биологических наук,
младший научный сотрудник,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН*



П.В. Храмцов
*аспирант,
инженер,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН*

Разработана оригинальная технология синтеза прочных ковалентных диагностических конъюгатов аффинных соединений с частицами углерода. Такие диагностикумы не только устойчивы при хранении, но и обладают рядом привлекательных качеств: чрезвычайно высокой оптической контрастностью, низкой способностью к фонообразованию и другими, что позволяет использовать их при конструировании широкого спектра аналитических тест-систем. Системы на основе диагностических конъюгатов с использованием углеродных частиц имеют преимущества по сравнению с существующими аналогами, а в ряде случаев аналогов таким системам просто не существует.

Существенное место в методическом обеспечении современной лабораторной диагностической практики занимают системы количественного и качественного твердофазного иммуоферментного и неферментного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр. Проведение инструментального иммуоферментного анализа требует не только специальной регистрирующей аппаратуры, но и значительных временных затрат, в то время как неферментные (полуколичественный и качественный) анализы не

нуждаются в инструментальном обеспечении и более оперативны в процедурном отношении. Наиболее интересной и перспективной, на наш взгляд, является разработка и совершенствование именно безинструментальных методов, поскольку их применение является технологически и экономически привлекательным.

Большинство неинструментальных систем основано на применении диагностических конъюгатов из оптически плотных частиц, таких как эритроциты, цветные латексные частицы, коллоиды золота, неме-

таллические коллоиды (коллоиды селена, теллура) [7, 9, 10, 11]. Результат таких анализов оценивают по окрашиванию зоны специфического связывания антигенов с антителами на непористом или пористом твердом носителе. Наряду с достоинствами (простота и наглядность) все эти диагностикумы не лишены недостатков.

Минусами эритроцитарного диагностикума являются невозможность его точной стандартизации, высокая степень субъективизма в оценке результатов, ограниченный срок хранения. Кроме того, неинструментальные тест-системы с использованием эритроцитарного диагностикума имеют недостаточную чувствительность и специфичность, что в конечном итоге способствует получению ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

Латексные тесты, диагностические конъюгаты которых основаны на применении цветных латексных частиц, также имеют ряд существенных недостатков, обусловленных нестабильностью как самого диагностикума, так и результатов анализа. Необходимость визуальной регистрации результатов через строго определенное время (от 3–5 до 10–15 мин для разных тестов) увеличивает субъективность оценки результатов. Невозможность объективного учета результата и сохранения его для последующего динамического сравнения ограничивает ценность и сужает область применения латексных тестов, а отклонение от оптимальных условий хранения часто становится причиной их непригодности.

Недостатками диагностикума на основе частиц золота является относительно сложная процедура получения стабильного коллоида, низкая чувствительность, связанная с невысокой хромофорностью (цветностью в видимом диапазоне светового спектра). Кроме того, для эффективного связывания частиц золота с иммунореагентом необходимо учитывать изоэлектрическую точку белка.

Использование коллоидных диагностикумов селена и теллура в неинструментальных тест-системах требует высоких концентраций маркеров из-за слабой

цветности материала, что сомнительно оправданно с технологических и экономических позиций.

Таким образом, основными недостатками всех вышеуказанных реагентов являются: низкая хромофорность, нестабильность частиц носителя и готовых конъюгатов в силу нековалентного характера связывания метки с аффинным соединением (нехимические адсорбционные связи, которые существенно слабее ковалентных и делают невозможным добавление детергентов, часто применяющихся для подавления неспецифического связывания в большинстве твердофазных анализов).

Используемые нами диагностикумы на основе углеродных частиц, полученные авторским методом, обладают рядом неоспоримых преимуществ, таких как высокая контрастность (черный цвет), чувствительность и простота в применении [3, 5, 8]. Углеродная частица в отличие от вышеуказанных маркеров (эритроциты, латексные частицы и др.) обладает постоянной формой, не подвергается деформации и устойчива в процессе хранения.

Углеродные конъюгаты получали по технологии двухстадийного синтеза (рис. 1), при котором пептизирующий и аффинный компоненты – различные соединения [3, 5]. Сухую углеродную матри-



Рис. 1. Схема двухэтапного синтеза углеродного диагностикума (Раев, 2008)

цу, полученную конденсацией из пламени горящего толуола, растирали до мелкодисперсного состояния. Пептизацию (гидрофилизацию) поверхности частиц осуществляли внесением их в раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке, после чего активировали пептизированную поверхность раствором глутарового альдегида. Для удаления не связавшегося бычьего сывороточного альбумина и глутарового альдегида проводили хроматографию на колонке с Sepharose CL-6B. После хроматографической очистки осуществляли концентрирование суспензии активированных углеродных частиц с помощью метода концентрирующей ультрафильтрации в ячейке производства «Millipore» (США), используя мембрану с пределом исключения 30 кДа. Конъюгирование проводили инкубацией активированных частиц с белком G при комнатной температуре и перемешивании.

Синтез завершали гель-фильтрацией на колонке с Sepharose CL-6B для удаления избытка белка G и добавлением БСА, глицерина и азида натрия в качестве стабилизатора, протектора и консерванта соответственно.

В результате применения разработанной технологии каждая углеродная частица оказывается заключенной в прочный протеиновый «каркас», все структурирующие связи которого ковалентные.

Благодаря привлекательным аналитическим и физическим характеристикам стало возможным применение синтезированных углеродных диагностикумов в различных аранжировках твердофазного неинструментального иммуноанализа для определения широкого спектра объектов биологического происхождения.

Углеродный диагностикум, в котором в качестве аффинного соединения был использован белок G стрептококка, обладает способностью связываться с практически любыми иммуноглобулинами класса G человека и большинства животных, что делает возможным его широкое применение не только для контроля за иммунизацией животных, но и в диагностике

различных инфекционных заболеваний. На основе этого конъюгата была сконструирована модельная тест-система для определения антител против токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на непористой твердой фазе в различных аранжировках. Подобная система весьма актуальна, так как вспышки псевдотуберкулеза периодически регистрируются по всему миру. Немаловажен и факт отсутствия простых и оперативных аналитических систем, обладающих достаточными уровнями чувствительности и специфичности и пригодных для диагностического тестирования на разных стадиях заболевания [1, 2, 4, 6].

В одной из предложенных аранжировок проводили определение антител к токсину *Yersinia pseudotuberculosis* на непористой твердой фазе. В качестве основы твердофазного реагента использовали плоское дно лунок планшета, предназначенного для серийных разведений, изготовленного из белого полистирола фирмы «Linbro» (США). Схема анализа представлена на рис. 2.

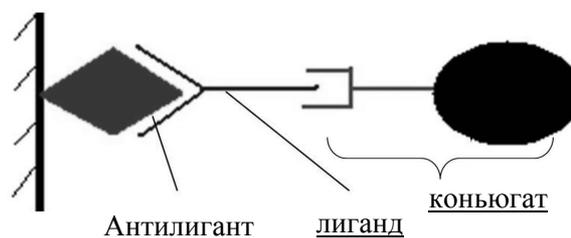


Рис. 2. Схема определения лиганда с использованием твердофазного реагента и углеродного диагностикума

Модельная система тестирования выглядела следующим образом. На дно лунок планшета сорбировали токсин псевдотуберкулеза, иммуноглобулины G человека в качестве положительного и БСА в качестве отрицательного контролей.

В часть лунок (1–5) вносили сыворотку с антителами к токсину псевдотуберкулеза с серийным разведением пробы,кратно двум, начиная с разведения 1/500. В лунку 7 вносили сыворотку № 2 здорового человека в разведении 1/50, в лунки 6, 8 – сыворотку № 1 и 3 здорового человека в разведении 1/200 раз, в лунку 9 – забуференный физиологический раствор с 0,05 % твином (ЗФРТ). Время инкуба-

ции составляло 30 минут, после чего лунки промывали ЗФРТ и осуществляли детекцию конъюгатом G белок-углерод в течение 15 минут.

Результаты проведенного эксперимента, представленные на рис. 3, наглядно демонстрируют отсутствие ложноположительных реакций (внешние и внутренние отрицательные контроли), что свидетельствует о высокой специфичности сконструированной системы. Чувствительность системы определения антител в стандартной псевдотуберкулезной сыворотке (реагент из набора, используемого для реакции пассивной гемагглютинации – РПГА) соответствует разведению 1/8000 при диагностически значимом значении чувствительности – 1/200.

В качестве динамичной, пригодной для экспрессного анализа аранжировки

применяли иммунофльтрационное определение антител к токсину *Yersinia pseudotuberculosis* на пористой твердой фазе. Определение антител осуществляли с помощью пластикового цилиндра с заглубленным отверстием в верхней части, заполненного крупнопористой хроматографической бумагой в качестве впитывающего элемента, с помещаемыми сверху опорным диском из крупнопористого полипропилена и иммуносорбентом, в качестве которого использовали нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 8 мкм (рис. 4).

Иммуносорбент готовили нанесением токсина *Yersinia pseudotuberculosis* дотами из капель по 10 мкл в ЗФР и иммуноглобулинов G человека в качестве внутреннего положительного контроля. Высушенные после нанесения антилигандов

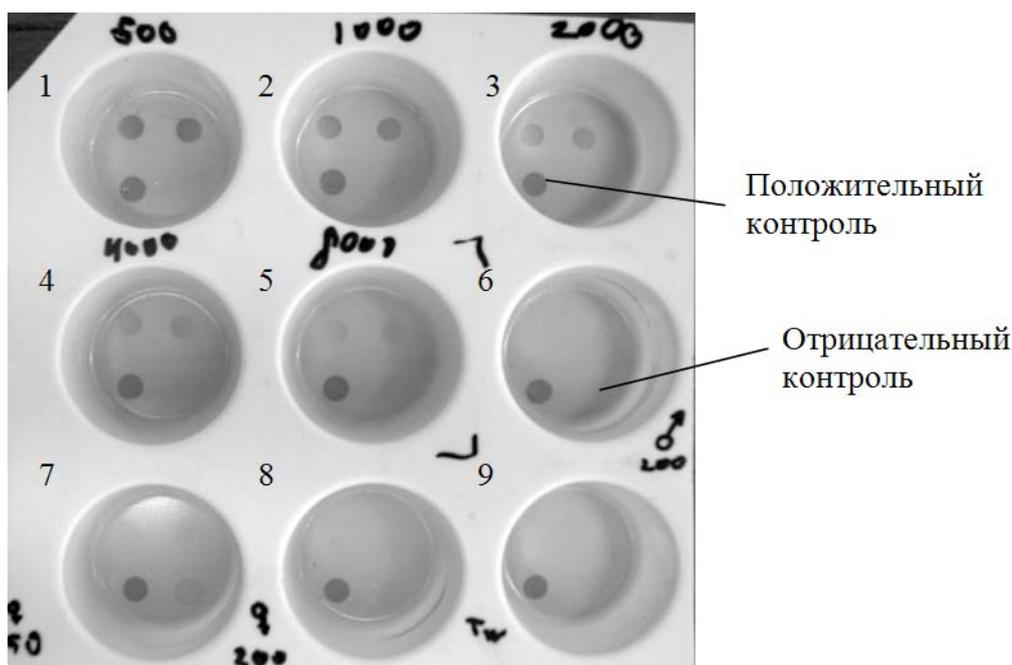


Рис. 3. Определение антител к токсину *Yersinia pseudotuberculosis* на непористой твердой фазе

Левая точка в нижнем ряду в каждой лунке – положительный контроль (K+), правая точка в нижнем ряду – внутренний отрицательный контроль (K-), верхний ряд – исследуемый образец. Схемы аналитических процедур:

Лунки 1–5: Токсин *Yersinia pseudotuberculosis*. + антитела к токсину *Yersinia pseudotuberculosis*. (с серийным разведением пробы, кратном двум) + G белок-C – полная аналитическая система;

Лунка 6: Токсин *Yersinia pseudotuberculosis*. + сыворотка № 1:200 + G белок-C – внешний отрицательный контроль;

Лунка 7: Токсин *Yersinia pseudotuberculosis*. + сыворотка № 2:50 + G белок-C – внешний отрицательный контроль;

Лунка 8: Токсин *Yersinia pseudotuberculosis*. + сыворотка № 3:200 + G белок-C – внешний отрицательный контроль;

Лунка 9: Токсин *Yersinia pseudotuberculosis*. + ЗФРТ + G белок-C – контроль конъюгата

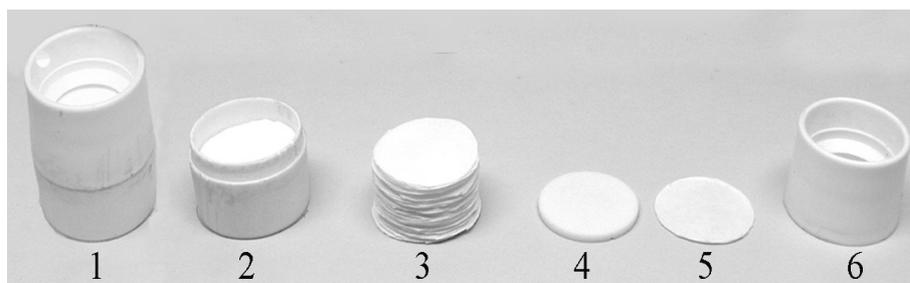


Рис. 4. Приспособление (ячейка) для иммунофльтрационного анализа:
1 – ячейка в сборе, 2 – нижняя часть корпуса, 3 – крупнопористый
впитывающий элемент, 4 – полипропиленовая подложка,
5 – твердофазный иммуносорбент, 6 – крышка ячейки
с отверстием для внесения реагентов

мембраны блокировали, замачивая их в блокирующем реагенте, содержащем 1 % казеина, на 1 час при комнатной температуре, после чего отмывали ЗФРТ и вновь высушивали. В ходе анализа в углубление крышки вносили 300 мкл ЗФРТ для смачивания иммуносорбента, следом 300 мкл предварительно подготовленной пробы, представляющей собой смесь равных объемов исследуемого образца (стандартная сыворотка для РПГА в разведении 1/300) и углеродного диагностикума с белком G в двукратном от рабочего разведении. После впитывания последней вносили 1 мл ЗФРТ для промывки поверхности мембраны. Время анализа составило 1,5–2 минуты. Результаты представлены на рис. 5.

Предложенный метод может оправдать себя как неинструментальный способ экспресс-диагностики серьезного заболевания с достаточной чувствительностью и привлекательными процедурными характеристиками.

Таким образом, использование диагностических конъюгатов на основе углерода способно помочь в решении ряда проблем лабораторной и внеклинической диагностики, связанных с недостатками и/или отсутствием тест-систем. На основе углеродных диагностикумов возможно создание принципиально новых систем диагностического тестирования, которые могут значительно сократить и упростить процедуру анализа, не требуя сложного лабораторного оборудования и специально обученного персонала.

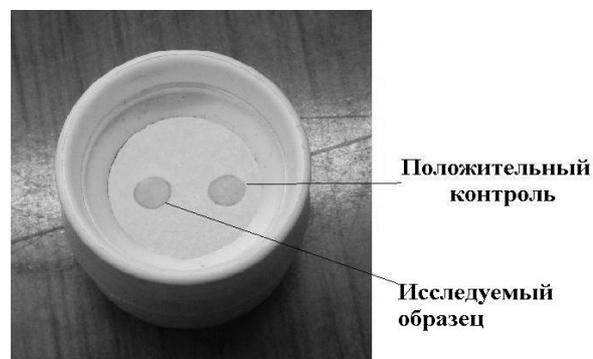


Рис. 5. Иммунофльтрационное определение антител к токсину *Yersinia pseudotuberculosis*

Библиографический список

1. Андрюков Б.Г. Родо- и видоспецифические белки *Yersinia pseudotuberculosis*, их использование для конструирования диагностических препаратов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Владивосток, 1999. – 24 с.
2. Девятилова С.И., Захарова Г.А., Нестерова Т.Г. Эпидемиологическая ситуация по псевдотуберкулезу в Приморском крае // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2010. – № 1–2. – Т. 41–42. – С. 124–125.
3. Плаксин Д., Раев М., Громаковская Е. Метод стереоспецифического анализа и метод получения конъюгата для стереоспецифического анализа. Патент РФ № 2089212 от 10.09.1997.
4. Псевдотуберкулез / Г.П. Сомов, В.И. Покровский, Н.Н. Беседнова [и др.]. – М.: Медицина, 2001. – 256 с.
5. Раев М.Б. Способ получения конъюгата для стереоспецифического анализа. Патент РФ № 2314827 от 20 января 2008.
6. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.Ф. Тимченко, Е.П. Недашковская, Л.С. Долматова [и др.] – Владивосток, 2004. – 220 с.

7. Characterization of antibody labeled colloidal gold particles and their applicability in a sol particle immunoassay (SPIA) / *J.M. Martin, M. Paques, T.A. Van der Velden-de Groot, E.C. Beuvery* // *J. Immunoassay*. – 1990. – Vol. 11. – № 1. – P. 31–47.
8. *Rayev M., Shmagel K.* Carbon-protein covalent conjugates in noninstrumental immunodiagnostic systems // *Journal of Immunological Methods*. – 2008. – Vol. 336. – № 1. – P. 9–15.
9. Reliable serodiagnosis of imported cystic echinococcosis with a commercial indirect hemagglutination assay / *H.R. Van Doorn, H. Hofwegen, R. Koelwijjn* [et al.] // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 57(4). – P. 409–412.
10. *Russel J.C., Yang H., Yost D.A.* Method for determining sample analyte amount-involves reacting sample with colloidal non-metal particles before optical measurement of analyte-particle complexes. *Europ. Pat.* 298368 A. – 11.01.89.
11. *Tarcha P.J., Wong M., Donovan J.J.* Indicator reagents, diagnostic assays and kits employing organic polymer latex particles. *Eur. Pat.* 89116594.6. – 28.05.1990.