

О.В. Федорова, Ю.А. Думанська, О.Я. Залуська
Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра технології біологічно активних сполук, фармацевції та біотехнології

ОДЕРЖАННЯ АНТИТІЛЬНИХ ДІАГНОСТИЧНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ЗАДАНОЇ СПЕЦИФІЧНОСТІ

© Федорова О.В., Думанська Ю.А., Залуська О.Я., 2007

Вивчена технологія іммобілізації антитіл на полімерних носіях. Сконструйовані два варіанти антитільних діагностикумів: іммобілізацією антитіл через ковалентно зв'язаний спейсор-протеїн А; прямою іммобілізацією антитіл до функціональних груп носія.

Technology to antibody immobilizations on polymeric carriers have studied. Two variants of antibody's diagnosticums have constructed by two methods: immobilization of antibody through covalent bound spator-protein A; the direct immobilization of antibody to functional groups of the carrier.

Постановка проблеми і її зв'язок з важливими науковими завданнями. Полімерні мікросфери з вузьким розподілом частинок за розмірами використовують у різних галузях науки та техніки, наприклад, як калібрувальні еталони в електронній та оптичній мікроскопії, світлорозсіюванні, у разі підрахунку аерозольних частинок, для рахування вірусних частинок, визначення розмірів пор фільтрів та біомембран, для стимулювання клітинного продукування антитіл та їх очищення, як модельні колоїдні системи для вивчення реології, стабільності тощо. Останнім часом синтетичні мікросфери широко використовують під час конструювання антигенних діагностичних тест-систем.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. З аналізу літератури видно, що спосіб іммобілізації антигенів на полімерні мікросфери визначається їх природою [1–4]. Здебільшого антигени фізично сорбуються на поверхню полістирольних частинок, наприклад, бактеріальні ліпополісахариди. Іммобілізація антигенів білкової природи, отже, не дає стабільних результатів, тому їх ковалентно зв'язують з функціональними групами полімерних частинок.

Загальними прийомами приєднання таких біолігандів є ковалентний зв'язок відповідних поверхневих груп носія з аміно- чи карбоксильними групами ліганда. Варіанти прямої іммобілізації специфічного імуноглобуліну забезпечує випадкову орієнтацію його на поверхні частинок. При тому 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 діагностикуму з антигеном значно вища. Аналог такого діагностикуму використовують у реакції аглютинації. У цьому разі як носій використовуються мікроби, які експресують на поверхню рецептори, що фіксують γ -глобулін. У *S. aureus* таким рецептором є протеїн А.

Мета. Метою роботи є одержання антитільного діагностикуму за допомогою синтетичного носія. Необхідно було до поверхні частинок іммобілізувати протеїн А, який має значення спейсора, а потім через нього приєднати специфічний γ -глобулін.

Проведення експерименту. Для іммобілізації спейсора було обрано полімерні частинки, стабілізовані полівінілпіролідом з реакційноздатними альдегідними групами на поверхні. Порівняно з іншими білками найефективніше приєднувався протеїн А, менш ефективно анатоксин, а желатин до таких частинок не приєднувався. Сенсibilізовані протеїном А частинки взаємодіяли з γ -глобуліном сироватки людини в титрі 1:16380. Частинки, сенсibilізовані анатоксином, взаємодіяли з тією ж сироваткою тільки до титру 1:20. При цьому вказана сироватка з антигенним еритроцитарним діагностикумом була активна в розбавленні 1:5000, тобто латексний антигенний діагностикум був менш активний, ніж еритроцитарний.

Проведені дослідження показують, що під час іммобілізації білків беруть участь альдегідні групи носія. Саме той факт, що нативний протеїн А активно зв'язується з функціональними групами носія, а оброблений формаліном анатоксин, що являє собою молекулу білка із зміненою конформацією, менш ефективно взаємодіє з цими групами, але в той же час достатньо добре сорбується на еритроцитах.

Ковалентно зв'язаний протеїн А зберігає спейсорну функцію. Сенсibilізовані ним частинки аглютинувались сироватковим γ -глобуліном людини і крілика в титрі 1:2560–1:16380 і 1:40–1:640 відповідно. Необхідно відмітити, що вказані властивості залишались стабільними під час зберігання суспензій протягом півроку. Отже, ми мали в розпорядженні імуносорбент, придатний для іммобілізації на ньому антитіл різної специфічності. Обмеженням при цьому є таке:

– антитіла, взяті для іммобілізації через спейсор, повинні містити Fc-фрагмент. У цьому сенсі не придатні є антитоксичні сироватки, очищені методом “діаферм”, оскільки Fc-фрагмент імуноглобуліну в них відділяється;

– видова приналежність γ -глобуліну також обмежує можливість взаємодії його із спейсором;

– у цьому випадку, коли відбувається вказаним способом іммобілізація антитіл з нативних сироваток, необхідно враховувати їх титр. Низькотитражні сироватки є для цього непридатні.

Використовуючи полімерні мікросфери, сенсibilізовані протеїном А, було проведено дослідження з отримання антитільних діагностиків різної специфічності: ієрсиніозної – до *Yersinia enterocolitica* серотипу 03, лептоспірозний – до *L. canicola*, сальмонельозний – до *S. pulorum*, до вірусу ІБК штаму Н120. Мінімальна кількість протеїну А, необхідна для повного зв'язування з реакційно здатними групами полімерної суспензії, становить 0,05 мг/мл.

Визначено максимальну кількість γ -глобуліну (для різних сироваток) на поверхні кон'югату “полімерна мікросфера-протеїн А”, при якій не відбувається аглютинація частинок (субаглютинаційна одиниця (СО)). Ці величини наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Результати реакції між протеїном А, що міститься на поверхні мікросфер, і антитілами різної специфічності

Концентрація протеїну А, мг/мл	Агрегативна стійкість частинок		Титр РЛА					Контр-роль без сироватки
	в ФБР рН= 7,2	концентрація доданого альбуміну, %	з нормальною людською сироваткою	з імуноною кишковою ієрсиніозною сироваткою крілика	з імуноною пулорозною сироваткою крілика	з гіперімуноною лептоспірозною сироваткою крілика	з позитивною сироваткою вірусу ІБК*	
частинки без протеїну А	+	(-)0,0062	-	-	-	-	-	-
0,03	+	(-)0,0031	1:1280	1:40	1:20	1:320	1:32	-
0,05	+	(-)0,78*10 ⁻⁵	1:2560	1:80	1:40	1:640	1:64	-
2,5	+	(-)0,78*10 ⁻⁵	1:2560	1:80	1:40	1:640	1:64	-

+ агрегативно нестійкі; – агрегативно стійкі

* - ІБК – Інфекційний бронхіт курей.

Одержану сироватку з максимальною концентрацією γ -глобуліну змішували з рівним об'ємом 0,09% полімерної суспензії, частинки якої на поверхні містили ковалентно приєднаний протеїн А.

Під час одержання антитільних діагностиків було встановлено, що приєднання через спейсор-протеїн А людського γ -глобуліну відбувається за великих розбавлень сироватки, порівняно з γ -глобуліном крілика.

У цьому випадку, коли титр сироватки в серологічних реакціях нижче СО імуносорбенту “полімерна мікросфера-протеїн А”, іммобілізований γ -глобулін не взаємодіє з антигеном. З цієї причини не вдавалось одержати діагностикум до анатоксину на основі людської сироватки. Тільки в тому випадку, коли кількість специфічного γ -глобуліну перевищує кількість неспецифічного, можливе одержання працюючої з антигеном системи. Цю ситуацію можна контролювати відношенням титру сироватки в серологічній реакції і титру, що визначається в РЛА цієї ж сироватки з імуносорбентом.

Таблиця 2

Активність імуносорбенту і сироватки

Сироватка	Аглотинація частинок, сенсibilізованих протеїном А	Титр імунних сироваток
Людини, щепленої правцевим анатоксином	1 : 16380	1 : 5096*
Крілика до <i>Yersinia enterocolitica</i>	1 : 80	1 : 6400*
Крілика до <i>S. pulorum</i>	1 : 40	1 : 400**
Крілика до <i>L. canicola</i>	1 : 640	1 : 10000***

* – сироватка, відтитрована в пасивній гемаглютинації (РПГА)

** – сироватка, відтитрована в бактеріальній аглютинації (РА)

*** – сироватка, відтитрована в мікроаглютинації (РМА)

Одержані антитільні діагностикуми виявились дуже чутливими. У табл.3. наведено мінімальні концентрації антигенів і живих мікробів, що ними визначаються.

Таблиця 3

Активність антитільних діагностикумів

Діагностикум на основі:	Концентрація антигену, що виявляється антитільним діагностикумом		
Сироватки кишково-ієрсиніозної (1:160)	<i>Yersinia enterocolitica</i> 0,061мкг/мл		
Частинки без протеїну А	-		
Сироватки пулорозної (1:80)	<i>S.pul</i> 300кД* 1,09мкг/мл	<i>S.pul</i> 100- 300кД* 1,95мкг/мл	<i>S.pul</i> 30-100кД* 0,02мкг/мл
Частинки без протеїну А	-	-	-
Сироватки лептоспірозоної (1:1280)	<i>L. canicola</i> 4296кл/мл		
Частинки без протеїну А	-		
Сироватки проти вірусу ІБК (1:128)	Вірус ІБК штамп Н120 10 ⁶ ЕІД ₅₀ **		
Частинки без протеїну А	-		

Титр сироваток у серологічній реакції для: кишково-ієрсиніозної (1:80), пулорозної (1:40), лептоспірозоної (1:640), проти вірусу ІБК (1:64).

* – фракція О-антигену.

** – ЕІД₅₀ – Ембріональна інфекційна доза.

Ці дані дають змогу констатувати, що приєднання через спейсор антитіл не впливає на специфічність системи, а полімерні мікросфери, іммобілізовані протеїном А, є універсальними для діагностикумів різної специфічності.

Спейсорне преднання антитіл через протеїн А неможливе у тому разі, якщо взяті для іммобілізації антитіла не мають Fc-фрагмента. Саме така ситуація виникає під час використання очищених методом “діаферм” сироваток.

Під час створення антитільної тест-системи на правцевий анатоксин необхідно було вибрати спосіб іммобілізації біоліганда: фізична його адсорбція на поверхню полімерних мікросфер чи ковалентне зв'язування з функціональними групами полімеру частинок.

У першому варіанті досліду проводили іммобілізацію антитоксичною правцевою сироваткою, очищеною методом “діаферм”, шляхом фізичної адсорбції на полімерні мікросфери.

У другому варіанті отримували аналогічну систему, яка відрізняється лише тим, що до карбоксильних груп полімеру, які розташовані на поверхні частинок, ковалентно приєднували антитіла. Результати визначення анатоксину одержаними антитільними діагностикумами наведені в табл. 4.

Таблиця 4

Визначення концентрації правцевого анатоксину антитільними діагностикумами

Доза сенситину в (МО)	Карбоксильні групи полімеру на поверхні частинок			
	активовані		неактивовані	
	Титр РЛА	Виявлена конц. анатоксину в мкг/мл	Титр РЛА	Виявлена конц. анатоксину в 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

Отже, у разі ковалентного приєднання антитіл до функціональних груп полімерних частинок можна одержати значно чутливіші діагностикуми, ніж у разі фізичної сорбції сенситину на їх поверхню.

Висновки. Отже, було показано, що під час конструювання антитільних діагностикумів можливі два шляхи їх створення: ковалентне приєднання антитіл, очищених і без Fc-фрагмента, за допомогою ковалентного зв'язку з активованими карбоксильними групами полімеру-носія і через іммобілізований спейсор – комплементарний Fc-фрагмента.

Перший з варіантів не має обмежень видової приналежності іммобілізованих антитіл, 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 імуноглобуліну, які мають тільки окремі види продуцентів. Необхідно відмітити, що спейсорна іммобілізація антитіл забезпечується афінною взаємодією імуноглобуліну з протеїном А, це не потребує попереднього виділення і очистки γ -глобулінової фракції. Крім того, відмічається висока активність сорбенту.

1. Петріна Р.О., Кісельов Є.М., Лонич Л.І. Полімерні носії для імунодіагностики // Вісник Нац. ун-ту “Львівська політехніка”. – 2000. – №414. – С. 162–164. 2. Петріна Р.О., Кісельов Є.М., Новіков В.П. Дослідження діагностикумів, створених на основі композиційних матеріалів полімер-біополімер // Хімічна промисловість України. – 2002. – №3. – С. 34–36. 3. *Polymer Latexes: Preparation, Characterization, and Applications (ACS Symposium, No 492)* // Ed.by Daniels E.S., Sudol E.D., El-Aasser M.S. – N.-Y.: Kluwer Academic Pub. –1998. – 437 p. 4. Федорова О.В., Петріна Р.О., Новіков В.П., Станішевський, І.О. Грицькова Я.М., Прокопов М.І.. Синтез полімерних суспензій для біоаналітичних досліджень // Вісник Нац. ун-ту “Львівська політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – № 553. – 2006. – С. 315–317.