

О.В. Федорова, Р.О. Петріна, Я.М. Станішевський¹

Національний університет “Львівська політехніка”,

кафедра технології біологічно-активних сполук, фармації та біотехнології

¹Московська державна академія тонкої хімічної технології ім. М.В. Ломоносова,

кафедра біомедичних та фармацевтичних технологій

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ПРАВЦЕВОГО АНАТОКСИНУ НА ЧАСТИНКИ ПОЛІМЕРНОГО НОСІЯ

© Федорова О.В., Петріна Р.О., Станішевський Я.М., 2008

Досліджено вплив способу іммобілізації біоліганду на чутливість тест-системи. Підбрано оптимальні умови для ковалентної взаємодії функціональних груп біоліганду з функціональними групами носія. Проаналізовано різницю між фізичною адсорбцією та ковалентною взаємодією.

Influence of the way to immobilization bioligand on sensitivity test-systems have been investigated. Optimum terms for covalent of the interaction of the functional groups bioligand with functional group of the carrier has been selected. The difference between physical adsorption and covalent interaction has been analysed.

Постановка проблеми. При конструюванні антигенних та антитільних діагностичних полімерних тест-систем широко використовуються синтетичні мікросфери, які повинні бути однорідні за розмірами. Це дає перевагу при використанні їх у діагностичних реакціях, тому що дає змогу доволі точно визначити площу поверхні носія білкових молекул і встановити ступінь її покриття антигеном чи антитілом. До таких синтетичних полімерних носіїв з вузьким розподілом частинок за розмірами належать суспензії з частинками полімеру строго сферичної форми та однакового діаметру, дисперговані у воді [1–4].

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. З аналізу літератури видно, що спосіб іммобілізації антигенів на полімерні мікросфери визначається їх природою [5–7]. Іммобілізація біолігандів на поверхні полімерних мікросфер проводять за рахунок фізичної адсорбції і за рахунок ковалентного зв'язування їх функціональних груп з функціональними групами полімеру, розташованими на поверхні частинок. У більшості випадків антигени фізично сорбуються на поверхню полістирольних частинок, наприклад, бактеріальні ліпополісахариди. Варіанти прямої іммобілізації специфічного імуноглобуліну забезпечують випадкову орієнтацію його на поверхні частинок. При цьому частина активних центрів молекули може бути закритою. Якщо молекула імуноглобуліну фіксована на поверхні Fc-фрагментом, а Fab-фрагмент, який несе активні центри орієнтований “назовні”, то ймовірність реагування такого діагностикому з антигеном значно вища. Аналог такого діагностикому використовують в реакції аглютинації.

Мета роботи – розроблення оптимальних умов для іммобілізації правцевого анатоксину на поверхню полімерних мікросфер шляхом фізичної адсорбції та ковалентної взаємодії функціональних груп біоліганду з функціональними групами полімеру-носія.

Експериментальна частина. Об'єктом дослідження є частинки полімерної дисперсії з карбоксильними групами на поверхні, одержані зародковою кополімеризацією стиролу та метакрилової кислоти на полістирольних зародкових частинках [3]. Синтезовані частинки відповідають вимогам, що висуваються для застосування їх в імунології: середній діаметр частинок становить 1,2 мкм, розподіл за розмірами вузький, агломераційна стійкість 0,15 М.

Перед адсорбцією анатоксину полістирольний латекс тричі промивали водою за допомогою центрифугування чи фільтрації (в останній промивці воду заміняли фосфатним буфером). Далі змішували однакові об'єми розчину антигену (конц. 1 мг/мл) в буфері і 3%-вої суспензії мікросфер у тому самому буфері і інкубували протягом ночі при 37 °С.

Від незв'язаного білка дисперсію мікросфер тричі відмивали фосфатним буфером (рН=8) на центрифугі "MPW-310" (Польща) при швидкості обертання ротора 13000 об/хв протягом 30 хв. Одержані так дисперсії з адсорбованим на їх поверхні правцевим анатоксином використовували надалі як латекс-тести для постановки реакції латексної аглютинації.

Ковалентне зв'язування правцевого анатоксину з карбоксильними групами, розташованими на поверхні полімерних мікросфер, проводили так: після центрифугування полімерну дисперсію переводили у фосфатно-буферний розчин (рН=7,2) і доводили концентрацію полімерної дисперсії до 0,5 %. 1 мл 0,5 %-ї суспензії змішували з розчином 1мл карбодіміду (КДІ), концентрація якого дорівнювала 0,1 мг/мл. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі дисперсію тричі відмивали від непрореагованого КДІ фосфатним розчином (рН=7,2) і центрифугували. Полімерну дисперсію, частинки якої містили на поверхні активовані карбоксильні групи полімеру, змішували з таким самим об'ємом розчину біоліганду (з різною концентрацією), взятого в кількості 2 мл. Після інкубації протягом 4 годин при температурі +37 °С біоліганд, що не зв'язався, відмивали, центрифугуючи розчин тричі по 15 хв при 4000 об/хв, і доводили фосфатним буфером (рН =7,2) концентрацію дисперсії до 0,1 %.

Результати та їх обговорення. Процес фізичної адсорбції біоліганду на поверхню частинок носія залежить від багатьох факторів – від природи поверхні (ступеня гідрофільності або гідрофобності, однорідності), від присутності поверхнево-активних речовин у дисперсійному середовищі, від зміни умов іммобілізації та зберігання.

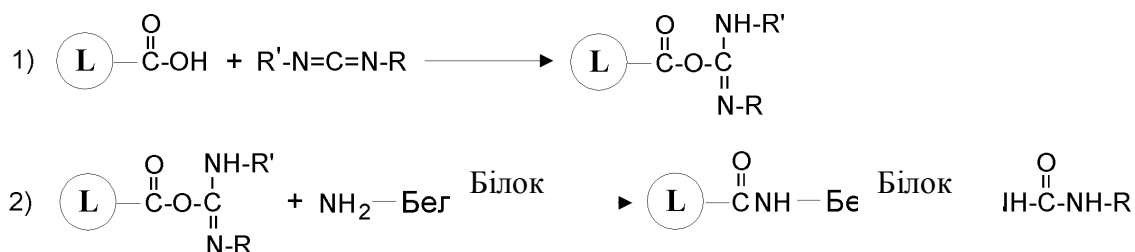
Процес ковалентного зв'язування білків з функціональними групами на поверхні полімерних мікросфер залежить від факторів, що впливають і на процес їх адсорбції. Однак, насамперед він визначається природою полімеру і функціональних груп, що знаходяться на поверхні полімерних частинок, здатних безпосередньо або після активації зв'язувати білок [8].

Водночас для одержання високочутливого діагностикуму методи активації повинні задовольняти такі вимоги:

- проходити незворотно і кількісно при м'якших умовах;
- не зменшувати стабільність дисперсій, помітно не впливати на діаметр і РЧР;
- зберігати біохімічну активність молекул біоліганду, ковалентно зв'язаного з функціональними групами полімеру, розташованими на поверхні частинок дисперсії.

Карбоксильні групи полімеру, розташовані на поверхні частинок дисперсій, можуть взаємодіяти з аміногрупами біополімеру в присутності водорозчинних карбодімідів (ВРК). Найбільше використовуються такі ВРК: 1-циклогексил-3 (2-морфоліноетил) карбодімідтолуолсульфонат і 1-етил 3 (3-диметиламінопропіл) карбодімідгідрохлорид.

Процес активації карбоксильних груп частинок носія в наших дослідженнях відбувався за схемою:



Запропонований нами метод іммобілізації біоліганду – правцевого анатоксину на полістирольних колоїдних частинках дає можливість створення полімерних діагностичних імунотетів для експрес-діагностики правця.

При створенні антигенної полімерної тест-системи на правцевий анатоксин іммобілізацію біоліганду проводили двома шляхами: фізичною його адсорбцією на поверхню полімерних мікросфер та ковалентним зв'язуванням з активованими карбодіімідом карбоксильними групами частинок носія.

За першим варіантом досліду проводили іммобілізацію антитоксичною правцевою сироваткою, очищеною методом “діаферм” шляхом фізичної адсорбції на полімерні мікросфери.

За другим варіантом одержували аналогічну систему, яка відрізняється тим, що до карбоксильних груп полімеру, які розташовані на поверхні частинок, ковалентно приєднували антитіла. Результати визначення анатоксину одержаними антитільними діагностикумами наведені у таблиці.

Визначення концентрації правцевого анатоксину антитільними діагностикумами

Доза сенситину, МО	Карбоксильні групи полімеру на поверхні частинок			
	Активовані (ковалентна взаємодія)		Неактивовані (фізична адсорбція)	
	Титр РЛА	Виявлена конц. анатоксину, мкг/мл	Титр РЛА	Виявлена конц. анатоксину, мкг/мл
5,9	640	0,4	640	0,4
23	5120	< 0,05	640	0,4
93,7	5120	< 0,05	1280	0,2
375	5120	< 0,05	640	0,4

Примітка. Сенситин – досліджувана біорідина.

З наведених в таблиці даних видно, що при ковалентному приєднанні антител до функціональних груп полімерних частинок можна одержати значно чутливіші діагностикуми, чим при фізичній сорбції сенситину на їх поверхню, про що свідчить концентрація антигену, що визначався.

Висновки. Отже, доведено, що при конструюванні антитільних та антигенних полімерних діагностикумів існують два шляхи їх створення: ковалентне приєднання антитіл та антигенів, очищених і без Fc-фрагмента, за допомогою ковалентного зв'язку з активованими карбоксильними групами полімеру-носія і шляхом фізичної адсорбції біоліганду на поверхню частинок.

Перший з варіантів не має обмежень видової належності іммобілізованих антитіл та антигенів, але він не забезпечує ефективної їх орієнтації на поверхню носія. Другий варіант не має цього недоліку, але є обмеження стосовно зв'язування тільки певних субкласів імуноглобулінів, які мають тільки окремі види продуцентів. Крім того, біоліганд, що фізично сорбувався на поверхню частинок полімерної дисперсії, легко десорбується з неї при незначних змінах рН середовища, температури тощо.

1. Bae Y.H., Okano T., Kim S.W. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly (N,N-alkyl substituted acrylamides) in water // *J. Polym. Sci., Polym. Phys.* – 1990. – Vol. 28. – P. 923–936. 2. Klein F., Bronsveld W., Norde W., van Romunde L.K.J., Singer J.M. A modified latex-fixation test for the detection of rheumatic factors // *J. Chem. Pathol.* – 1979. – Vol. 32. – P. 90–92. 3. Синтез полімерних суспензій для біоаналітичних досліджень / О.В. Федорова, Р.О. Петріна, В.П. Новіков, Я.М. Станішевський, І.О. Грицкова, М.І. Прокопов // *Вісн. Нац. ун-ту “Львівська політехніка”*. – 2006. – № 553: Хімія, технологія речовин та їх застосування. – С. 315–317. 4. Петріна Р.О., Кісельов Є.М., Зарічна О.З., Новіков В.П. Полімерні мікросфери для ковалентного зв'язування біоспецифічних лігандів // *Вісн. Держ. ун-ту “Львівська політехніка”*. – 1999. – № 374. – С. 70–73. 5. Bangs L.B. Immunological applications of microspheres / L.B. Bangs // *The Latex Course*. – 1996. – № 4. – P. 1–29. 6. Елинов Н.П. Химическая микробиология / Н.П. Елинов. – М.: Высш. шк., 1984. – С. 294. 7. Carney J. Rapid diagnostic tests employing latex particles / J.Carney // *Anal. Proc.* – 1990. – Vol. 27. – P. 99–100. 8. Tuncel A. Monosize Polystyrene Latices Carrying Functional-Groups on Their Surfaces / A. Tuncel, R. Kahraman, E. Piskin // *J. Appl.Polym.Sci.* – 1994. – Vol. 51, Iss 8. – P. 1485–1498.