



УДК 577.112.85+616-097

Оцінка методів біокон'югації для отримання синтетичних позитивних контролів для імуноферментного аналізу модифікації «IgM-пастка»

О.Ю. Галкін¹, Ю.В. Горшунов²

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

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

Запропоновано методологічний підхід до застосування синтетичних позитивних контролів в імуноферментних наборах, побудованих за принципом «IgM-пастки», який полягає у використанні кон'югату нормальних IgM людини та моноклональних антитіл до ферменту пероксидази хрому. Для виконання поставленого завдання можливо застосовувати NHS ефір-малеїмід-опосередковану кон'югацію, періодатний і глутаральдегідний методи біокон'югації. Кон'югати нормального IgM людини та моноклональних антитіл до пероксидази хрому, отримані за допомогою NHS ефір-малеїмід-опосередкованої кон'югації та періодатного методу, гомогенні за молекулярною масою, натомість кон'югат, який синтезується глутаральдегідним методом, містить щонайменше три групи біополімерів близької молекулярної маси. Синтетичні позитивні контролі, отримані різними методами, характеризуються вищим титром порівняно з високотитражною IgM-позитивною сироваткою. Разом із тим, позитивний контроль, отриманий за допомогою NHS ефір-малеїмід-опосередкованої кон'югації, характеризується найкращим профілем титрування (повільнішим спаданням активності під час імуноферментного аналізу при його розведенні).

Ключові слова: імуноферментний аналіз; IgM; позитивний контроль; кон'югація

Evaluation of bio-conjugation methods for obtaining of synthetic positive control for IgM-capture ELISA

O.Y. Galkin¹, Y.V. Gorshunov²

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

²Research and Technology Institute of Urban Development, Kyiv, Ukraine

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most informative and versatile method of serological diagnostics. The possibility of detecting by ELISA specific antibodies of different classes allow to differentiate primary infectious process and its remission, exacerbation and chronic disease (differential diagnosis). This approach is implemented in the methodology for evaluation of patients for the presence of humoral immune response to TORCH-infections pathogens (toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, herpes simplex viruses' infections, and some others). Therefore, testing for presence of specific IgG and IgM antibodies against TORCH-infections pathogens in blood serum is an important element of motherhood and childhood protection. The essential problem in the production of IgM-capture ELISA diagnostic kits is obtaining of positive control. The classic version of positive control is human blood serum (plasma) containing specific antibodies. But specific IgM-positive sera are insignificant raw materials. This fact can seriously restrict the production of diagnostic kits, especially in the event of large-scale production. We have suggested the methodological approach to using of synthetic positive controls in IgM-capture ELISA kits based on conjugate of normal human IgM and monoclonal antibodies against horseradish peroxidase. It is found that this task can be fulfilled by means of NHS ester-maleimide-mediated conjugation (by sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ, Україна
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine

Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, Київ, Україна
Research and Technology Institute of Urban Development, Kyiv, Ukraine
Tel.: +38-067-2348642. E-mail: alexfbt@mail.ua

carboxylate), reductive amination-mediated conjugation (by sodium periodate) and glutaraldehyde-mediated conjugation. It was found that conjugates of normal human IgM and monoclonal antibodies against horseradish peroxidase obtained using NHS ester-mediated maleimide conjugation and periodate method were similar by molecular weight, whereas conjugate synthesized by glutaraldehyde method comprised at least three types of biopolymers with close molecular weight. It was found that synthetic positive control obtained by different methods was characterized by higher titer compared to IgM-positive high-titer serum. However, positive control obtained by NHS ester-mediated maleimide conjugation had the best titration profile characteristics.

Keywords: ELISA; IgM; positive control; conjugation

Вступ

Лабораторна діагностика – невід’ємна частина клінічного обстеження пацієнта, адже без даних лабораторного обстеження неможливе не тільки встановлення клінічного діагнозу, а і контроль за ефективністю та безпекою терапевтичних заходів (Zupanec, 2005). Серед усього комплексу методів клінічної лабораторної діагностики важливе місце посідають серологічні методи, засновані на виявленні серологічних маркерів (антигенів, алергенів, антитіл) інфекційних (вірусних, бактеріальних, грибкових і паразитарних) та неінфекційних (у т. ч. аутоімунних, алергічних, ендокринних та онкологічних) захворювань. Найінформативнішим універсальним та, як наслідок, поширеним методом серологічних досліджень є імуноферментний аналіз (ІФА) (Galkin, 2014). Можливість виявлення за допомогою ІФА специфічних антитіл різних класів дозволяє диференціювати первинний інфекційний процес і його ремісію, загострення чи хронізацію захворювання, тобто проводити диференціальну діагностику. Такий підхід реалізується у методології обстеження пацієнтів на наявність гуморальної імунної відповіді на збудників TORCH-інфекцій (токсоплазмоз, краснуха, цитомегалія, інфекції, викликані вірусами простого герпесу, та деякі інші), які здатні внутрішньоутробно інфікувати плід та спричиняти формування вад розвитку (Senchuk and Dubossarskaja, 2004). Саме тому тестування на наявність специфічних антитіл класу IgG та IgM до збудників TORCH-інфекцій є важливим елементом у системі охорони матері та дитини.

За наявними літературними даними (Holmes et al., 2005; Vazquez et al., 2007; Hunsperger et al., 2009), переважна більшість імуноферментних наборів для виявлення специфічних антитіл класу IgM до певних збудників інфекційних хвороб у сироватці (плазмі) крові людини побудовані за принципом так званої «IgM-пастки» (IgM-capture ELISA). Дана модифікація ІФА дозволяє на першому етапі зафіксувати на твердій фазі загальний пул IgM-антитіл (концентрація яких у сироватці крові значно менша за вміст IgG), а на другому – виявити саме специфічні IgM. Суттєвою проблемою у виробництві подібного роду діагностичних наборів є отримання позитивного контролю (ПК). Класичним варіантом ПК є сироватка (плазма) крові людини з умістом специфічних антитіл певного класу. Разом із тим частота виявлення IgM-позитивних сироваток незначна. Вкрай дефіцитний відповідний біологічний матеріал як сировина для отримання ПК. Дана обставина може суттєво обмежувати виробництво діагностичних наборів, особливо за умов широкомасштабного виробництва. Ми запропонували методологічний підхід до використання синтетичних ПК в імуноферментних наборах, побудованих за принципом «IgM-пастки», який полягає у використанні кон’югату

нормальних імуноглобулінів класу IgM і моноклональних антитіл (МкАт) до ферменту пероксидази хрому (ПХ).

Мета роботи – порівняти різні методи біокон’югації для синтезу синтетичних позитивних контролів для імуноферментного аналізу модифікації «IgM-пастка», засновані на оцінці біохімічних та імунохімічних властивостей отримуваних біокон’югатів.

Матеріал і методи досліджень

NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон’югація. Синтез кон’югату проводили за допомогою базового методу (Hermanson, 2000) із власними модифікаціями. На першому етапі проводили активацію нормального IgM людини NHS ефір-малеїмідним зшивальним агентом – сульфо-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилату (сульфо-SMCC). Брали 2–3 мл розчину IgM (400–420 мг/мл) у 0,1 М фосфатному буфері з 0,15 М NaCl, pH 7,2 (ФБР). До розчину імуноглобулінів додавали 6 мг сульфо-SMCC, розмішували до повного розчинення та витримували упродовж 30 хв за кімнатної температури. Відділення сульфо-SMCC, що не прореагував, проводили на колонці 2,5 × 100 см із сефакрилом S-300, застосовуючи ФБР. Активовані імуноглобуліни елюювали з колонки, розводили до концентрації 20 мг/мл та відразу використовували для синтезу кон’югату.

Кон’югацію активованого IgM та МкАт із відновленими сульфгідрильними групами проводили таким чином. Брали розчин МкАт до ПХ із концентрацією 5 мг/мл у ФБР із 10 ммоль/л ЕДТА. До 3 мл розчину МкАт додавали 18 мг меркаптоетиламіну (МЕА), інкубували 90 хв за температури +37 °С. Для відділення редукованих антитіл від МЕА, що не вступив у реакцію, застосовували хроматографічну колонку 1,5 × 40 см із сефадексом G-25 (Pharmacia Biotech), використовуючи ФБР із 10 ммоль/л ЕДТА. Елюцію редукованих антитіл проводили зі швидкістю 2 мл/хв. Збирали фракції об’ємом 0,5 мл і вимірювали оптичну густину при 280 нм. Зібрані фракції редукованих МкАт негайно змішували з активованими IgM у молярному співвідношенні IgM : МкАт, рівному 1 : 4. Реакційну суміш витримували 2 години за кімнатної температури. Отриманий кон’югат піддавали очищенню за допомогою імуноафінної хроматографії на колонці із сефарозою 6-В, на якій іммобілізовані МкАт до ПХ.

Періодатний метод кон’югації. Кон’югацію МкАт до ПХ із нормальним IgM людини здійснювали у молярному співвідношенні МкАт до IgM 1 : 1 методом періодатного окислення (Tijssen, 1985) із власними модифікаціями. Для окислення IgM людини (15 мг/мл) брали 0,1 М бікарбонатний буфер, pH 8,3, додаючи такий же об’єм 14 мМ водного розчину періодату натрію. Суміш інкубували протягом 2 годин за кімнатної температури. Одержаний таким чином розчин активованого

IgM людини додавали до розчину МкАт, які попередньо діалізували проти 0,1 М карбонатного розчину, *pH* 9,2. Суміш переносили у хроматографічну колонку та додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25, інкубували протягом 3 годин за кімнатної температури. По закінченні інкубації розчин кон'югату елюювали з колонки та зупиняли реакцію додаванням 1/20 об'ємної частини водного розчину $NaBH_4$ (5 мг/мл), залишаючи на 30 хв за кімнатної температури. Після цього ще додавали 3/20 частини розчину боргідриду натрію, інкубували протягом 60 хв. Одержаний розчин кон'югату переводили у 0,02 М фосфатний буфер з 0,15 М $NaCl$ шляхом діалізу.

Кон'югація за допомогою глутарового альдегіду.

Синтез кон'югату проводили за допомогою базового двоетапного методу (Hermanson, 2000) із власними модифікаціями. Брали розчин IgM людини з концентрацією 10 мг/мл у ФБР, *pH* 6,8. До розчину імуноглобуліну додавали глутаровий альдегід до кінцевої концентрації 1% і витримували протягом ночі за кімнатної температури. Очищення активованого імуноглобуліну від надлишку глутарового альдегіду проводили за допомогою гель-фільтрації на колонці $2,5 \times 100$ см із сефакрилом S-300, використовуючи ФБР, *pH* 6,8. Для подальшої кон'югації брали розчин МкАт до ПХ у концентрації 10 мг/мл у 0,5 М карбонатному буферному розчині, *pH* 9,5. Змішували активовані IgM людини із МкАт у молярному співвідношенні 1 : 1 та витримували протягом ночі за температури +4 °С. Відновлення утворених основ Шиффа та імовірних слідів глутарового альдегіду проводили шляхом додавання $NaBH_4$ (10 мг/мл) та витримування протягом 1,5 години за температури +4 °С. Для відокремлення імовірних нерозчинних форм розчин отриманого кон'югату піддавали центрифугуванню при 10 000 об./хв та очищали на колонці $2,5 \times 100$ см із сефакрилом S-300, використовуючи ФБР, *pH* 7,4.

ІФА модифікації «IgM-пастка». Моноклональні антитіла, специфічні до IgM людини (Galkin and Dugan, 2009), сорбували в 0,02 М карбонат-бікарбонатному буфері в концентрації 2 мкг/мл на 96-лункові поліестеролові планшети для ІФА високої сорбційної ємності (Suzhou Conrem Biomedical Technology Co., Китай).

Планшет інкубували протягом 12 годин за +4 °С, потім тричі відмивали 0,02 М фосфатним буферним розчином із 0,15 М $NaCl$ та 0,2% твін-20 (ФБРТ), витримували у розчині бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (10 мг/мл в ФБР) 1 годину за температури +37 °С. Після чотириразового відмивання ФБРТ лунки планшета заповнювали 100 мкл розчину кон'югату нормального IgM та МкАт до ПХ у реакційному буферному розчині (0,05 М трис- HCl буфер, *pH* 8,0, 0,15 М $NaCl$, 5 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,2% твін-20). Планшети інкубували 30 хв за температури +37 °С та відмивали чотири рази ФБРТ. Після відмивання вносили розчин кон'югату рекомбінантних білків-антигенів цитомегаловірусу людини (ЦМВ) та пероксидази хрому (100 мкл/лунку), який інкубували 30 хв за температури +37 °С. Тричі відмивали ФБРТ і двічі дистильованою водою, після чого вносили по 100 мкл субстратно-хромогенної суміші (розчин 3,3',5,5'-тетраметилбензидину 0,25 мг/мл у 0,1 М натрій-цитратного буферу, *pH* 4,5, із додаванням 10 мкл 33% розчину перекису водню). Реакцію проявляли 20 хв у темноті та зупиняли, додаючи 50 мкл 2 М сірчаної кислоти. Оптичну густину вимірювали при 450 нм/620 нм.

Результати та їх обговорення

Грунтуючись на даних інших авторів (Harlow and Lane, 1988; Johnstone, 1997; Hermanson, 2000) та власному досвіді (Galkin, 2010), обрали три принципові методологічні підходи до синтезу кон'югатів формату «антитіло – антитіло», які піддавали оцінці для синтезу відповідного ПК (неспецифічні IgM + МкАт до ПХ): 1) NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон'югація на прикладі сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилату (SMCC) як зшивального агента; 2) глутаральдегідний метод; 3) періодатний метод. Використання вищезазначених методологічних прийомів можливе за таких передумов. NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон'югація можлива за участі двох біомолекул, одна з яких має вільні аміногрупи, а друга – вільні сульфгідрильні групи (рис. 1).

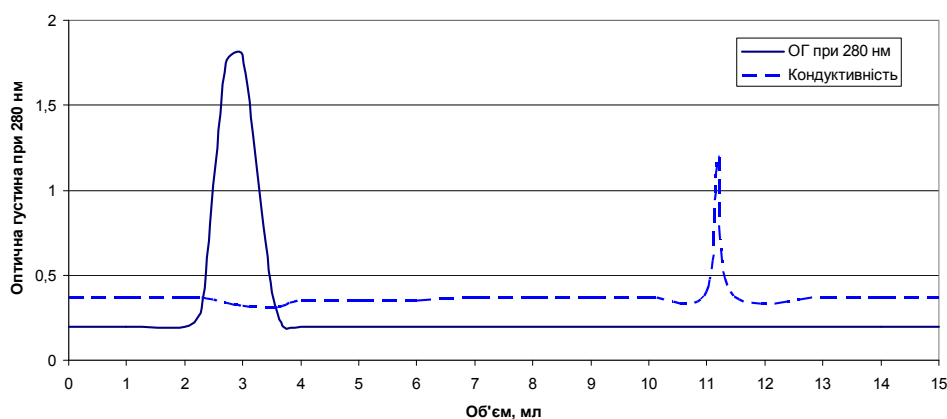


Рис. 1. Відділення редукованих МкАт до ПХ і залишків меркаптоетиламіну гель-фільтрацією на сефадексі G-25 (NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон'югація)

Очевидно, що й IgM людини, й мишачі моноклональні антитіла мають відповідні групи, які можуть бути задіяні у даній методиці. Глутаровий альдегід реагує із ε-

аміногрупами лізिनних залишків білкової молекули. Важливо зазначити, що одночасно перебігає декілька реакцій, результатом яких є утворення продукту, що

містить міцніші хімічні зв'язки, ніж у простих основах Шиффа (Hermanson, 2000). Потенційна можливість використання періодатного методу зумовлена тим, що молекула IgM людини містить до 12% вуглеводних залишків (Filiprovich, 1999). Це, у свою чергу, дозволяє проводити модифікацію молекули IgM з утворенням активних альдегідних груп, які згодом будуть реагувати з аміногрупами антитіл з утворенням основи Шиффа. Альдегідні групи у молекулі IgM утворюються під час окислювання періодатом натрію їх вуглеводних компонентів, аміногрупи якого попередньо або блоковані 1-фтор-2,4-динітробензолом, або протоновані (Hermanson, 2000). Таким чином, нам слід було на практиці оцінити прийнятність згаданих методик для синтезу біокон'югатів формату «антитіло – антитіло».

На рисунку 1 наведено результати відділення редукованих (одновалентних) МкАт до ПХ і залишків меркаптоетиламіну за допомогою гель-фільтрації на

сефадексі G-25 у процесі отримання кон'югату за допомогою NHS ефір-малеїмід-опосередкованого методу. Як видно із хроматограми, редуковані антитіла виходили з колонки у формі чіткого гомогенного за молекулярною масою піку. MEA, що не прореагував та який є меншим за своєю молекулярною масою, сходив із хроматографічної колонки дещо пізніше. Цікавими були результати очищення кон'югату, отриманого глутаральдегідним методом, гель-фільтрацією на сефакрилі S-300 (рис. 2). Отриманий кон'югат не був однорідним за молекулярною масою: у ньому виявлено щонайменше три групи кон'югованих молекул із близькими молекулярними масами. Аналогічні дослідження з кон'югатом, отриманим за допомогою періодатного методу, не проводилися, оскільки попередні дослідження вказували на отримання за даною методикою кон'югатів однорідного складу (Nikolaenko et al., 2005).

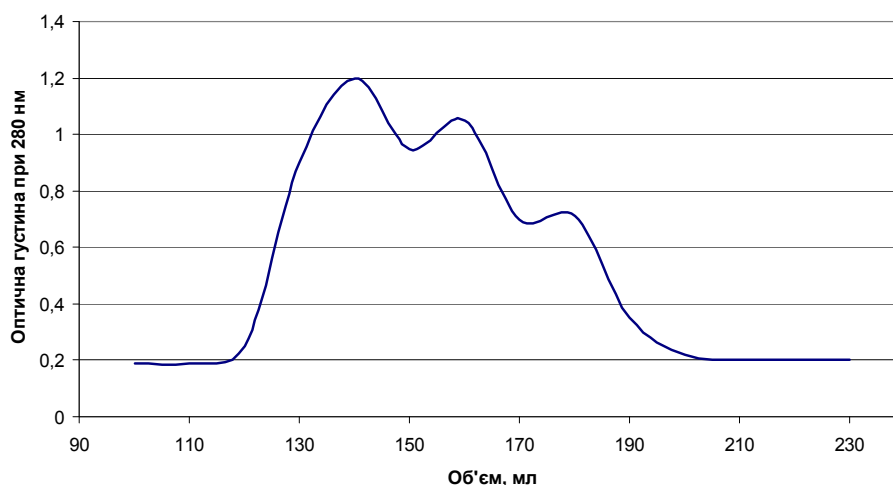


Рис. 2. Фінальне очищення кон'югату, отриманого глутаральдегідним методом, гель-фільтрацією на сефакрилі S-300

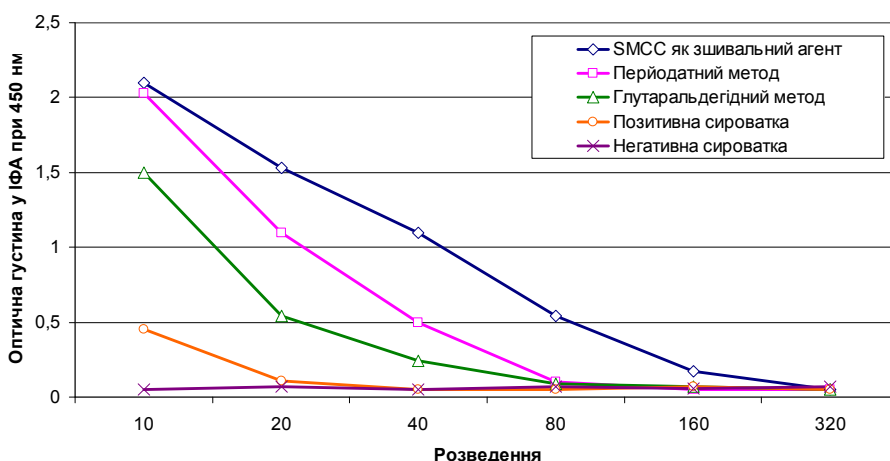


Рис. 3. Титрування синтетичних контролів, отриманих різними методами

Синтетичні ПК, отримані різними методами, оцінювали шляхом їх титрування в імуноферментному аналізі, призначеному для виявлення IgM-антитіл до цитомегаловірусу людини. Дане дослідження проводили порівняно з титруванням високотитражної сироватки з умістом IgM, специфічних до ЦМВ, а також негативної сироват-

ки (рис. 3). Найкращим результатом характеризувався ПК, отриманий унаслідок використання SMCC як зшивального агента (NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон'югація), спадання активності під час розведення ПК, отриманих іншими методами, відбувалося більш інтенсивно. Разом із тим, усі варіанти синтезованих ПК ха-

рактизувалися сприятливішим сигналом у ІФА, ніж високотитражна ІgM-позитивна сироватка.

Висновки

Теоретично обґрунтовано методологічні підходи до отримання синтетичних позитивних контролів для імуноферментного аналізу модифікації «ІgM-пастка»: NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон'югація на прикладі SMCC як зшивального агента, періодатний і глутаральдегідний методи біокон'югації. Кон'югати нормального ІgM людини та МкАт до ПХ, отримані за допомогою NHS ефір-малеїмід-опосередкованої кон'югації та періодатного методу, гомогенні за молекулярною масою; натомість кон'югат, що синтезується глутаральдегідним методом, містить щонайменше три групи біополімерів близької молекулярної маси. Синтетичні позитивні контролі, отримані різними методами, характеризуються вищим титром порівняно з високотитражною ІgM-позитивною сироваткою. Разом із тим, позитивний контроль, отриманий за допомогою SMCC, характеризується найкращим профілем титрування (повільнішим спаданням активності в ІФА під час його розведення).

Бібліографічні посилання

Filippovich, J.B., 1999. *Osnovy biohimii* [Fundamentals of Biochemistry]. Agar, Moscow (in Russian).

Galkin, O.Y., 2010. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases. *Ukr. J. Clin. Lab. Med.* 5(4), 54–60.

Galkin, O.Y., 2014. Parametry bioanalitichnoyi standartyzatsiyi zasobiv dlya serolohichnoyi diahnozyky [Parameters for bioanalytical standardization of medical devices for serological diagnostics]. *Materialy IV naukovo-praktychnoyi konferentsiyi "Suchasni dosyahnennya farmatsevtichnoyi tekhnolohiyi"* [Proc. 4th Sci. Conf. "Recent advances in pharmaceutical technology"]. Publishing House of the National University of Pharmacy, Kharkov (in Ukrainian).

Galkin, O.Y., Dugan, O.M., 2009. Porivnyannya skhem imunizatsiyi myshey liniyi Balb/c dlya oderzhannya monoklon-

al'nykh antytil do ІgM lyudyny [Comparison of immunization charts of Balb/c mice to produce monoclonal antibodies to human ІgM]. *Immunol. Allergol.* 1, 68–73 (in Ukrainian).

Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York.

Hermanson, G.T., 2000. *Bioconjugate techniques.* Academic Press, San Diego.

Holmes, D.A., Purdy, D.E., Chao, D.Y., Noga, A.J., Chang, G.J., 2005. Comparative analysis of immunoglobulin m (ІgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect ІgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. *J. Clin. Microbiol.* 43(7), 3227–3236.

Hunsperger, E.A., Yoksan, S., Buchy, P., Nguyen, V.C., Sekaran, S.D., Enria, D.A., Pelegrino, J.L., Vázquez, S., Art-sob, H., Drebot, M., Gubler, D.J., Halstead, S.B., Guzmán, M.G., Margolis, H.S., Nathanson, C.M., Rizzo, L.N.R., Bes-soff, K.E., Kliks, S., Peeling, R.W., 2009. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg. Infect. Dis.* 15(3), 436–440.

Johnstone, A., 1997. *Immunochemistry 2: A practical approach.* IRL Press, Oxford.

Nikolaenko, I.V., Galkin, A.J., Raevskaja, G.E., Donskaja, E.S., Kas'janenko, T.V., Tereshhenko, M.I., Spivak, N.J., 2005. Poluchenie monoklonal'nyh antitel k Fc-fragmentu ІgG cheloveka i primeneniye immunofermentnyh konjugatov na ih osnove [Preparation of monoclonal antibodies to Fc-fragments of human ІgG and usage of its conjugates in immunoassays]. *Klinicheskaja Laboratornaja Diagnostika* 11, 8–11 (in Russian).

Senchuk, A.J., Dubossarskaja, Z.M., 2004. *Perinatal'nye infekcii. Prakticheskoe posobie* [Perinatal infection. A practical guide]. MIA, Moscow (in Russian).

Tijssen, P., 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. *Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.* 15, 329–384.

Vazquez, S., Hafner, G., Ruiz, D., Calzada, N., Guzman, M.G., 2007. Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections. *J. Clin. Virol.* 39(3), 194–198.

Zupanec, I.A., Misjureva, S.V., Propisnova, V.V., 2005. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika: Metody issledovanija* [Clinical laboratory diagnostics: Research methods]. Publishing House of the National University of Pharmacy, Kharkov (in Russian).

Надійшла до редколегії 15.10.2014