

БІОХІМІЯ

УДК 57.083.3 + 616-71 + 543.9

¹О. Ю. ГАЛКІН, ²Ю. В. ГОРШУНОВ, ¹О. М. ДУГАН

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»
пр-т. Перемоги, 37, Київ, 03056

²Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства
вул. Урицького, 35, Київ, 03035

РОЗРОБКА ІМУНОАФІННОГО МЕТОДУ ВИДІЛЕННЯ IgE ЛЮДИНИ ІЗ БІОЛОГІЧНИХ РІДИН

У статті представлено результати порівняльних досліджень різних варіантів імуноафінних сорбентів для виділення та очистки IgE людини, а саме: сефарози 6В та золь-гель матеріалів на основі тетраетоксисилану (ТЕОС) та тетраетилсилікату. Експериментально було встановлено оптимальні умови синтезу хроматографічного сорбенту на основі ТЕОС, які забезпечують прийнятні характеристики іммобілізації біологічної речовини, а саме: утворення матриці-сорбента при обробці ТЕОС ультразвуком упродовж 40 хв при температурі 40 °С. Сорбент на основі ТЕОС не поступається за кінетичними характеристиками ефективності іммобілізації моноклональних антитіл сефарозою 6В. Було показано, що більш ефективним є варіант імуноафінної хроматографії із використанням анти-IgE моноклональних антитіл 164Н10 та елюату – розчину 8М сечовини або 4М хлориду магнію. Імунохроматографічні колонки, синтезовані на сефарозі 6В та ТЕОС, характеризуються високими значеннями ступеню вилучення (не менше 95 %) у широкому діапазоні концентрацій IgE людини ($10^{-2} \dots 10^2$ мкг/мл), проте колонка на основі сефарози 6В є менш стабільною при багаторазовому використанні (більше 22 циклів).

Ключові слова: імуноафінна хроматографія, сефароза, алкілсилани, IgE людини

Для виділення та очистки імуноглобулінів звертаються до широкого арсеналу методів молекулярної імунології та біохімії. При цьому всі підходи базуються на застосуванні фізико-хімічних та біологічних властивостей даної групи молекул. Найчастіше використовують наступні відмінності антитіл різних класів від інших молекул, що присутні у сироватці, а саме: молекулярну масу, спорідненість до низки протеїнів (білки А та G), ізоелектричну точку, розчинність за різних умов [1, 23, 24]. На використанні зазначених відмінностей біомолекул базуються методи гель-фільтрації, афінної та іонообмінної хроматографії, діалізу, осадження солями та органічними розчинниками. Більшість підходів, що трапляються у літературі [1, 2, 23, 24], передбачає поєднання декількох методів. Проте багатьом із запропонованих методик бракує чіткості протоколів експерименту, а також адекватних способів контролю чистоти імуноглобулінів. Методи виділення та очистки IgG людини як правило базуються на використанні афінної хроматографії на протеїнах А та G, вони чітко та повно описані у науковій літературі, дають добре відтворювані результати та, на нашу думку, не потребують оптимізації. У той же час, існують різні підходи до очистки та виділенні імуноглобулінів людини інших класів (IgE, IgA, IgM): описані різними авторами схеми є багатоетапними, не завжди забезпечують добре відтворюваних результатів, призводять до відчутних втрат

імуноглобулінів, їм бракує чітких методів контролю процесу очистки та кінцевого продукту [1, 2, 17, 19, 23, 24].

Метою роботи було порівняльна характеристика різних імуноафінних сорбентів для виділення IgE людини та розробка відповідної хроматографічної методики.

Матеріал і методи досліджень

Отримання імуноафінного сорбенту на основі сефарози проводили за базовою методикою [9]. 25 мл суспензії сефарози 6В («Sigma», США) промивали водою на скляному фільтрі і переносили в плоскодонну колбу на 100 мл. До сефарози додавали 25 мл 0,5 М карбонатного буферу (рН 11) і 6,25 мл дивінілсульфону («Sigma», США) і струшували на шейкері протягом 80 хв. Активованій носій фільтрували на скляному фільтрі, промивали водою і ресуспендували у 15 мл розчину очищених моноклональних антитіл (МАТ) з концентрацією 5,3 мг/мл в 0,1 М карбонатному буфері (рН 9,2). Суспензію струшували при кімнатній температурі протягом 12 год.

Контроль процесу синтезу імуноафінного сорбенту (ІАС) проводили шляхом вивчення кінетики іммобілізації МАТ на сефарозі. Для цього протягом перших чотирьох годин через кожні 30 хв і через 6 й 12 год після початку іммобілізації з реакційної суміші відбирали по 50 мкл надосадової рідини. Як контрольні зразки використали інтактні МАТ, інкубовані у карбонатному буфері при кімнатній температурі. Після відбору всі проби охолоджували й аналізували методом імуноферментного аналізу (ІФА). Для цього IgE людини сорбували на планшетах для ІФА, вихідні антитіла й відібрані проби розводили і титрували. Після інкубації й промивання вносили антивидовий кон'югат і хромоген, результати враховували спектрофотометрично. За результатами ІФА будували криві залежності значень оптичної густини зразків з реакційної суміші від часу інкубації.

Після завершення синтезу для інактивації груп, що не прореагували, носій відфільтровували, промивали водою й суспендували у 25 мл 0,1 М карбонатного буфера, що містить 1,5 мл етаноламіну, а потім струшували на шейкері протягом 2 год. Сефарозу відфільтровували на скляному фільтрі, промивали водою й суспендували у фосфатному буфері. Приготовлений ІАС зберігали до використання при температурі 4 °С.

Отримання імуноафінного сорбенту на основі кремнійорганічних сполук проводили за базовою методикою [14, 15]. Для отримання золь-гелю сорбенту змішували 0,23 мл алкілсилану, 0,23 мл 0,0025 М соляної кислоти (каталізатор), 0,04 мл 10%-го поліетиленгліколю (ПЕГ-400) при мольному співвідношенні $H_2O:Si = 8:1$. Отриману суміш струшували протягом 1 хв для отримання прозорої однорідної маси. Потім приготований розчин витримували на ультразвукової ванні 30 хв при температурі 20-25 °С. Синтезований прегідролізат використовували як матрицю для введення антитіл на наступному етапі отримання ІАС. Антитіла розводили фосфатно-сольовий буферний розчин, рН 7,2-7,4 (ФСР), до співвідношення 1:100. Потім 0,5 мл антитіл додавали до прегідролізату. Все ретельно перемішували 5 хв і залишали до повного гелеутворення на 10 хв при кімнатній температурі. Отриманий гель промивали 2 мл ФСР. Найкращі характеристики золь-гель матеріалу проявлялися на другий день дозрівання. Потім гель (0,27 г у перерахунку на сухий гель) роздрібнювали і поміщали в стандартну колонку для твердофазної екстракції між двома пористими фільтрами. Отриману ІАК промивали 50 мл ФСР. Гель з іммобілізованими МАТ зберігали під шаром ФСР при температурі 4 °С.

Синтез передколонки. Для одержання передколонки, що дозволяє нівелювати неспецифічну взаємодію компонентів сироватки з ІАС, використали аналогічний носій з іммобілізованими мишачими МАТ, які за результатами ІФА не проявляли активності до IgE людини. Для синтезу передколонки використали високі концентрації МАТ (10 мг/мл) [9].

Гель-фільтрація. Видалення магнію хлориду із препарату IgE здійснювали гель-фільтрацією на колонці 1,5×20 см із сефадексом G-25. Препарат в об'ємі 3-4 мл наносили на гель, елюцію проводили фосфатним буфером зі швидкістю 2 мл/хв. Вихід IgE реєстрували при 280 нм.

Визначення концентрації IgE людини. Концентрацію IgE людини у сироватці визначали за допомогою відповідного ІФА-набору [18].

Імунодифузія за Оухтерлоні. Імунодифузію проводили у 1,25% агаровому гелі, приготовленому на боратному буфері з рН 8,6. Використовували моноспецифічні сироватки проти імуноглобулінів людини різних класів (ЦНІИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Росія). У центральні лунки вносили імунні сироватки, а у периферійні – розчин антигену у серійних розведеннях. Фарбування гелю проводили розчином амідочорного, а відмивку – 2% розчином оцтової кислоти.

Результати досліджень та їх обговорення

У наших попередніх роботах було науково обґрунтовано та розроблено методику неспецифічного виділення та очистки IgE людини, яка базується на молекулярно-ситовій хроматографії [3]. За наявності специфічних імунохімічних реагентів – МАТ до IgE людини – можливо розробляти специфічні методики виділення даного класу імуноглобулінів із біологічних рідин. На попередніх етапах дослідження нами була охарактеризована панель МАТ до IgE людини [4], у т.ч. проведено їх порівняльне епітопне картування, що є важливою передумовою для створення високоефективного методу імуноафінної хроматографії (ІАХ).

У літературі [2, 13, 14] описано чимало прикладів розробки імуноафінних сорбентів. У всіх даних роботах суть описаних розробок адресується до визначення антитіл «захоплення», що забезпечують найкращі характеристики методу, оптимізацію умов специфічної сорбції та десорбції. Разом із тим, майже не приділяється увага вибору носія, який використовується як основа для синтезу ІАС. У більшості робіт як основу сорбенту використовують сефарозу, рідше – сефакрил, мікрогранульовану целюлозу тощо [2, 5, 14, 16, 20]. Як відомо, сефароза являє собою гранульовану агарозу, характеризується більш крупними порами, ніж сефадекс [11]. Дані сорбенти модифікують в залежності від конкретних вимог щодо розділення молекул – змінюють розміри часток та кількість внутрішніх зшивок [6, 7, 8, 10]. У той же час, досягнення сучасної хімії композиційних матеріалів відкривають широкий вибір потенційних носіїв для створення імуноафінних колонок (ІАК) [6, 7, 8, 10]. Найбільш перспективними, на наш погляд, є різні алкілсилани та їх похідні, які характеризуються зручністю отримання на їх основі золь-гелів, термічною та хімічною стійкістю останніх [8]. При виборі алкілсиланів для наших експериментів ми спиралися на дані літератури [6, 7, 8, 10, 14], а також міркування щодо токсичності потенційних продуктів розкладу алкілсиланів різного складу. Оскільки при гідролізі даних сполук можливе вивільнення відповідних спиртів, то відразу відмовилися від використання алкілсиланів, що містять метилову групу. Порівняльні дослідження проводили із використанням як основи для ІАК сефарози 6В та двох алкілсиланів – тетраетоксисилану (ТЕОС) та тетраетилсилікату (ТЕС).

На першому етапі роботи нами було порівняльно досліджено ефективність отримання золь-гель матеріалів на основі ТЕОС та ТЕС. Технологія отримання золь-гелю передбачала проведення двох етапів: утворення золю на основі відповідного алкілсилану та розчину кислоти під впливом ультразвуку; введення (іммобілізація) МАТ до кремнійорганічної матриці. Критеріями оцінки ефективності золь-гель утворення були: оптична прозорість, швидкість дозрівання, характер розчину, рівномірність утворення тримірної структури гелю. При використанні обох прекурсорів – ТЕОС та ТЕС – було отримано швидкодозріваючий стійкий розчин, проте у випадку ТЕС він був майже оптично непрозорим, тому у подальших дослідженнях використовували ТЕОС. Оптимальні часові умови ультразвукового впливу визначали шляхом вивчення параметрів іммобілізації МАТ на матриці, а саме: встановлювали залишкову активність антитіл у реакційному буферному розчині. Дане дослідження для алкілсиланів проводили паралельно із аналогічним дослідженням кінетики іммобілізації МАТ на сефарозі 6В. Зниження титру анти-IgE МАТ 163D12 у ІФА засвідчувало зниження концентрації антитіл у буферному розчині й, відповідно, їх іммобілізації на матриці. При постановці ІФА проби розводили 1:400 та порівнювали із контрольним розчином МАТ (рис. 1).

Отримані результати свідчать про те, що обробка прекурсора для синтезу матриці ІАК ультразвуком упродовж 20 хв не забезпечує утворення гелю, що здатен ефективно іммобілізувати антитіла, у той же час при збільшенні часу ультразвукової експозиції до 40 хв спостерігався доволі прийнятний кінетичний профіль введення МАТ у склад матриці – за 10 год більш ніж 94% антитіл іммобілізувалися на поверхні матриці. У випадку сефарози 6В

імобілізація антитіл відбувалася дещо швидше – за 5 год у матрицю було введено близько 95% МАТ. Отже, у випадку отримання матриці на основі ТЕОС використовували обробку ультразвуком упродовж 40 хв. при температурі 40 °С. Оскільки під час проведених експериментів обидва варіанти сорбентів демонстрували перспективно прийнятні результати, до подальші дослідження із розробки методики специфічного виділення ІgЕ людини проводили паралельно для двох ІАК – як на основі сефарози 6В, так й на основі ТЕОС.

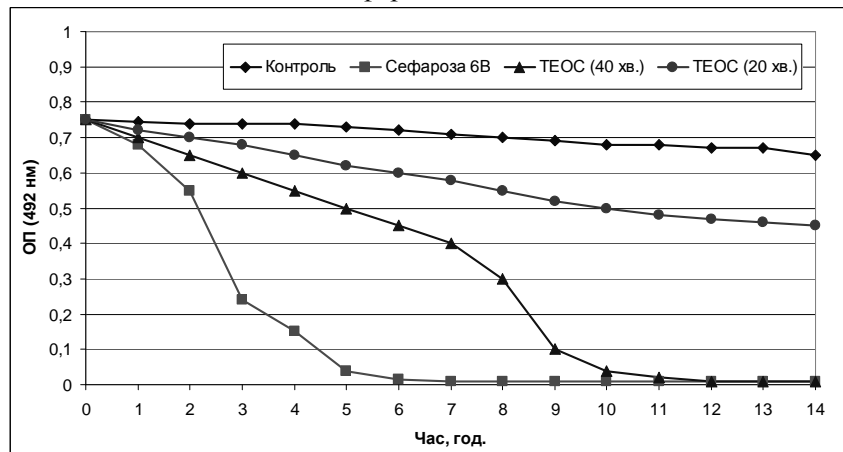


Рис. 1. Порівняльна кінетика іммобілізації МАТ на різних матрицях-сорбентах

Встановлення оптимальних умов проведення ІАХ проводили для хроматографічних колонок із різними матрицями-основами та різними МАТ. Для експериментів використовували МАТ 163D12 та 164Н10, що спрямовані до епітопу Е2 молекули ІgЕ людини та засвідчили найкращі результати при їх використанні як основи імуносорбенту у ІФА для кількісного визначення ІgЕ людини [18].

Порівняльну оцінку різних ІАК проводили за активністю зв'язування ІgЕ сироватки людини та чистотою імуноглобуліну після його елюювання з колонки. Як елюювальний розчин використовували: цитратно-фосфатний буферний розчин (ЦФР), рН 2,0-2,4, 8М розчин сечовини, рН 2,0-2,4 та 4М розчин MgCl₂×6H₂O. Порівняльна характеристика різних ІАК представлена у табл. 1, а відповідні ступені вилучення ІgЕ людини із розчину при різних варіантах ІАХ на рис. 2.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика різних ІАК

Матриця-сорбент	МАТ	Елюат	№ варіанту	Кількість ІgЕ, що наноситься на ІАК, мкг	Кількість ІgЕ у фракції, що не зв'язалася з ІАК, мкг	Кількість ІgЕ у елюаті, мкг
Сефароза 6В	163D12	ЦФР	1	9,2	1,25±0,04	7,95±0,11
		Сечовина	2	9,2	1,12±0,09	8,06±0,15
		MgCl ₂	3	9,2	1,08±0,07	8,13±0,08
	164Н10	ЦФР	4	9,2	1,02±0,07	8,16±0,21
		Сечовина	5	9,2	1,13±0,05	8,08±0,14
		MgCl ₂	6	9,2	1,15±0,04	8,04±0,15
Тетраетокси-силан	163D12	ЦФР	7	9,2	1,22±0,04	7,98±0,11
		Сечовина	8	9,2	1,15±0,09	8,04±0,10
		MgCl ₂	9	9,2	1,08±0,06	8,10±0,22
	164Н10	ЦФР	10	9,2	0,84±0,04	8,37±0,09
		Сечовина	11	9,2	0,72±0,06	8,45±0,11
		MgCl ₂	12	9,2	0,75±0,03	8,47±0,14

Примітка: представлено середні арифметичні значення результатів трьох циклів хроматографії для кожного з варіантів та стандартне відхилення.



Рис. 2. Ступені вилучення ІgЕ людини із розчину при різних варіантах ІАХ

Отримані результати свідчать про доволі високий рівень вилучення цільового імуноглобуліну із сироватки крові людини. Разом із тим, при використанні МАТ 164Н10 було отримано дещо кращі результати, ніж у аналогічних дослідах із використанням МАТ 163D12. За досліджуваних умов ІАК на основі ТЕОС також засвідчували дещо вищі ступені вилучення ІgЕ. Слід також зазначити, що при проведенні даних експериментів нами було помічено, що об'єм кожного різновиду елюату, необхідний для повної елюції сорбованого імуноглобуліну, відрізняється один від одного; у випадку використання ЦФР для цього навіть потрібно 2 цикли. Отже, більш прийнятними для використання як елюент себе зарекомендували розчини 8М сечовини та 4М $MgCl_2 \times 6H_2O$. Використання ж ЦФР не було доцільним через необхідність проведення декількох етапів елюції сорбованого імуноглобуліну.

Слід зазначити, що співвідношення ІgЕ : загальний білок у елюаті коливалося від 0,77 до 0,84 (варіанти хроматографії 5-6 та 11-12). Такі результати свідчили про наявність неспецифічного зв'язування компонентів сироватки із ІАС. Приклади подібного роду неспецифічної взаємодії білків сироватки та хроматографічної колонки, що містить мишачі МАТ описані й іншими авторами [2, 9, 17, 22]. Найбільш ефективним методом вирішення даної проблеми, на нашу думку, є залучення додаткового етапу хроматографії із використанням сорбенту-матриці, на якій фіксовано мишачі МАТ, що не є специфічними до цільової речовини. Після використання такої «передколонки» вдалося підвищити вміст ІgЕ людини у елюаті до 96-98% (варіанти 5 та 11, табл. 1).

Для оцінки походження білків домішок, що забруднювали елюат у схемі очистки без «передколонки» нами було проведено імунодифузію за Оухтерлоні із сироваткою до ІgG людини. Елюат у варіанті хроматографії без «передколонки» утворював невеликий преципітат із сироваткою до ІgG людини, а у випадку схеми виділення із «передколонкою» такого преципітату не утворювалося. Отже, серед білків, що забруднювали елюат із ІgЕ людини були імуноглобуліни людини класу G, специфічні до мишачих імуноглобулінів. Отримані результати корелюють із даними інших авторів [5, 24], які повідомляли про присутність анти-мишачих антитіл у сироватках крові людей у титрах, що є достатніми для перешкоджання не тільки ефективній терапії МАТ, але й проведенню серологічних тестів із використанням мишачих антитіл.

Для повної оцінки якості синтезованих ІАК необхідно було дослідити наступні їх характеристики: вплив багатократного використання колонки на ступінь вилучення ІgЕ людини, вплив різних концентрацій ІgЕ на ступінь його вилучення із розчину, а також наявність вимивання іммобілізованих МАТ при промиванні колонки різними розчинами.

Для оцінки першої характеристики ІАК із сефарозою 6В та тетраетоксисиланом багаторазово (25 циклів) регенерували та повторювали сорбцію ІgЕ людини із сироватки крові людини із концентрацією даного імуноглобуліну 9,2 мкг/мл (дані експерименти проводили із сироваткою, яку попередньо було пропущено через «передколонку»). Отримані результати засвідчили, що ІАК із сефарозою 6В є дещо менш стабільним сорбентом: за звичайних умов

елюції вже на 14 циклі спостерігається суттєве падіння ступеню вилучення аналіту (до 78%), у той час, як для сорбенту на основі тетраетоксисилану відчутне падіння даного показника (до 75%) було зафіксовано тільки на 19 циклі.

Оскільки синтезовані нами сорбенти можуть використовуватися як у прикладних науково-технічних розробках, так й у фундаментальних дослідженнях у галузі молекулярної імунології, то діапазон концентрацій аналіту у вихідному матеріалі може коливатися у доволі широкому діапазоні. Саме тому доцільним було дослідити залежність концентрації аналіту на ступінь його вилучення. Отримані результати (табл. 2) свідчать про можливість достатньо ефективного вилучення IgE людини навіть із достатньо розведених розчинів для обох різновидів ІАК.

Дослідження наявності вимивання антитіл із ІАК проводили методом адсорбційної УФ-спектроскопії (довжина хвилі 280 нм) при промиванні ІАК десятикратним об'ємом фосфатного буферного розчину та етилового спирту. Отримані результати, засвідчили відсутність вимивання антитіл із колонок обох видів.

Таблиця 2

Залежність ступеню вилучення IgE людини від його концентрації

Об'єм розчину, мл	Концентрація IgE у розчині		Ступінь вилучення, %	
	мкг/мл	МО/мл	Сефароза 6В	ТЕОС
500	0,0092	3,77	71	74
50	0,092	37,7	95	96
10	0,92	377	97	96
1	9,2	3770	96	98
1	20,07	8225	98	98

Утворення матриці-сорбента при обробці ТЕОС ультразвуком упродовж 40 хв при температурі 40 °С. Було доведено, що отриманий за даною схемою сорбент не поступається за кінетичними характеристиками іммобілізації МАТ традиційній сефарозі 6В. Було показано, що більш ефективним (за критерієм ступеню вилучення цільової речовини із розчину) є варіант імуноафінної хроматографії із використанням як антитіл «захоплення» МАТ 164Н10, а як елюат – розчини 8М сечовини або 4М хлориду магнію. У експериментах було доведено, що для зменшення неспецифічної взаємодії компонентів сироватки та імуноафінного сорбенту та, відповідно, підвищення ефективності хроматографічної очистки доцільно використовувати додатковий попередній етап пропускання сироватки через «передколонку» із іммобілізованими мишачими антитілами, що не є специфічними до цільової речовини (IgE людини). Імунохроматографічні колонки, синтезовані на основі різних матриць-сорбентів – сефарози 6В та ТЕОС, – характеризуються високими значеннями ступеню вилучення (не менше 95 %) у широкому діапазоні концентрацій IgE людини (10^{-2} ... 10^2 мкг/мл), проте колонка на основі сефарози 6В є менш стабільною при багаторазовому використанні (більше 22 циклів). Таким чином, алкілсилани, зокрема ТЕОС, є цілком перспективним матеріалом для створення на їх основі хроматографічних колонок.

Висновки

Було проведено порівняльні дослідження різних варіантів імуноафінних сорбентів на прикладі розробки імуноафінної хроматографії для виділення та очистки IgE людини. Окрім традиційно використовуваної сефарози як сорбент були використані золь-гель матеріали на основі тетраетоксисилану та тетраетилсилікату. Показано, що останній є неперспективним для синтезу сорбентів хроматографічного призначення через оптичну непрозорість. Експериментально було встановлено оптимальні умови синтезу хроматографічного сорбенту на основі ТЕОС, які забезпечують прийнятні характеристики іммобілізації біологічної речовини (моноклональних антитіл).

1. *Антитела*. Методы: Кн. 1: Пер. с англ. / Под ред. Д.Кэтти. — М.: Мир, 1991. — 288 с.
2. Галкін О.Ю. Одержання імуноафінного сорбенту та розробка методики специфічного виділення IgM людини / О.Ю. Галкін // Наукові вісті НТУУ «КПІ». — 2009. — № 2. — С. 98—102.
3. Галкін О.Ю. Розроблення удосконаленої методики виділення та очистки IgE людини / О.Ю. Галкін // Наукові вісті НТУУ «КПІ». — 2013. — № 3. — С. 7—11.
4. Галкін О.Ю. Одержання та дослідження властивостей нових моноклональних антитіл до IgE людини / О.Ю. Галкін, А.А. Савченко, К.І. Нікітіна, О.М. Дуган // Український біохімічний журнал. — 2013. — Т. 85, № 8. — С. 81—87.
5. Гільчук П.В. Імобілізовані одноланцюгові антитіла для афінного очищення рекомбінантного інтерферону альфа-2b людини / П.В. Гільчук, О.В. Окунів, Д.М. Іродов // Біополімери і клітина. — 2006. — Т. 22, № 2. — С. 157—161.
6. *Диагностика наносистем. Многоуровневые фрактальные наноструктуры. Ч. II* / А.П. Шпак, В.В. Шилов, О.А. Шилова, Ю.А. Куницкий. — К.: Академперіодика, 2004. — 112 с.
7. *Золь-гель технология микро- и нанокompозитов: Учебное пособие* / В.А. Мошников, Ю.М. Таиров, Т.В. Хамова, О.А. Шилова. — СПб: Лань, 2013. — 304 с.
8. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології: зб. наук. пр.* / Редкол.: А.П. Шпак (відп. ред.) та ін. — Т. 2, Вип. 3. — К.: Академперіодика, 2004. — С. 751—1101.
9. Николаенко И.В. Выделение поверхностного антигена вируса гепатита В / И.В. Николаенко, В.С. Гончаренко, Н.Н. Шимко, А.Ю. Галкин // Укр. біохім. ж. — 2007. — Т. 79, № 2. — С. 114—122.
10. *Основы золь-гель-технологии нанокompозитов. Монография* / А.И. Максимов, В.А. Мошников, Ю.М. Таиров, О.А. Шилова. — СПб.: Техномедиа, 2007. — 255 с.
11. *Справочник биохимика* / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. — М.: Мир, 1991. — 544 с.
12. *Хроматографические методы очистки белков. Учебно-методическое пособие* / А.Н. Ибрагимов, А.Г. Бикмуллин, Д.А. Сатаева и др. — Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2013. — 48 с.
13. Шевченко Г.В. Выделение и характеристика цитокинин-связывающих и АБК-связывающих белков *Synechocystis* sp. PCC 6803: автореф. дис. ... канд. биол. наук 03.01.05 / Шевченко Г.В. — М., 2011. — 20 с.
14. Юрасов Н.А. Иммуноаффинное концентрирование и тест-определение некоторых полициклических ароматических углеводов и микотоксинов: автореф. дис. ... канд. хим. наук 02.00.02 / Н.А. Юрасов. — Саратов, 2011. — 20 с.
15. Altstein M. Immunochemical approaches for purification and detection of TNT traces by antibodies entrapped in a sol-gel matrix / M. Altstein, A. Bronshtein, B. Glattstein // Anal. Chem. — 2001. — Vol. 73(11). — P. 2461—2467.
16. Bearden J.C., Jr. Isolation of nucleolar DNA-binding proteins by simultaneous, competitive DNA-sephadex affinity chromatography / J.C. Bearden, Jr. // J. Biochem. Biophys. Meth. — 1980. — Vol. 2(1). — P. 37—47.
17. Goding J. Monoclonal antibodies. Principles and practice / J. Goding. — San Diego: Academic press, 1996. — 492 p.
18. 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.
19. Harlow E. Antibodies. A laboratory manual / E. Harlow, D. Lane. — N.-Y.: Cold Spring Harbor, 1988. — 726 p.
20. Islam R. Affinity purification of hen egg lysozyme using sephadex G75 / R. Islam, J. Kite, A.S. Baker // African J. Biotechnol. — 2006. — Vol. 5(20). — P. 1902—1908.
21. Klee G.G. Human anti-mouse antibodies / G.G. Klee // Arch. Pathol. Lab. Med. — 2000. — Vol. 124(6). — P. 921—923.
22. Kricka L.J. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays / L.J. Kricka // Clin. Chem. — 1999. — Vol. 45(7). — P. 942—956
23. Kronvall G. A surface component in group A, C, and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G-binding properties / G. Kronvall // J. Immunol. — 1973. — Vol. 111. — P. 1401—1406.
24. Richman D.D. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species / D.D. Richman, P.H. Cleveland, M.N. Oxman // J. Immunol. — 1982. — Vol. 128. — P. 2300—2305.

А. Ю. Галкин, Ю. В. Горшун, А. Н. Дуган

Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»
 Научно-исследовательский и конструкторско-технологический институт городского хозяйства

**РАЗРАБОТКА ИММУНОАФФИННОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ IgE ЧЕЛОВЕКА
 ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ**

В статье представлены результаты сравнительных исследований различных вариантов иммуноаффинных сорбентов для выделения и очистки IgE человека, а именно: сефарозы 6В и золь-гель материалов на основе тетраэтоксисилана (ТЭОС) и тетраэтилсиликата. Экспериментально были установлены оптимальные условия синтеза хроматографического сорбента на основе ТЭОС, которые обеспечивают приемлемые характеристики иммобилизации биологического вещества, а именно: образование матрицы-сорбента при обработке ТЭОС ультразвуком в течение 40 мин при температуре 40 °С. Сорбент на основе ТЭОС не уступает по кинетическим характеристикам иммобилизации антител сефарозе 6В. Было показано, что более эффективным является вариант иммуноаффинной хроматографии с использованием анти-IgE моноклональных антител 164Н10 и элюата – раствора 8М мочевины или 4М хлорида магния. Иммунохроматографические колонки, синтезированные на основе сефарозы 6В и ТЭОС, характеризуются высокими значениями степени извлечения (не менее 95%) в широком диапазоне концентраций IgE человека (10^{-2} ... 10^2 мкг/мл), однако колонка на основе сефарозы 6В менее стабильна при многократном использовании (более 22 циклов).

Ключевые слова: иммуноаффинная хроматография, сефароза, алкилсиланы, IgE человека

O. Yu. Galkin, Yu. V. Gorshunov, O. M. Dugan

National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”, Ukraine
 Scientific-Research and Design-Technological Institute of Municipal Economy, Ukraine

**DEVELOPMENT OF IMMUNOAFFINITY METHOD FOR HUMAN IGE ISOLATION
 FROM BIOLOGICAL LIQUIDS**

The results of comparative studies of different immunoaffinity sorbents for the isolation and purification of human IgE have been represented (Sephарose 6B, and sol-gel materials based on tetraethyl orthosilicate (TEOS) and tetraethyl silicate. It has been experimentally determined the optimum conditions of synthesis of chromatographic sorbent based on TEOS, which provide acceptable properties for immobilization of biological substances, namely the creation of sorbent matrix while processing TEOS ultrasound for 40 min at 40 °C. Sorbent based on TEOS not inferior to the monoclonal antibodies immobilization kinetic characteristics of sephарose 6B. It was shown that more effective is immunoaffinity chromatography using an anti-IgE monoclonal antibody 164H10 and eluate – 8M solution of urea or 4 M magnesium chloride. Immunochromatographic column synthesized on sephарose 6B and TEOS, characterized by high values of the degree of withdrawal (not less than 95%) in a wide range of concentrations of human IgE (10^{-2} ... 10^2 mg/ml), however sephарose 6B-based column is less stable after repeated use (more than 22 cycles).

Keywords: immunoaffinity chromatography, sephарose, alkylsilanes, human IgE

Рекомендує до друку

Надійшла 27.05.2015

О. Б. Столяр