

ВЛИЯНИЕ ПОЛИРЕАКТИВНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФФИННОСТИ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ

С. А. БОБРОВНИК, М. А. ДЕМЧЕНКО, С. В. КОМИСАРЕНКО

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: s-bobrov@bk.ru*

Наличие в сыворотках животных полиреактивных иммуноглобулинов может заметно повлиять на точность определения константы равновесия реакции взаимодействия специфичных антител и соответствующего антигена. Чтобы найти реальные величины аффинности антител в сыворотке, можно поступить двумя способами. Заблокировать полиреактивные иммуноглобулины высокой концентрацией твина 20 и высокой концентрацией какого-либо антигена, не взаимодействующего с исследуемыми антителами, а затем определить аффинность антител традиционным методом. Второй путь решения данной проблемы — применение для оценки аффинности сывороточных антител разработанного нами метода, который позволяет оценить аффинность взаимодействия высоко- и низкоаффинных антител, а также соотношение их концентраций в исследуемом образце.

Ключевые слова: лиганд-рецепторное взаимодействие, аффинность, реакция антиген-антитело, ELISA.

Одной из наиболее важных характеристик антител является аффинность их взаимодействия с соответствующим антигеном. В связи с этим методам определения аффинности антител посвящены многие работы [1–6]. Среди них особое место занимают методы, основанные на использовании твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), которые имеют ряд преимуществ по сравнению с иными подходами. Прежде всего, это связано с тем, что при использовании ELISA можно использовать незначительные концентрации антител и антигена. Немаловажным является и тот факт, что в случае использовании ELISA нет необходимости в тщательной очистке антител и антигенов, как это необходимо делать в иных случаях. В связи с вышеизложенным методы определения аффинности антител с помощью ELISA приобрели значительную популярность.

Одним из наиболее часто цитируемых и, следовательно, популярных методов является метод, предложенный Фриге с соавт., (1985) [4], который впоследствии был подвергнут коррекции Стивенсом (1987) [5]. Этот метод позволяет определить с высокой точностью аффинность моноклональных антител к соответствующему антигену. Однако ситуация становится намного сложнее, если необходимо определить аффинность не моноклональных, а сывороточных антител [2]. Дело в том, что

сывороточные антитела обычно представлены огромным разнообразием за счет синтеза антителообразующими клетками, принадлежащими к разным клонам. К тому же даже в одном клоне эти клетки «настраивают» свою специфичность за счет соматических мутаций и каждая антителообразующая клетка синтезирует антитела, которые имеют собственную аффинность к данному антигену. В результате этого сыворотка содержит низкоаффинные антитела и высокоаффинные антитела, а также антитела средней аффинности [2]. Определять с помощью упомянутых выше методов некую усредненную аффинность смеси подобных антител практически невозможно. В связи с этим нами были предложены методы, которые позволяют определять аффинность высоко- и низкоаффинных антител в смеси, а также соотношение их концентрации [7–10].

Вместе с тем, сывороточные иммуноглобулины обладают также способностью неспецифически взаимодействовать с разнообразными антигенами, т.е. они являются антителами, обладающими полиреактивными свойствами [11,12]. Под термином «неспецифически» мы понимаем способность антител связываться с неодинаковыми антигенами примерно с одинаковой аффинностью. Хотя аффинность неспецифического взаимодействия полиреактивных антител с антигеном невелика (порядка $1,0-10,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), тем не менее, можно

ожидать, что присутствие таких антител в сыворотке в значительной степени может влиять на получаемые характеристики антител, особенно в тех случаях, когда для оценки их аффинности использовать традиционный метод Фриге с сотр. [4], модифицированный в 1987 г. Стивенсом [5].

Недавно нами [9,10] был предложен метод определения аффинности двух типов антител, находящихся в смеси. Этот метод позволяет выявить присутствие примеси низкоаффинных антител в смеси с высокоаффинными антителами и определить аффинность обоих типов антител, а также соотношение их концентраций. Очевидно, что полиреактивные иммуноглобулины (ПРИГ) можно рассматривать, как примесь неспецифичных, низкоаффинных антител в иммунной антисыворотке. Следовательно, предложенный нами метод может быть использован и для оценки аффинности антител в присутствии ПРИГ. Рассмотрению данного вопроса посвящена настоящая статья.

Используя уравнение Клотца [13], Фриге и соавт. [4] предложили следующее уравнение, которое, по их мнению, позволяет определить аффинность антител с помощью метода ELISA [4]:

$$\frac{A_0}{A_0 - A_i} = 1 + \frac{K_d}{l_i}, \quad (1)$$

где K_d – константа диссоциации, равная по величине обратной величине константы аффинности K ; l_i – концентрация конкурирующего антигена в смеси с антителами; A_i – окраска лунок, полученная с помощью ELISA, которая пропорциональна концентрации свободных антител в их смеси с антигеном при достижении равновесия; A_0 – окраска лунок при $l_i = 0$.

Однако позднее Стивенс показал [5], что уравнение (1) пригодно только для оценки аффинности моновалентных антител (или иных моновалентных рецепторов). Чтобы привлечь во внимание двухвалентность антител, он предложил модифицировать уравнение (1) следующим образом:

$$\sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}} = 1 + \frac{K_d}{l_i}. \quad (2)$$

Действительно, позднее нами было показано, что, в отличие от уравнения (1), уравнение (2) математически правильно отражает взаимоотношения между концентрациями свободных антител в смеси с антигеном, кон-

центрацией антигена l_i и константой диссоциации K_d .

Существенным недостатком уравнения (2) является то, что при его применении приходится использовать обратные величины концентрации антигена, т.е. $1/l_i$. Это приводит к тому, что при высоких концентрациях конкурирующего антигена точки полученной зависимости располагаются очень близко друг к другу, из-за чего трудно сделать вывод, является ли полученная зависимость линейной или нет. Этим недостатком лишено предложенное нами уравнение [8,12], в котором рассматривается линейная зависимость между многочленом в левой части уравнения и концентрацией конкурирующего антигена, умноженной на константу аффинности:

$$\frac{A_0 - A_i}{A_i} + \sqrt{\left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 + \frac{A_0 - A_i}{A_i}} = Kl_i. \quad (3)$$

Если обозначить величину $\frac{A_0 - A_i}{A_i}$ как β , тогда вместо уравнения (3) получим упрощенный вид того же уравнения:

$$\beta + (\beta^2 + \beta)^{0.5} = Kl_i. \quad (3a)$$

Недавно нами было показано [14], что использование уравнения (3) позволяет к тому же выявить присутствие в исследуемых образцах антител примесь низкоаффинных антител, если таковые имеются. В связи с этим, при определении аффинности антител в исследуемом образце целесообразно вначале построить зависимость, описываемую уравнением (3). Если при этом будет получена выпуклая кривая, свидетельствующая о присутствии как минимум двух видов антител одинаковой специфичности, но различной аффинности, тогда для оценки аффинности обоих видов антител и соотношения их концентраций в исследуемом образце следует использовать метод нелинейной регрессии и следующее уравнение:

$$A_i = \frac{A_1(1 + 2l_iK_1)}{(1 + l_iK_1)^2} + \frac{A_2(1 + 2l_iK_2)}{(1 + l_iK_2)^2}, \quad (4)$$

где K_1 и K_2 – аффинность двух видов антител в исследуемом образце; A_1 и A_2 – окраска лунок, полученная с помощью ELISA, которая пропорциональна концентрациям свободных антител в смеси с антигеном при достижении состояния равновесия при $l_i = 0$.

В связи с тем, что низкоаффинные ПРИГ всегда имеются в сыворотках человека и жи-

вотных, представленная выше теория может быть использована не только для характеристики специфичных к определенному антигену сывороточных антител, но и полиреактивных иммуноглобулинов. Помимо этого, как показано в настоящей статье, есть возможность в значительной степени ослабить или полностью подавить активность ПРИГ с помощью высокой концентрации неродственного антигена, что позволяет значительно проще охарактеризовать аффинность специфичных антител в исследуемом образце.

Материалы и методы

В настоящей работе в качестве специфичных антител использовали коммерческие моноклональные антитела (мАт) к овалбумину фирмы Sigma (США), а в качестве источника ПРИГ использовали сыворотку неиммунных мышей. Моноклональные антитела смешивали с сывороткой в соотношении 1 : 100 для получения исследуемого образца, содержащего как специфичные антитела, так и неспецифичные ПРИГ. Такая смесь мАт и иммуноглобулинов сыворотки позволяет одновременно определять как активность мАт, так и активность ПРИГ. Это также дает возможность изучать в эксперименте их взаимное влияние на точность определения параметров их связывания с антигенами.

В качестве специфичного антигена в работе использовали альбумин куриных яиц (овальбумин), а в качестве неспецифичного антигена — бычий сывороточный альбумин (БСА). В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена антитела козьей антисыворотки, специфичной к мышечным иммуноглобулинам класса IgG. Все упомянутые реагенты являлись продуктом фирмы Sigma (США).

Овальбумин иммобилизовали на плоскостонных 96-ячеечных иммунологических платах, инкубируя его раствор (20–30 мкг/мл) в платах в 1%-ом NH_4HCO_3 + 0,01%-ом NaN_3 при 4 °С в течение 18–20 час. Непосредственно перед использованием плат раствор овалбумина удаляли, а платы с сорбированным антигеном трижды отмывали забуференным (рН 7,2) физиологическим раствором NaCl с 0,1% твина 20 и 0,01% NaN_3 (ТБФ).

1 мкл исходного пула коммерческих мАт фирмы Sigma смешивали с 100 мкл сыворотки неиммунных мышей и полученную смесь использовали для определения аффинности связывания мАт или ПРИГ с овалбумином. Для этого полученную смесь мАт и сыворотки

мыши разводили 1 : 125 в ТБФ с 1% БСА и к 0,2 мл полученного раствора добавляли 0,2 мл овалбумина различной концентрации, предварительно разведенного в ТБФ с 5% БСА. Таким образом, разведение мАт в смеси с разными концентрациями овалбумина было равно 1 : 25000. Максимальная концентрация овалбумина в полученных образцах смеси антигена с моноклональными антителами и сывороткой мыши была равна $1,0 \times 10^{-6}$ М. В остальных образцах концентрация овалбумина снижалась в 2, 4, 8 и т.д. раз. Контрольный образец не содержал овалбумина.

Чтобы определить разведение сыворотки, подходящее для проведения экспериментов по определению аффинности антител, смесь сыворотки с добавленными мАт разводили в 250 раз в ТБФ с 5% БСА. Затем последовательно делали двукратные разведения этого раствора в ТБФ с 5% БСА, вносили полученные образцы в лунки плат с иммобилизованным овалбумином и методом ELISA определяли зависимость количества связавшихся антител от степени разведения. Для последующих экспериментов брали такое разведение, при котором дальнейшее двукратное разведение приводило к уменьшению окраски лунок в два раза по сравнению с такими, получаемыми методом ELISA. Иными словами — к двукратному уменьшению количества связавшихся с платой антител.

Полученные таким образом образцы смеси мАт и неиммунной сыворотки инкубировали вместе с различными концентрациями антигена в течение ночи при комнатной температуре для достижения равновесия в реакции антиген–антитело. На следующий день по 100 мкл упомянутых образцов вносили в лунки плат с сорбированным овалбумином и инкубировали 1 ч при непрерывном перемешивании, чтобы определить в образцах ту часть антител, которые остались незаблокированными антигеном и, следовательно, были способны связываться с иммобилизованным антигеном. На каждый образец смеси антиген–антитело использовали по четыре лунки плат.

Затем плашку тщательно промывали, обрабатывали козьими антителами против IgG мыши, мечеными пероксидазой хрена в течение одного часа при 4 °С. После промывки плашек ТБФ в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата пероксидазы. В качестве субстрата для пероксидазы использовали смесь ортофенилендиамина и пероксида водорода. После развития окраски иммуноферментную реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 2 М серной кислоты в лунку, образцы спектрофо-

тометрировали и для каждого образца вычисляли среднее значение яркости окраски лунок, которая была пропорциональна концентрации «свободных» антител в исследуемых образцах смеси антител с антигеном после достижения равновесия реакции антиген–антитело.

Результаты и обсуждение

Поскольку ПРИГ сывороток животных и людей могут неспецифически взаимодействовать с разнообразными антигенами, то существует возможность снизить или полностью подавить их активность при помощи различных реагентов, в частности неспецифических антигенов. Ранее нами уже было показано, что активность ПРИГ может быть значительно снижена при снижении температуры до нуля градусов и повышении концентрации твина 20 до 0,1% [15]. Так, в отличие от мАт к овальбумину, которые связываются с сорбированным антигеном практически независимо от концентрации твина 20 (рис. 1), связывание ПРИГ с тем же антигеном существенно снижается при наличии в растворе незначительной концентрации (до 0,01%) твина 20. Дальнейшее, но незначительное снижение активности ПРИГ наблюдается при увеличении концентрации твина 20 вплоть до 0,05–0,25%.

Таким образом, снижая температуру инкубации и одновременно повышая концентрацию твина 20 до 0,1% можно существенно снизить активность ПРИГ. С другой стороны, снизить активность ПРИГ можно и иным путем, а именно, увеличивая в растворе ПРИГ концентрацию любого антигена [11, 12], поскольку реакция ПРИГ–антиген неспецифична. Следовательно, отыскав оптимальную концентрацию неспецифического антигена для подавления активности ПРИГ и проводя реакцию при данной концентрации антигена и при пониженной температуре, а также в присутствии 0,1% твина 20, можно полагать, что ПРИГ будут практически полностью заблокированы в отличие от специфических антител.

Чтобы определить, какая концентрация неспецифического антигена необходима для максимального подавления активности ПРИГ в сыворотке, смесь сыворотки мышей с мАт инкубировали с разными концентрациями БСА в течение суток при комнатной температуре, а затем методом ELISA определяли какое количество иммуноглобулинов мыши способно связываться с иммобилизованным на платах овальбумином.

На рис. 2 представлена зависимость между концентрацией БСА в смеси с сывороткой

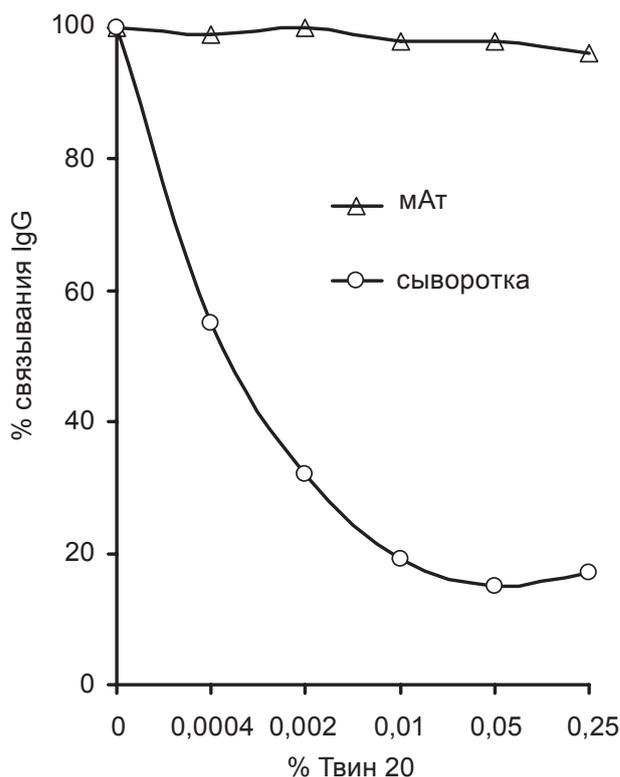


Рис. 1. Влияние твина 20 на связывание мАт или сывороточных иммуноглобулинов с сорбированным на платах антигеном. Данные представлены как процент связывания мАт или ПРИГ сыворотки от максимальных значений, полученных в отсутствие твина 20

мыши и количеством связавшихся иммуноглобулинов с иммобилизованным на платах овальбумином, из которого видно, что количество ПРИГ, способных связываться с сорбированным на платах овальбумином, начинает резко снижаться при достаточно низких концентрациях неродственного антигена в растворе (около 0,01% БСА) и почти достигает минимума при увеличении концентрации БСА до 1%. Дальнейшее увеличение концентрации БСА в растворе, вплоть до 5–10%, незначительно влияет на количество иммуноглобулинов, способных связываться с сорбированным овальбумином, хотя чуть заметное усиление подавления активности ПРИГ все же происходит. В связи с этим, дальнейшие наши эксперименты по определению аффинности антител и ПРИГ проводились в растворе 0,2% твина 20, а также в отсутствие БСА, или же в присутствии 5% БСА.

Теперь, используя высокую концентрацию БСА (а именно 5% БСА), способную почти полностью блокировать ПРИГ, или же в отсутствие БСА, можно провести изучение

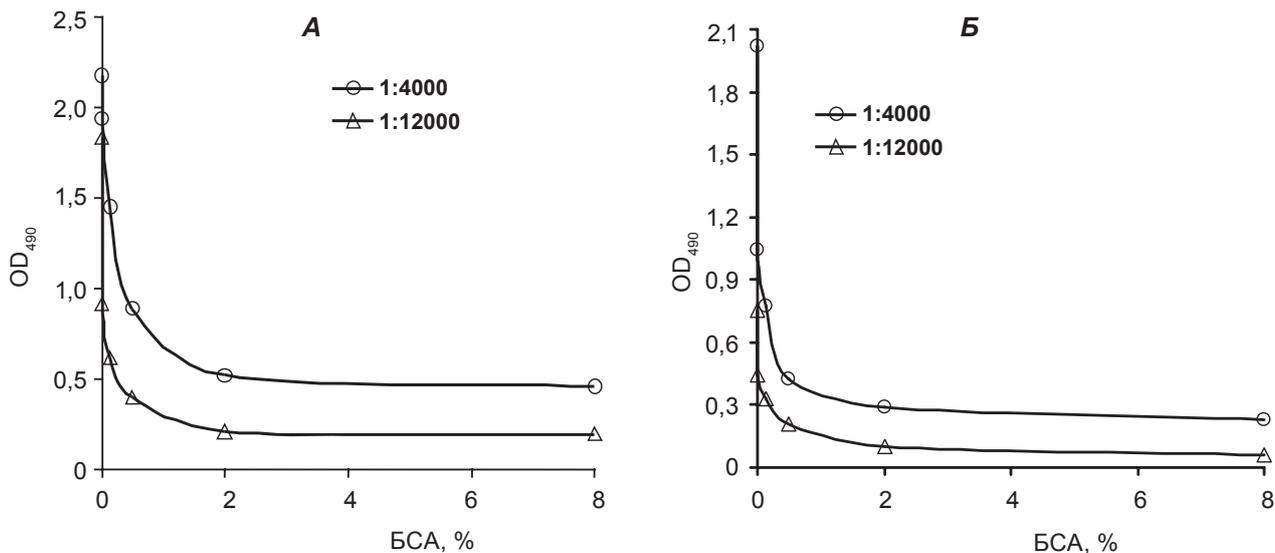


Рис. 2. Зависимость связывания сывороточных IgG неимунной мыши с сорбированным овальбумином от концентрации неродственного антигена БСА, способного частично блокировать ПРИГ. В опыте использовали два различных образца сыворотки (А и Б), при разведениях 1 : 4 000 или 1 : 12 000

влияния овальбумина на блокирование специфических антител, изучая зависимость способности смеси мАт и сыворотки взаимодействовать с иммобилизованным овальбумином. На рис. 3 представлена такая зависимость количества незаблокированных антител в исследуемых образцах от концентрации овальбумина для случаев, когда в исследуемом растворе антител БСА или полностью отсутствует, или же его концентрация равна 5%. Установленная зависимость количества свободных антител от концентрации конкурирующего антигена позволяет определить аффинность антител к данному антигену или традиционным методом Фриге в модификации Стивенса, или же методом, предложенным нами ранее [14].

Используя традиционный подход определения аффинности антител (метод Фриге), результаты, представленные на рис. 3, с помощью уравнения (2), необходимо линеаризовать, а затем определить тангенсы углов наклона полученных линейных зависимостей (рис. 4, А), которые численно равны обратной величине аффинности антител, выраженных в молях. Поскольку тангенсы углов наклона полученных линейных зависимостей были равны $7,08 \times 10^{-9}$ М (для образца в отсутствии БСА) и $6,66 \times 10^{-9}$ М (для образца с добавлением 5% БСА), тогда найденные таким способом аффинности антител в исследуемых образцах были равны $1,41 \times 10^8$ М⁻¹ и $1,50 \times 10^8$ М⁻¹ соответственно. Обращает на себя внимание тот факт, что обе полученные зависимости на рис. 4, А

являются чрезвычайно близкими к линейным зависимостям и, следовательно, традиционный метод определения аффинности антител не позволяет обнаружить наличие в этих образцах примеси низкоаффинных антител.

И наоборот, если результаты, представленные на рис. 3, попытаться линеаризовать в соответствии с предложенными нами уравнением (3) или (3а), а именно, как зависимость значений $\beta + (\beta^2 + \beta)^{0.5}$ от концентрации антигена I_i , тогда получаются не прямые линии, а две кривые (рис. 4, Б), которые свидетельствуют о наличии в исследуемых образцах не только высокоаффинных, но и примеси низкоаффинных антител.

В подобных случаях, чтобы определить аффинность обоих видов антител в исследуемых образцах, можно использовать предложенный нами ранее подход, основанный на подгонке с помощью метода нелинейной регрессии полученных экспериментальных кривых, представленных на рис. 3, к теоретической кривой, описываемой уравнением (4). Использование этого метода, выполненного с помощью компьютерной программы Origin 75, позволило определить не только аффинность обоих видов антител, но также их соотношение концентраций, которое равно отношению значений A_1/A_2 . Полученные результаты представлены в таблице, из которых видно, что использование предложенного нами метода позволило найти значения констант аффинности для высокоаффинных и низкоаффинных антител, а так-

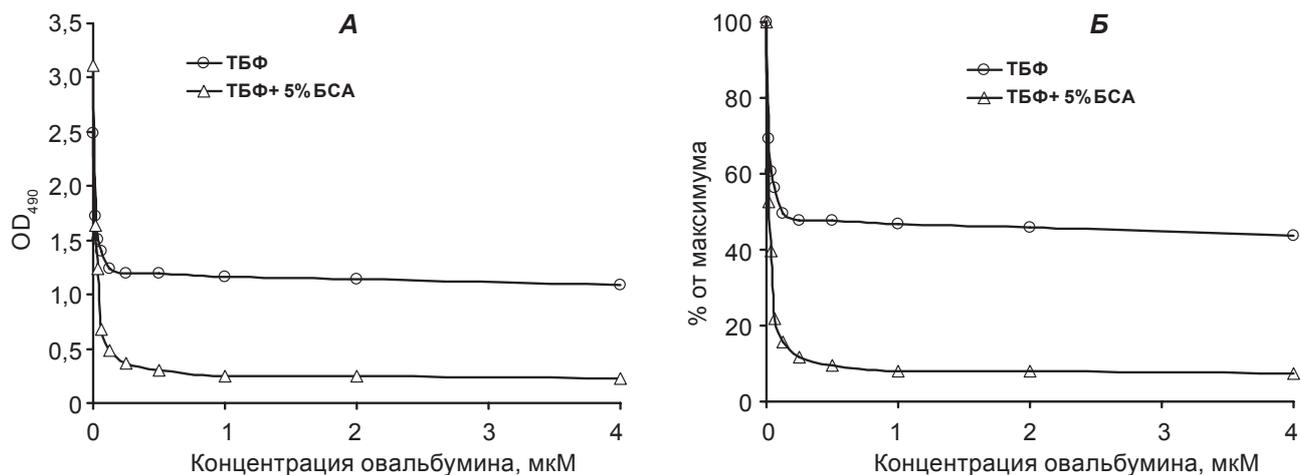


Рис. 3. Зависимость количества IgG, связавшихся с сорбированным на платах овальбумином, от концентрации овальбумина в смеси МАт, сыворотки мыши и овальбумина.

А — экспериментальные значения A_t , которые являются пропорциональными концентрации свободных IgG в присутствии конкурирующего антигена; Б — те же значения A_t , что и на графике А, но представлены, как проценты от максимальных величин, полученных в отсутствие конкурирующего овальбумина

же соотношение между концентрациями этих антител A_1/A_2 у образца, который находился в ТБФ и не содержал БСА. Константа аффинности для высокоаффинных антител была равна $(1,98 \pm 0,14) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, а для низкоаффинных антител — $(9,65 \pm 0,22) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Таким образом, аффинность низкоаффинных антител является типичной для полиреактивных иммуноглобулинов, а высокоаффинные антитела

представлены имеющимися в образцах моноклональными антителами. Соотношение между концентрациями антител является близким к единице, т.е. $A_{01}/A_{02} = 1,15$.

Совсем иные результаты были получены для образца тех же антител, но находящихся в растворе с 5% БСА. Благодаря блокированию полиреактивных иммуноглобулинов высокой концентрацией БСА, эти иммуноглобулины

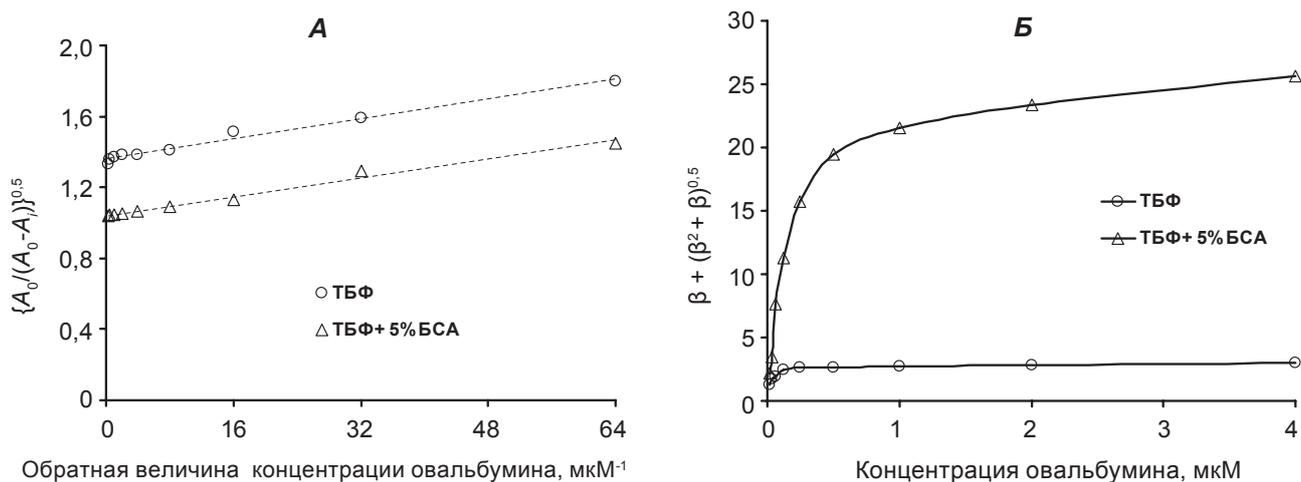


Рис. 4. А — линейные зависимости между величинами $\sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}}$ и обратной концентрацией овальбумина в смеси с образцами антител в присутствии 5% БСА или в его отсутствие. Б — нелинейные зависимости между величинами $\beta + (\beta^2 + \beta)^{0,5}$ и концентрацией конкурирующего овальбумина в присутствии 5% БСА или в его отсутствие

Константи аффіності антител і значення A_{01} і A_{02} , знайдені запропонованим нами методом для образців моноклональних антител і сыворотки миши, знаходячихся в розстворі ТБФ, або для тих же образців, але в розстворі ТБФ з 5% БСА

Искомый параметр антител	Антитела в ТБФ	Антитела в ТБФ + 5% БСА
K_1	$(1,98 \pm 0,14) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$(1,52 \pm 0,10) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
A_{01}	$1,33 \pm 0,03$	$2,90 \pm 0,06$
K_2	$(9,65 \pm 0,22) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$0,21 \text{ M}^{-1}$
A_{02}	$1,16 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,03$
A_{01}/A_{02}	1,15	13,18

практически не определялись в данном образце. Концентрация определяемых низкоаффинных антител (т.е. полиреактивных иммуноглобулинов) значительно снизилась по сравнению с образцом антител в ТБФ, вследствие чего соотношение A_{01}/A_{02} резко возросло. К тому же найденная аффиность полиреактивных иммуноглобулинов в образцах с 5% БСА была близка к нулю. Очевидно, что при данных условиях исследования (т.е. в присутствии 5% БСА и 0,1% твина 20) наличием полиреактивных иммуноглобулинов можно пренебречь. Что же касается константы равновесия для высокоаффинных антител, то найденные нами величины аффиности были близки в обоих случаях, т.е. как для образца антител в растворе с 5% БСА, так и в отсутствие БСА.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при определении аффиности сывороточных антител заметное влияние на получаемые результаты могут оказать полиреактивные иммуноглобулины. Они являются низкоаффинными, и их наличие приведет к снижению усредненной аффиности пула антител, если аффиность последних определять традиционными методами. Напротив, в случае использования предложенного нами метода определения аффиности антител (Бобровник и др., 2009, [14]), появляется возможность не только определить константы аффиности для высокоаффинных антител, но и найти этот показатель для низкоаффинных антител. Помимо этого, наш метод, описанный ранее [9, 10, 13], позволяет определить соотношение между концентрациями высокоаффинных и низкоаффинных антител в исследуемом образце.

Иной путь определения аффиности сывороточных антител – это путь блокирования полиреактивных антител с помощью высокой концентрации какого-либо неродственного антигена, не взаимодействующего со специфич-

ными антителами. Нами показано, что при температуре, близкой к 0 °С, в случае использования 5% БСА в растворе ТБФ с добавлением 0,1% твина 20 полиреактивные иммуноглобулины являются практически заблокированными антигеном и их влиянием на определение аффиности специфичных антител можно пренебречь. В этом случае для определения аффиности антител могут быть использованы и традиционные методы [4, 5].

Очевидно, что в том случае, когда в сыворотке имеется высокоаффинные и низкоаффинные специфичные антитела, то для определения их характеристик необходимо использовать предложенный нами метод (Бобровник и др., 2009). Однако при этом исследовании необходимо проводить в условиях, когда активность полиреактивных иммуноглобулинов максимально подавлена высокими концентрациями твина 20 и каким-либо неспецифичным антигеном, не взаимодействующим со специфичными антителами. Использование данного подхода позволяет решить проблему оценки аффиности смеси антител, находящихся в гипериммунной сыворотке [2].

ВПЛИВ ПОЛІРЕАКТИВНИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ СИРОВАТКИ КРОВІ НА ВИЗНАЧЕННЯ АФІННОСТІ СИРОВАТКОВИХ АНТИТІЛ

С. А. Бобровник, М. О. Демченко,
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

Присутність у сироватці крові тварин поліреактивних імуноглобулінів може значно вплинути на точність визначення афінності антитіл даної сироватки до відповідного антигену. Щоб знайти точні значення афінності

антитіл у сироватці можна використати один із наступних підходів. Можна заблокувати поліреактивні імуноглобуліни за допомогою високих концентрацій твіну 20 і неспецифічного антигену, який не взаємодіє з досліджуваними антитілами. У цьому разі можна визначити афінність антитіл одним із традиційних методів. Другий спосіб розв'язання цієї проблеми – використання методу, який був запропонований нами раніше і який дозволяє визначити афінність двох типів антитіл у суміші і співвідношення їхніх концентрацій у досліджуваному зразку.

Ключові слова: ліганд-рецепторна взаємодія, афінність, реакція антиген-антитіло, ELISA.

**THE EFFECT OF SERUM
POLYREACTIVE IMMUNOGLOBULINS
ON ANTIBODY AFFINITY
DETERMINATION**

*S. A. Bobrovnik, M. O. Demchenko,
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

S u m m a r y

The presence of polyreactive immunoglobulins in sera may substantially influence on the accuracy of antibody affinity determination. In order to obtain precise values of antibody affinity one should apply one of two following ways. First, one should block polyreactive immunoglobulins with high concentration of Twin 20 and high concentration of any antigen which does not interact with studying antibody. After this antibody affinity may be determined by traditional methods. Another way is the application of the method suggested by us earlier, which allow determining affinity of two

antibodies in a mixture and the relation of their concentrations.

Key words: ligand-receptor interaction, affinity, antigen-antibody reaction, accuracy; ELISA.

1. *Ruoslahti E.* // *Scand. J. Immunol.* – 1976. – Suppl. 3. – P. 3–7.
2. *Stanley C., Lew A. M., Steward M. W.* // *J. Immunol. Meth.* – 1983. – **64**. – 119–132.
3. *Schots A., Van der Leede B. J., De Jongh E., Egberts E.* // *J. Immunol. Meth.* – 1988. – **109**. – P. 225–233.
4. *Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E.* // *Ibit.* – 1985. – **77**. – P. 305–319.
5. *Stevens F. J.* // *Molec. Immunol.* – 1987. – **24**. – P. 1055–1060.
6. *Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E.* // *J. Immunol. Meth.* – 1995. – **82**. – P. 145–150.
7. *Bobrovnik S. A.* // *Укр. біохім. журн.* – 2000. – **72**, № 3. – С. 133–141.
8. *Bobrovnik S. A.* // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2003. – **57**. – P. 213–236.
9. *Бобровник С. А.* // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 3. – С. 155–161.
10. *Stevens F. J., Bobrovnik S. A.* // *J. Immunol. Methods.* – 2007. – **328**. – P. 53–58.
11. *Бобровник С. А.* // *Укр. біохім. журн.* – 1990. – **62**, № 5. – С. 86–89.
12. *Bobrovnik S. A.* // *Comments Molec. & Cellular Biophys.* – 1999. – **9**. – P. 323–356.
13. *Klotz I. M.* // *Arch. Biochem.* – 1946. – **9**. – P. 109–116.
14. *Бобровник С. А., Демченко М. А., Комисаренко С. А.* // *Укр. біохім. журн.* – 2009. – **81**, № 3. – С. 66–76.
15. *Бобровник С. А.* // *Там само.* – 2004. – **76**, № 5. – С. 132–139.

Получено 14.10.2009