УДК 577.27:57.083.33:543.54

ЗАСТОСУВАННЯ АНАЛІТ-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ФЕРМЕНТ-АКТИВУЮЧОЇ СИСТЕМИ АМПЛІФІКАЦІЇ СИГНАЛУ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ НИЗЬКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ БІОАНАЛІТІВ

О. Ю. ГАЛКІН[1], Ю. В. ГОРШУНОВ[2]

[1]Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ

[2]Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, Київ

В роботі представлені результати розробки і характеристики імуноферментного аналізу (ІФА) для визначення загальних IgE-антитіл із застосуванням тирамін-біотінового реагенту (ТБР). Було показано, що використання модифікацій ІФА з авидин-біотіновим посиленням сигналу (АБУ) і ТБР істотно розширюють можливості застосування аналізу в дозах IgE людини нижче 50 МО/мл. З метою діагностики найбільш прийнятним виявився ІФА з АБУ, разом з тим, у випадках, коли виникає потреба у визначенні надмалих концентрацій аналіту (сотні пікаграмм), єдиним можливим варіантом залишається ІФА з ТБР. За використаної концентрації реагентів ІФА динамічний діапазон для всіх модифікацій склав три порядки.

Ключові слова: *імуноферментний аналіз, тирамін-біотіновий реагент, авідин-біотінове посилення сигналу, IgE людини.*

Вступ. У літературі описано принциповий підхід до аналіт-опосередкованої ампліфікації сигналу імуноферментного аналізу (ІФА), який базується на використанні речовини тирамін, яка проявляє необхідну у даному випадку біологічну активність у присутності ферменту пероксидази хрону та

відповідного субстрату (перекис водню) [1, 2]. У системі ІФА пероксидаза хрону може з'являтися у складі імунного комплексу лише у випадку аналізу позитивного зразка. Таким чином, підсилення сигналу відбувається лише для позитивних зразків, тобто мова йде про аналіт-залежний механізм ампліфікації сигналу. Тирамін-вмісний реагент через залишки тирозину (взаємодія через фенольну гідроксильну групу) приєднується до різного роду білків: антигенів та антитіл імунного комплексу, а також нейтральних білків, які сорбовані у лунках планшету. Фактично специфічне введення великої кількості біотин-вмісного реагенту до складу імунного комплексу відкриває нові можливості до підсилення рівня сигналу у ІФА.

Слід зазначити, що дана система має певні обмеження у імуногістохімічних дослідженнях через ймовірність неспецифічного підсилення сигналу завдяки ендогенному біотину, що присутній у досліджуваному зразку. Для подолання такої проблеми в імуногістохімії використовують не біотинову мітку, а флуоресцентну (наприклад, флюоресцеїн), а замість стрептавідин-пероксидазного комплексу використовують антитіла проти флуоресцентної мітки [3]. Зважаючи на розроблюваний варіант аналізу (класичний ІФА із дослідженням у лунках планшетів), припустимий вміст ендогенного біотину не має впливати на рівень сигналу аналізу, тому доцільно зупинитися на розробці ІФА із використанням тирамін-біотинового реагенту та стрептавідин-пероксидазного комплексу.

Метою роботи була оцінка аналіт-опосередкованої фермент-активуючої системи ампліфікації сигналу ІФА для визначення низьких концентрацій біоаналітів (на прикладі IgE-антитіл людини).

Матеріали і методи досліджень.

Синтез пероксидазних кон'югатів проводили перйодатним методом [4] із власними модифікаціями. Кон'югування моноклональних антитіл (МАТ) з пероксидазою хрону (ПХ) проводили у масовому співвідношенні антитіл до ферменту 2:1. Пероксидазу хрону («Sigma», США) розчиняли в 0,1 М бікарбонатному буфері (pH 8,3) до концентрації 15 мг/мл і додавали рівний

об’єм водного розчину періодату натрію із концентрацією 14 мМ. Для окислювання ПХ суміш інкубували 2 год при кімнатній температурі. Отриманий розчин окисленої ПХ змішували з розчином антитіл, попередньо віддіалізованих проти 0,1 М карбонатного буфера (pH 9,2). Суміш переносили в хроматографічну колонку і додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25 («Fluka», Швейцарія), інкубували 3 год при кімнатній температурі. Розчин кон’югату елюювали з колонки і додавали 1/20 об’ємну частину водного розчину $NaBH_4$ (5 мг/мл). Для зупинки реакції суміш залишали на 30 хв при кімнатній температурі, додавали ще 3/20 частини розчину $NaBH_4$, інкубували 60 хв. Отриманий розчин пероксидазного кон’югату МАТ діалізом переводили в 0,02 М фосфатний буфер, що містить 0,15 М NaCl.

Біотинування білків. Біотинування антитіл проводили за J. Goding [5]. До 0,9 мл розчину антитіл у концентрації 1 мг/мл, після діалізу протягом 12 год проти 0,1 М карбонатно-бікарбонатного буфера pH 8,6, додавали 0,1 мл диметилсульфоксиду, що містить 0,1 мг N-гідроксисукцінімідного ефіру амінокапроїдбіотину. Після 4 год інкубації в темноті при кімнатній температурі для зупинки реакції додавали 1 М розчин хлориду амонію (20 мкл на 1 мг антитіл) і діалізували проти фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБ), що містить 0,1% азиду натрію, з метою видалення ефіру біотину, що не зв’язався, при +4 °С протягом 12-14 годин.

Отримання олігомерного кон’югату стрептавідин-пероксидаза проводили за базовою методикою [5] з модифікаціями [6]. 40 мг пероксидази хрону (лужна ізоформа) (Sigma, США) розчиняли в 2 мл води, додавали 200 мкл 0,25 М $NaIO_4$ та інкубували при кімнатній температурі 20 хв у темноті. До розчину додавали 1/3 об’єму сухого сефадексу G-15 та перемішували 10 хв у темноті при кімнатній температурі. Отриману суспензію центрифугували 5 хв зі швидкістю 4000 об/хв при кімнатній температурі. Супернатант відбирали, а осад сефадексу G-15 промивали 0,5 мл води і знову центрифугували. Супернатант об’єднували і діалізували проти 0,1 М боратного буфера (pH 9,4) 2 год при 4 °С. Для амінування ПХ до 1 мл окисленої пероксидази

(концентрація приблизно 10 мг/мл) додавали етилендіамін до концентрації 25 мМ і аскорбат натрію до концентрації 2,5 мМ, інкубували 2 год при кімнатній температурі і діалізували 12 год проти 0,1 М боратного буфера, pH 9,4, при 4 °С. Спектрофотометрично визначали концентрації амінованої й окисленої ПХ, змішували у співвідношенні 3:1, 1:1 і 1:3 за масою та інкубували 2 год при кімнатній температурі. Додавали стрептавідин, віддіалізований проти 0,1 М боратного буфера, pH 9,4, у співвідношенні пероксидаза : стрептавідин 2:1 - 10:1 за масою та інкубували 3 год при кімнатній температурі в темноті. Потім додавали аскорбат натрію до концентрації 2,5 мМ, інкубували 2 год при кімнатній температурі і діалізували проти ФСБ 12 год при 4 °С. Кон'югат використовували без подальшого фракціонування.

У роботі використовували ТБР з набору ELAST ELISA Amplification System («PerkinElmer», США).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Для оцінки прийнятності об'єму вибірки (кількості повторних вимірювань) використовували експериментальний рівень значимості P, вважаючи його достатнім, якщо розраховане за вибіркою значення критерію не перевищувало критичного значення рівня значимості $\alpha = 0,05$ ($P<0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення. Для порівняльної оцінки різних варіантів ІФА для визначення загального IgE людини у різних біологічних рідинах необхідно було провести наукову розробку відповідних модифікацій аналізу. ІФА, що базується на класичному варіанті антитільного «сендвічу» [7], повною мірою не може бути використаний для порівняльної оцінки системи ампліфікації сигналу, тому необхідним є розробка двох нових варіантів ІФА: по-перше, модифікації антитільного «сендвічу» із застосуванням авідин-біотинової системи підсилення сигналу (АБП) [8]; по-друге, модифікацію антитільного «сендвічу» із використанням аналіт-опосередкованої фермент-активуючої системи ампліфікації сигналу (рис. 1).

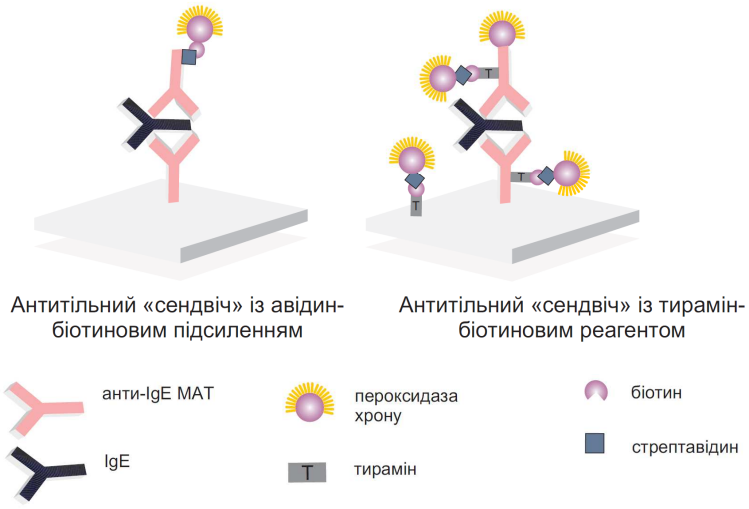


Рис. 1. Модифікації ІФА для виявлення загальних IgE-антитіл із різними схемами підсилення сигналу

Конструювання імуноферментного аналізу модифікації антитільний «сендвіч» (із застосуванням біотинової системи підсилення сигналу) проводили на базі попередніх результатів щодо розробки ІФА для визначення загального IgE людини за принципом класичного антитільного «сендвіча» [7] та розробки непрямого ІФА для виявлення специфічних IgE-антитіл (з авідин-біотиновим підсиленням сигналу) [8]. На твердій фазі сорбували моноклональні антитіла (МАТ) 164H10, що спрямовані до епітопу Е2, а для кон'югування використовували моноклональні антитіла 165C12 (епітоп Е1.1) та 166B7 (епітоп Е1.3) (у форматі сумісного використання кон'югатів відповідних МАТ) [9]. Вплив неспецифічних взаємодій у даному випадку не міг позначитися на рівні сигналу ІФА, тому інкубацію біокомпонентів проводили при найбільш прийнятній для лабораторної служби температури 37 °С упродовж 1 год. Інкубацію біотинільованих реагентів проводили у фосфатно-сольовому буферному розчині із додаванням твін-20 та казеїну (50 мг/мл), pH 7,2-7,4. Аналогічний буферний розчин був використаний й при інкубації стрептавідин-пероксидазного реагенту.

Порівняльну характеристику різних модифікацій ІФА проводили аналізуючи характер стандартних кривих, а також рівень варіабельності

визначення стандартних концентрацій IgE людини в одній постановці та між постановками, тобто прецизійність аналізу на різних рівнях. Варіант ІФА із застосуванням тирамін-біотинового реагенту (ТБР) вивчали для трьох різних розведень кон'югату тираміну з біотином – 1:500, 1:1000 та 1:2000. Відповідні дані, приведені на рис. 2, свідчать про те, що рівень сигналу у ІФА при одних і тих же концентраціях аналіту у модифікації антитільний «сендвіч» з АБП в діапазоні доз 5÷50 МО/мл у 1,33÷1,48 рази перевищує сигнал у ІФА, що побудований за принципом класичного антитільного «сендвіча». При застосуванні ТБР рівень сигналу зростає ще більше – для даного діапазону доз спостерігається підсилення у 1,90÷4,44 рази. Важливо відзначити, що із застосуванням ТБР з'являється можливість визначення аналіту у концентрації меншій за 5 МО/мл. Також зазначимо, що для різних розведень ТБР верхня межа визначення зсувається до значень 50÷100 МО/мл.

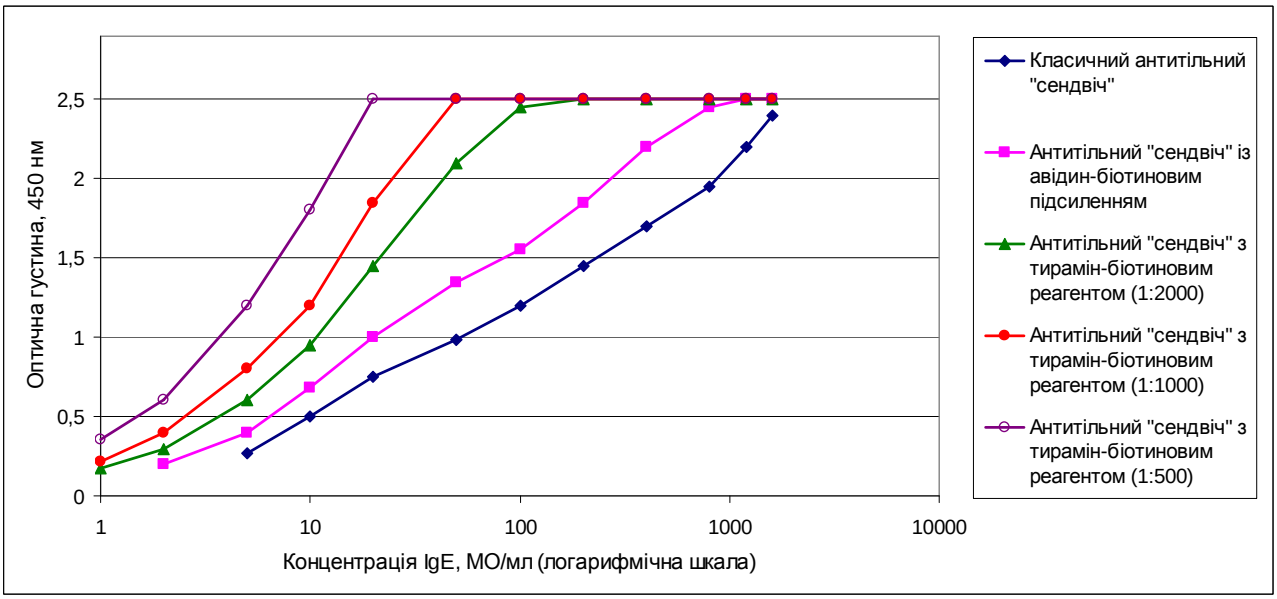


Рис. 2. Порівняльна характеристика стандартних кривих різних модифікацій ІФА при визначенні загального IgE людини

Для повноцінної характеристики кожної із різновидностей аналізу важливим є не тільки динамічний діапазон та характер стандартної кривої, але й прецизійність аналізу як один із важливих валідаційних характеристик будь-якого аналітичного методу. Тому для кожного із розроблених модифікацій ІФА

були досліджені рівні варіабельності визначення стандартних концентрацій IgE людини в одній постановці (Intra-CV) та між постановками (Inter-CV) (рис. 3-6). Оцінку варіабельності аналізу проводили лише для тих точок стандартної кривої, які не перевищують можливості фотометричної детекції сигналу (оптична густина < 2,5 оптичних одиниць).

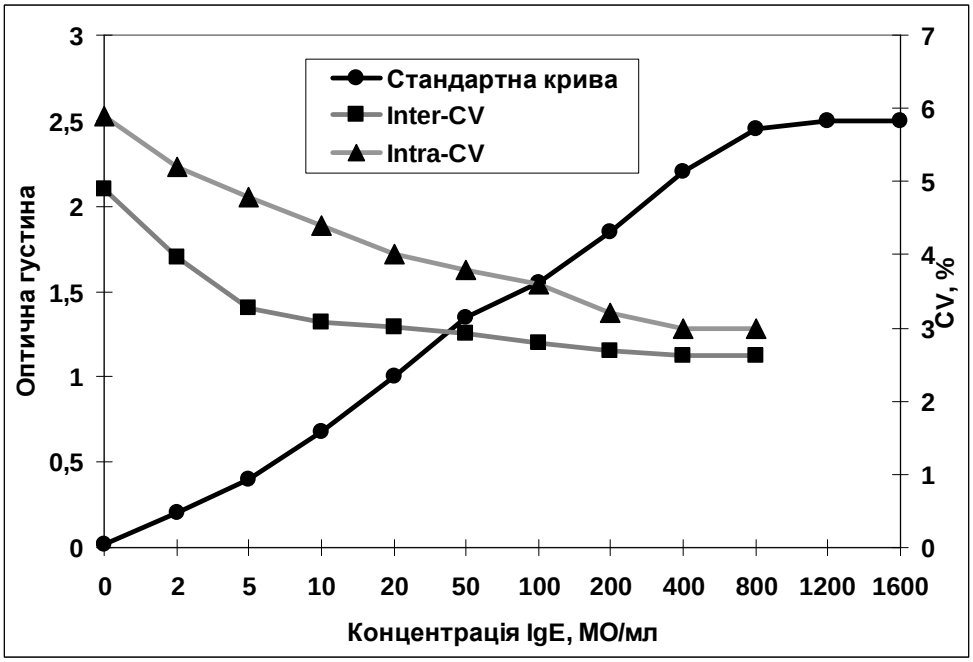


Рис. 3. Стандартна крива ІФА модифікації антитільний «сендвіч» з авідин-біотиновим підсиленням (–●–) й рівень варіабельності визначення стандартних концентрацій IgE в одній постановці (Intra-CV; –■–) та між постановками (Inter-CV; –▲–)

Аналізуючи отримані дані, слід зупинитися на наступному. На рівні стандартів IgE людини всі досліджувані варіанти ІФА демонстрували допустимі рівні варіабельності, виходячи із значень коефіцієнтів варіації (CV) в рамках однієї постановки й між різними постановками аналізу. Разом із тим, діапазон значень концентрації аналіту, у якому спостерігалася стабілізація значень CV, був відмінний для різних модифікацій ІФА. У досліджуваному діапазоні значень концентрацій аналіту найбільш широким стабільним діапазоном (5÷800 МО/мл) значень характеризувався ІФА модифікації

антитільний «сендвіч» з АБП (рис. 3): intra-CV знаходився у діапазоні від 2,7±1,3% до 3,0±1,7%), inter-CV – від 2,7±1,2% до 3,2±1,5%.

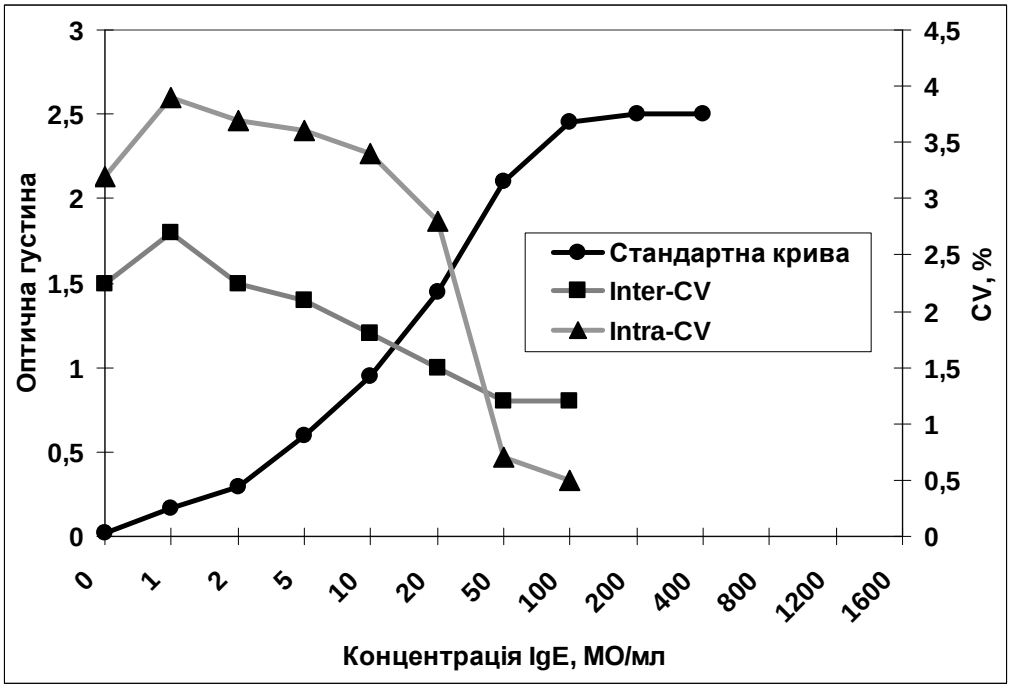


Рис. 4. Стандартна крива ІФА модифікації антитільний «сендвіч» з тирамін-біотиновим реагентом (1:2000) (–●–) й рівень варіабельності визначення стандартних концентрацій IgE в одній постановці (Intra-CV; –■–) та між постановками (Inter-CV; –▲–)

Характер зміни варіабельності аналізу від досліджуваної концентрації аналіту при застосуванні тирамін-біотинового реагенту був цілком іншим. По-перше, у досліджуваному діапазоні значень IgE людини не спостерігалося широкого діапазону доз із явно вираженим стабілізованим рівнем CV – найбільш стабільним діапазоном були концентрації IgE від 1 до 10 МО/мл. По-друге, для всіх варіантів аналізу із ТБР спостерігалося помітне зменшення рівня варіабельності аналізу для зразку із концентрацією 0 МО/мл, що вказувало на більшу відносну специфічність даної модифікації аналізу. Така ситуація, скоріше за все, обумовлена самим принципом підсилення сигналу, який носить субстрат-залежний характер. Тобто внесення навіть надлишкової кількості ТБР не призводить до зростання рівня неспецифічної взаємодії, на кшталт класичній схемі аналізу, коли кон'югат із міткою може, певною мірою, взаємодіяти

неспецифічно, призводячи до підвищення так званого фонового сигналу, й, тим самим зменшуючи специфічність аналізу та погіршуючи його аналітичні характеристики.

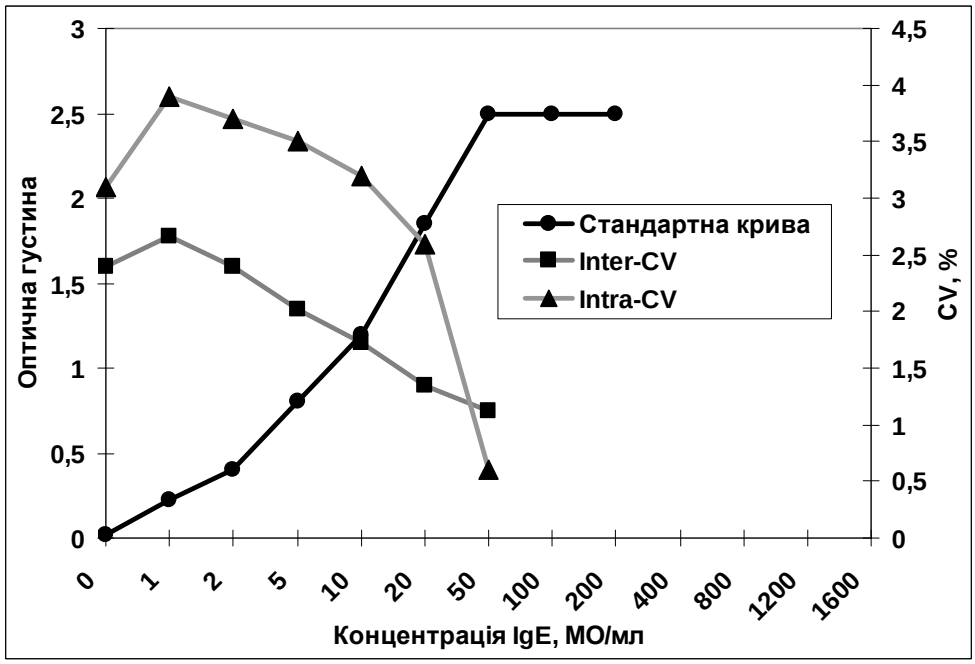
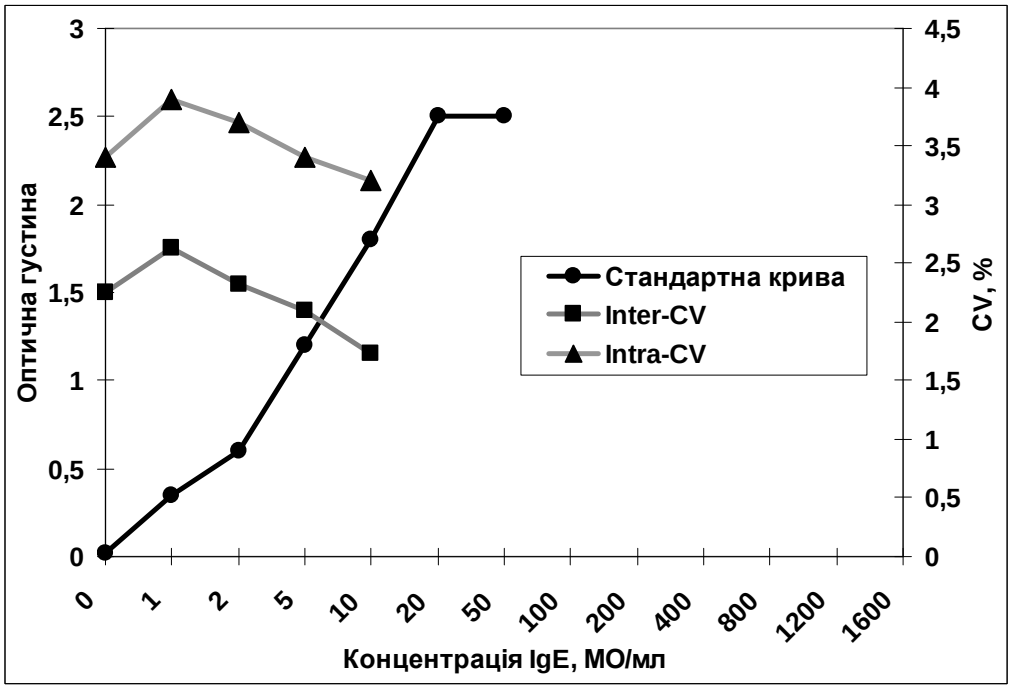


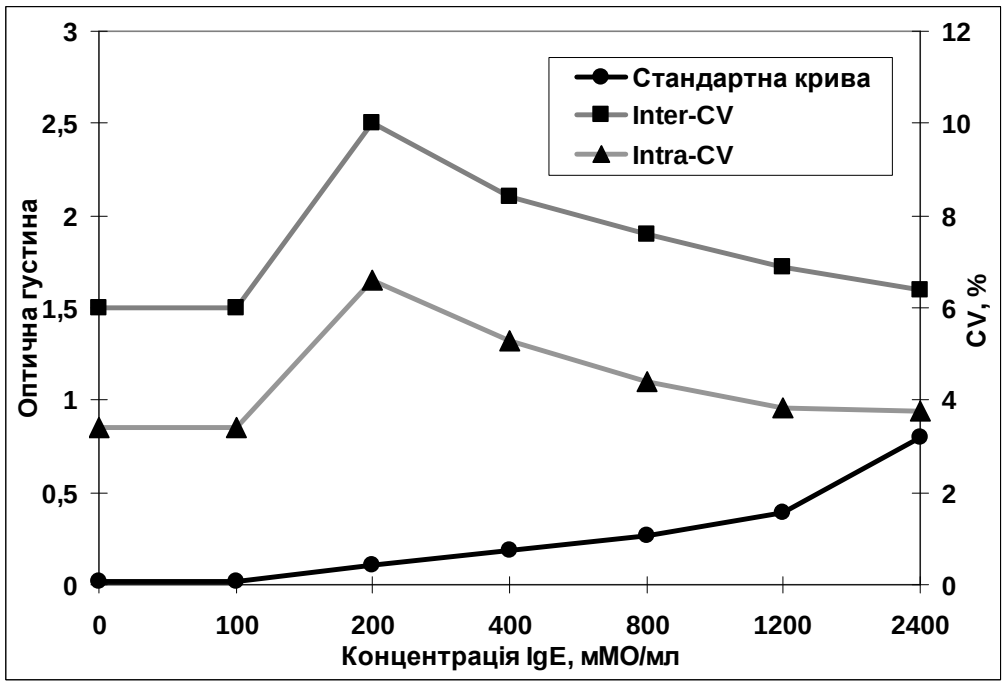
Рис. 5. Стандартна крива ІФА модифікації антитільний «сендвіч» з тирамін-біотиновим реагентом (1:1000) (–●–) й рівень варіабельності визначення стандартних концентрацій IgE в одній постановці (Intra-CV; –■–) та між постановками (Inter-CV; –▲–)

При оцінці ІФА модифікації антитільний «сендвіч» з ТБР у розведенні 1:500 стало очевидним, що на рівні концентрації IgE людини 1 МО/мл не досягається нижня межа динамічного діапазону аналізу (рис. 6 А), тому нами був проведений додатковий експеримент у діапазоні доз 100-2400 мМО/мл (рис. 6 Б).

Результати показали наступне: по-перше, у діапазоні доз 200÷2400 мМО/мл спостерігається стабілізація значень коефіцієнта варіації (середнє значення inter-CV становить 4,78%, а intra-CV – 1,96%); по-друге, нижня границя динамічного діапазону становить 200 мМО/мл.



А



Б

Рис. 6. Стандартна крива ІФА модифікації антитільний «сендвіч» з тирамін-біотиновим реагентом (1:500) (–●–) й рівень варіабельності визначення стандартних концентрацій IgE в одній постановці (Intra-CV; –■–) та між постановками (Inter-CV; –▲–): А) для діапазону 1-100 МО/мл); Б) для діапазону доз 100-2400 мМО/мл

За результатами даного етапу робіт можна сформувати наступні висновки. Використання модифікацій ІФА із АБП та ТБР суттєво розширюють

можливість застосування аналізу у дозах IgE людини нижчих за 50 МО/мл (у концентрації аналіту у діапазоні від 0,48 нг/мл до 120 нг/мл). Для цілей клінічної лабораторної діагностики (визначення загального IgE людини та специфічних IgE до алергенів різного походження) найбільш прийнятним є ІФА із АБП, разом із тим, у випадках, коли виникає потреба у визначенні надмалих концентрацій аналіту (сотні пікаграм), єдиним можливим варіантом залишається ІФА із ТБР. Дану модифікацію аналізу доцільно застосовувати й у тих випадках, коли особливо важливою є точність вимірювання, адже із використанням ТБР вдається суттєво підвищити прецизійність аналізу. При використаній концентрації біореагентів динамічний діапазон всіх модифікацій ІФА склав три порядки, що є цілком задовільним результатом.

ВИСНОВКИ

Використання модифікацій ІФА з АБУ і ТБР істотно розширюють можливості застосування аналізу в дозах IgE людини нижче 50 МО/мл (у концентрації аналіту в діапазоні від 0,48 нг/мл до 120 нг/мл). Для цілей клінічної діагностики (визначення загального IgE людини і специфічних IgE до алергенів різного походження) найбільш прийнятним є ІФА з АБУ, разом з тим, у випадках, коли виникає потреба у визначенні надмалих концентрацій аналіту (сотні пікаграмм), єдиним можливим варіантом залишається ІФА з ТБР. Дану модифікацію аналізу доцільно застосовувати і в тих випадках, коли особливо важлива точність вимірювання, адже з використанням ТБР вдається істотно підвищити прецизійність аналізу. За використаної концентрації біореагенту динамічний діапазон всіх модифікацій ІФА склав три порядки, що є цілком задовільним результатом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays / [Bobrow M. N., Harris T. D., Shaughnessy K. J., Litt G. J.] // J. Immunol. Meth. – 1989. – Vol. 125(1-2). – P. 279-285.

2. The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats / [Bobrow M. N., Litt G. J., Shaughnessy K. J. et al.] // J. Immunol. Meth. – 1992. – Vol. 150(1-2). – P. 145-149.

3. Van Gijlswijk R. Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization / Van Gijlswijk R., Zijlmans H., Wiegant J. // J. Histochem. Cytochem. – 1997. – Vol. 45(3). – P. 375.

4. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays / P. Tijssen // Lab. Techiques in Biochem. and Molecular Biology. – 1985. – 15. – 674 p.

5. Goding J. Monoclonal antibodies. Principles and practice / J. Goding. – San Diego: Academic press, 1996. – 492 p.

6. Простые иммунохимические методы определения пестицидов на основе биотин-стрептавидиновой системы / [Павлова И. С., Любавина И. А., Жердев А. В., Зинченко А. А.] // Биоорг. химия. – 1997. – Т. 23, № 10. – С. 832-383.

7. Galkin A.Yu. Elaboration of immunoenzymatic test-kit for total human IgE assay and investigation of its analytical properties / A. Yu. Galkin, A. M. Dugan // Int. J. Immunol. – 2013. – Vol. 1(1). – P. 1-6.

8. Розробка і порівняльна характеристика різних модифікацій імуноферментного аналізу для визначення специфічних IgE-антитіл / [Галкін О. Ю., Михальчук М. В., Казмірчук В. Є., Гурженко Ю. М.] // Вісник Київського національного університеті імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. – 2014. – №1(66). – С.15-21.

9. Отримання та вивчення властивостей нових моноклональних антитіл до IgE людини / [Галкін О. Ю., Савченко А. А., Нікітіна К. І., Дуган О. М.] // Укр. біохім. жур. – 2013. – Т. 85, № 8. – С. 81-87.

ПРИМЕНЕНИЕ АНАЛИТ-ОПОСРЕДОВАННОЙ ФЕРМЕНТ-АКТИВИРУЮЩИЙ СИСТЕМЫ АМПЛИФИКАЦИИ СИГНАЛА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БИОАНАЛИТОВ

А. Ю. ГАЛКИН[1], Ю. В. ГОРШУНОВ[2]

[1]Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт», Киев

[2]Научно-исследовательский и конструкторско-технологический институт городского хозяйства, Киев

В работе представлены результаты разработки и характеристики иммуноферментного анализа (ИФА) для определения общих IgE-антител с применением тирамин-биотинового реагента (ТБР). Было показано, что использование модификаций ИФА с авидин-биотиновым усилением сигнала (АБУ) и ТБР существенно расширяют возможности применения анализа в дозах IgE человека ниже 50 МЕ/мл. С целью диагностики наиболее приемлемым оказался ИФА с АБУ, вместе с тем, в случаях, когда возникает потребность в определении сверхмалых концентраций аналита (сотни пикаграмм), единственным возможным вариантом остается ИФА с ТБР. При использованной концентрации реагентов ИФА динамический диапазон для всех модификаций составил три порядка.

Ключевые слова: *иммуноферментный анализ, тирамин-биотиновый реагент, авидин-биотиновое усиление сигнала, IgE человека.*

APPLICATION OF ANALYTE-MEDIATED ENZYME-ACTIVATING SIGNAL AMPLIFICATION SYSTEM IN ELISA FOR DETERMINING LOW CONCENTRATIONS OF BIOANALYTES

A. YU. GALKIN[1], YU. V. GORSHUNOV[2]

[1]National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv,

[2]Research and Technology Institute of Urban Development, Kyiv

In this work were conducted development and characterization of enzyme immunoassay (ELISA) to determine total IgE-antibodies using tyramine-biotin reagent (TBR). It was shown that the use of ELISA modifications with avidin-biotin amplification (ABA) and TBR significantly extend application analysis dose human IgE below 50 IU/ml. For the purposes of clinical diagnosis was the most appropriate ELISA with ABA, however, when there is the need to define micro-concentrations of analyte (10^{-10} g), the only possible option is ELISA with TBR. When used ELISA reagent concentration dynamic range for all modifications made three orders.

Keywords: *ELISA, tyramine-biotin reagent, avidin-biotin amplification, IgE.*