© Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2011
УДК 577.27: 57.083.33

Розробка імуноферментного набору для кількісного визначення загального IgM людини

О.Ю.Галкін, О.М.Дуган

Національний технічний університет України, Київський політехнічний інститут
Київ, Україна

На основі комплексної характеристики моноклональних антитіл до IgM людини розроблено імуноферментний набір для кількісного визначення сумарних IgM-антитіл із високою аналітичною чутливістю. Динамічний діапазон розробленого імуноферментного аналізу складає 2 порядки (11-3200 нг/мл). Показники варіабельності є допустимими для даного методу. Жоден із досліджуваних білків сироватки (IgG, IgA, IgE людини, альбумін) не впливає на визначення тест-концентрації (100 нг/мл) IgM людини.

Ключові слова: IgM людини, моноклональні антитіла, імуноферментний аналіз, кількісне визначення

ВСТУП

Визначення концентрації імуноглобулінів дозволяє оцінити потенціал гуморальної імунної відповіді без урахування антигенної специфічності [1]. Підвищення концентрації IgM може спостерігатися при низці інфекційних захворювань (вірусні, внутрішньоутробні, ранні бактеріальні та паразитарні, гострі та хронічні гнійні інфекції), аутоімунних станах (ревматоїдний артрит), хронічних захворюваннях гепатобіліарної системи, ентеропатіях, множинній мієломі IgM-типу, макроглобулінемії Вальденстрема тощо. Набута недостатність IgM-антитіл може бути викликана цитотоксичною та променевою терапією, спленектомією, гастроентеропатією та опіками, лімфомами. Вроджена недостатність імуноглобуліну М спостерігається при хворобі Брутона (агаммаглобулінемії) [2] .

Найчастіше концентрацію імуноглобулінів визначають методами нефелометрії чи турбідиметрії [3, 4]. Однак ці методи недостатньо чутливі для контролю продукції й визначення рівня секреції імуноглобулінів В-клітинами, наприклад, у культурі лімфоцитів з метою диференціального діагнозу первинних імунодефіцитів або оцінки ступеня вторинних імунодефіцитів, обумовлених низьким рівнем антитіл. Імуноферментний метод характеризується високою чутливістю, яка й необхідна для таких діагностичних завдань. Таким чином, перед нами постало завдання по розробці високочутливого імуноферментного аналізу (ІФА) для кількісного визначення IgM людини. Дана задача може бути вирішена при використанні надчутливих біологічних реагентів, якими є моноклональні антитіла (МКАТ).

Метою дослідження було на основі комплексної характеристики моноклональних антитіл до IgM людини розробити імуноферментний набір для кількісного визначення сумарних IgM-антитіл із високою аналітичною чутливістю.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Процедура непрямого ТІФА. Сорбцію IgM і Fc-фрагментів проводили в 0,05 М карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9,6) протягом ночі при 4°С в концентрації 5 і 2,5 мкг/мл відповідно. Для відмивання використовували фосфатно-сольовий буфер з додаванням 0,05% твін-20 (ФСБТ), рН 7,2-7,4. Планшет інкубували 1 год при 37°С і потім відмивали. Для виявлення зв'язаних антитіл використовували кон'югат козячих антитіл до імуноглобулінів миші з пероксидазою хрону (ПХ), який інкубували 1 год при кімнатній температурі. Планшет тричі відмивали ФСБТ і один раз водою. Як субстрат використовували 0,003% розчин перекису водню в 0,15 М цитратному буфері, рН 5,0, а як хромоген — 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). Після зупинення реакції вимірювали оптичну густину (ОГ) при довжині хвилі 450/620 нм.

ТАБЛИЦЯ 1

Узагальнена характеристика МКАТ до IgM людини

№	Назва МКАТ	Опитчна густина* у ТІФА	Ізотип	Титр у культуральній рідині	Константа афінності K_a, 10^9× моль/л	Епітоп, до якого спрямовано антитіло
Короткострокова схема імунізації						
1	111A4	2,324	IgG_{2b}	1:800	10,0	A1
2	111C2	2,660	IgG_{2b}	1:1000	10,0	A1
3	111C9	2,785	IgG_{2a}	1:500	14,0	A1
4	112C5.2	3,201	IgG_{2b}	1:1000	5,0	A1
5	112G9	2,004	IgG_{2b}	1:1000	5,0	A2
6	112H12	2,998	IgG_{1}	1:1000	10,0	A2
7	113F8	3,012	IgG_{2b}	1:800	5,0	A1
8	114B8	2,825	IgG_{2b}	1:1000	5,0	A2
9	114G10	2,431	IgG_{1}	1:1000	5,0	A3
10	116A2	3,021	IgG_{2b}	1:800	5,0	A3
11	116C4	3,010	IgG_{1}	1:800	5,0	A2
12	117B5	3,003	IgG_{2b}	1:800	5,0	A3
Довгострокова схема імунізації						
13	121B8	3,032	IgG_{1}	1:800	10,0	B2
14	124E7.	3,058	IgG_{3}	1:500	10,0	B1
15	125B5	2,506	IgG_{2b}	1:500	5,0	B1
16	125C2	3,012	IgG_{1}	1:1000	5,0	B2
17	125C8	2,639	IgG_{3}	1:500	5,0	C
18	126B10	2,432	IgG_{2a}	1:500	5,0	C
19	126G6	2,603	IgG_{1}	1:1000	5,0	B1
20	127E9.	2,962	IgG_{2b}	1:500	5,0	C
21	127H9	2,622	IgG_{1}	1:500	10,0	B1

Примітка: *у таблиці наведено середні значення ОГ та константи афінності при тестуванні супернатантів гібридом у чотирьох повторностях ($p<0,05$).*

Конкурентний ТІФА. Дану модифікацію аналізу використовували для встановлення епітопної специфічності отриманих МКАТ. IgM людини сорбували в 0,05 М карбонат-бікарбонатному буфері в концентрації 5 мкг/мл на планшети для ТІФА. Планшет інкубували протягом ночі при 4°С та відмивали ФСБТ. В усі лунки планшета вносили досліджуваний пероксидазний кон'югат МКАТ. Після чого в лунки різних рядів для конкуренції вносили МКАТ інших клонів у різних концентраціях: починали з 0,4 мг/мл та кожний наступний раз розводили вдвічі. Як контроль використовували різницю значення ОГ кон'югата МКАТ та ОГ аналізу при конкуренції однойменних МКАТ. Подальшу процедуру проводили як для непрямого ТІФА.

Визначення афінності антитіл. Константу афінності МКАТ визначали методом інгібування [5]. Різні концентрації IgM (від 10^{-9} до 10^{-6} моль/л) змішували зі зразками культуральних рідин, що містять МКАТ. Проінкубовані зразки (1 год. при 37°С) переносили в планшет, попередньо сенсибілізований IgM людини. Далі здійснювали процедуру непрямого ТІФА. Як контроль використовували зразки культуральних рідин, що попередньо не інкубували з IgM.

Визначення ізотипу МКАТ. Ізотип отриманих моноклональних антитіл визначали з використанням стандартного набору для ізотипування ISO-2 («Sigma», США).

Синтез пероксидазних кон'югатів. Кон'югування МКАТ з ПХ проводили в масовому співвідношенні антитіл до ферменту 2:1 методом періодатного окислювання за P.Tijssen [6] із модифікаціями. ПХ («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 з концентрацією 14 мМ. Для окислювання ПХ суміш інкубували 2 год. при кімнатній температурі. Отриманий розчин окисленої

ТАБЛИЦЯ 2

Ефективність визначення IgM моноклональними антитілами різних епітопів у «сендвіч»-варіанті ІФА

Сорбція / Кон'югат			Епітопи і МКАТ		
			B2	A2	
			125C2	112H12	116C4
Епітопи і МКАТ	A1	112C2	1,644	1,152	0,512
		112C5.2	1,533	1,093	0,215
	B1	125B5	0,882	1,832	1,645
		126G6	0,230	1,742	1,604

Примітка: *у таблиці наведено середні значення оптичної густини при постановці ІФА зі зразком IgM (20 нг/мл) у чотирьох повторностях; p<0,05.*

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, інкубували 3 год. при кімнатній температурі. Розчин кон'югата 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'югата МКАТ діалізом переводили в 0,02 М фосфатний буфер з 0,15 М NaCl.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для вирішення поставленої задачі необхідно було отримати набір МКАТ до IgM людини та провести комплексне дослідження біологічних властивостей МКАТ. МКАТ отримували за двома схемами імунізації — коротко- та довгостроковою. Докладно дані дослідження описано в наших попередніх роботах [7, 8], а їх узагальнені результати наведені в табл. 1.

При дослідженні отриманих МКАТ у складі діагностичних наборів для виявлення специфічних IgM було отримано наступні результати. Була доведена можливість використання кон'югатів двох МКАТ у складі тест-систем для діагностики цитомегалії (кон'югат 112H12-HRP) й Епштейн-Барр вірусної інфекції (суміш кон'югатів 112H12-HRP і 125C2-HRP), також трьох МКАТ у складі імуносорбенту тест-наборів для діагностики токсоплазмозу, краснухи та урогенітального хламідіозу (антитіла 112C5.2), а також вірусу простого герпесу (антитіла 125B5 та 126G6).

На наступному етапі роботи проводили підбір пари МКАТ для так званої IgM-«пастки» (модифікація ІФА). За даними епітопного картування А та В, МКАТ розпізнають найбільш віддалені епітопи. За результатами вивчення властивостей МКАТ в ІФА для визначення специфічних IgM антитіла епітопу А1 (111C2, 112C5.2) та епітопу В1 (125B5, 126G6) засвідчили кращі результати при використанні у складі імуносорбента, а епітопу А2 (112H12, 116C4) та епітопу В2 (125C5) — у складі імуноферментного кон'югата. Отже, МКАТ епітопів А1-В2 та В1-А2 являють собою найбільш вірогідну «сендвіч»-комбінацію для конструювання неконкурентного ІФА. Для встановлення оптимальної орієнтації МКАТ у тест-системі антитіла епітопів А1, В1 тестувалися у вигляді імуносорбенту, а епітопів А2, В2 — у вигляді пероксидазних кон'югатів (табл. 2). Сорбційно-детекційна здатність різних пар МКАТ корелювала із їх афінністю й була максимально вираженою для високоафінних моноклональних антитіл 125B5 і 112H12. Дана пара МКАТ використовувалася для подальших досліджень.

Після встановлення оптимальної конфігурації МКАТ у «сендвіч»-ІФА проводилася оптимізація умов постановки аналізу: встановлення робочих концентрацій моноклональних антитіл та імуноферментного кон'югата, часу та умов постановки, об'єму зразка та складу реакційного буфера. Фінальний протокол, наведений нижче, є результатом проведеної роботи та являє собою оптимізований варіант «сендвіч»-ІФА щодо якого визначалися аналітичні характеристики.

Протокол «сендвіч»-варіанта ТІФА. МКАТ, специфічні до IgM людини, сорбували в 0,02 М карбонат-бікарбонатному буфері в концентрації 2 мкг/мл на 96-лункові планшети для ТІФА. Планшет інкубували протягом 12 год. при 4°С, потім тричі відмивали ФСБТ та витримували в розчині БСА (10 мг/мл у ФСБ) 1 год. при 37°С. Після чотирьохкратної відмивки ФСБТ лунки планшета заповнювали 100 мкл реакційного буфера (0,05 М трис-HCl буфер, pH 8,0, 0,15 М

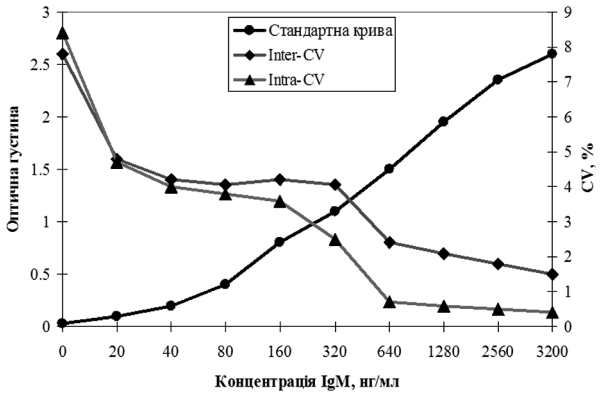

Рис. 1. Стандартна крива «сендвіч»-ІФА (–●–) й рівень варіабельності визначення стандартних концентрацій IgM в одній постановці (Intra-CV; –■–) та між постановками (Inter-CV; –▲–).

NaCl, 5 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,2% Tween-20, 25 мкг/мл мишиних МКАТ, неспецифічних до IgM людини [9]), що містить 500 нг/мл мічених ПХ МКАТ до IgM людини. Далі у лунки вносили по 20 мкл контрольних зразків IgM, стандартизованих відносно препарату IgM людини та досліджуваних зразків сироваток крові людини, попередньо розведених реакційним буфером 1:1000. Планшети інкубувалися 2 год. при температурі 37°С при постійному вструшуванні та відмивалися 4 рази. Подальшу процедуру проводили як і для непрямого ТІФА. Концентрація IgM людини розраховувалась за допомогою калібрувального графіка стандартних (контрольних) зразків. Якщо концентрація IgM у зразку перевищувала значення 3,2 мг/мл, досліджуваний зразок необхідно повторно проаналізувати з додатковим розведенням у 2-4 рази.

На наступних етапах дослідження проводили визначення границі чутливості, динамічного діапазону, варіабельність, специфічність (перехресну реактивність) розробленого ІФА.

Для визначення границі чутливості спершу було встановлено середнє значення (M±*m*) нульового стандарту (фоновий сигнал) при 20 постановках ІФА, яке склало 0,032±0,004. Границя чутливості розраховувалася за калібрувальним графіком як концентрація IgM, при якій оптична густина рівна (M±2*m*)*ОГ нульового стандарту (0,040) й склала 11 нг/мл. Таким чином, розроблений ІФА характеризувався чутливістю, що на порядок перевищує методи нефелометрії та турбідіметрії (близько 50 нг/мл).

Після віднімання ОГ нульового зразка від значень ОГ стандартів IgM була отримана лінійна стандартна крива до 3200 нг/мл, що обмежена граничним значенням ОГ (>2,5) (рис. 1). Таким чином, динамічний діапазон склав 2 порядки (11-3200 нг/мл). Такий динамічний діапазон вимагає попереднього розведення сироватки/плазми крові та інших біологічних рідин при постановці аналізу.

На рівні стандартів IgM тест-система засвідчила допустимі показники варіабельності виходячи із величини коефіцієнтів варіації в рамках однієї постановки (intra-CV=4,8±2,0%) й між постановками (inter-CV=5,3±2,2%). Значення intra-CV та inter-CV стабілізуються в середньому діапазоні концентрацій IgM (20-320 нг/мл) та дещо завищені в районі крайових концентрацій імуноглобуліну (0-20 нг/мл), що вказує на найбільшу роздільну здатність тесту при визначенні концентрацій IgM починаючи із 20 нг/мл. Визначення концентрацій IgM вище 320 нг/мл характеризується максимальною стабільністю (intra-CV=0,6%, inter-CV=2,1%), що додатково свідчить про те, що верхнє обмеження динамічного діапазону у розробленому ІФА не пов'язано з насиченням ділянок зв'язування МКАТ, а обумовлено можливостями фотометричного методу детекції.

Як відомо, перехресна реактивність одного або двох МКАТ, на основі яких розроблено ІФА, із структурно близькими з IgM білками може бути причиною хибнонегативних або хибнопозитивних результатів відповідно. Для встановлення факту перехресної реактивності імуноглобуліни інших класів (IgG, IgA, IgE людини) та альбумін у концентрації 1 мкг/мл додавали до реакційної суміші ІФА з відомою концентрацією IgM (100 нг/мл), та їх ефект визначали як ефективність визначення (%) відомої концентрації IgM людини (різниця результатів визначення концентрації IgM зразків із концентрацією 100 та 0 нг/мл, що наведена у відсотках).

ТАБЛИЦЯ 3

Перехресна реактивність «сендвіч»-ІФА з білками сироватки крові людини

Білок (1 мкг/мл)	IgM		Виявлення, %
	0 нг/мл	100 нг/мл	
IgG, людини	0	100,1	100,1
IgA людини	0	102,1	102,1
IgE людини	0	100,5	100,5
Альбумін	0	100,2	100,2

Примітка: *у таблиці наведено середні значення визначення концентрації IgM при постановці ІФА у присутності інших білків у шести повторностях; p<0,05.*

Як свідчать дані табл. 3, жоден із досліджуваних білків сироватки не впливав на визначення тест-концентрації IgM людини. Таким чином, розроблений «сендвіч»-ІФА не виявляв перехресної реактивності з іншими білками сироватки.

ВИСНОВКИ

1. За результатами комплексної характеристики моноклональних антитіл до IgM людини було доведено, що антитіла епітопів A1-B2 та B1-A2 являють собою найбільш вірогідну «сендвіч»-комбінацію для конструювання неконкурентного імуноферментного аналізу. Сорбційно-детекційна здатність різних пар моноклональних антитіл корелює з їх афінністю. Найбільш виражені сорбційно-детекційні властивості мають високоафінні моноклональні антитіла 125B5 і 112H12.

2. Розроблений набір для кількісного визначення сумарних IgM-антитіл характеризувався чутливістю, яка на порядок перевищує методи нефелометрії та турбідіметрії (50 нг/мл). Динамічний діапазон розробленого імуноферментного аналізу склав 2 порядки (11-3200 нг/мл). Показники варіабельності — величини коефіцієнтів варіації в рамках однієї постановки (intra-CV = 4,8±2,0%) й між постановками (inter-CV = 5,3±2,2%) — є допустимими для даного методу. Жоден із досліджуваних білків сироватки (IgG, IgA, IgE людини, альбумін) не впливає на визначення тест-концентрації (100 нг/мл) IgM людини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 720 с.
2. Лолор Г. (младший), Фишер Т., Адельман Д. Клиническая иммунология и алергология. Пер. с англ. — М.: Практика, 2000. — 850 с.
3. Зупанец И.А., Мисюрева С.В., Прописнова В.В. Клиническая лабораторная диагностика: методы исследования. — Х.: НФаУ, 2005. — 240с.
4. Ткачук В.А. Клиническая биохимия. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — 268 с.
5. Кулаков А.В., Климова С.В., Ярилин Д.А. и др. Изучение аффинности естественных антител сыворотки крови человека к компоненту клеточной стенки бактерий — глюкозамилмурамилдипептиду, обладающей адъювантной активностью // Иммунология. — 1997. — №1. — С. 21-24.
6. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays // Lab. Techiques in Biochem. and Molecular Biology. — 1985. — №15. — 674 p.
7. Галкін О.Ю., Ніколаєнко І.В., Дуган О.М. Одержання та вивчення властивостей нових моноклональних антитіл до IgM людини // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. — 2009. — Вип.5 (92). — С. 105-118.
8. Галкін О.Ю., Дуган О.М. Порівняння схем імунізації мишей лінії Balb/c для одержання моноклональних антитіл до IgM людини // Імунологія та алергологія. — 2009. — №1. — С. 68-73.
9. Патент на корисну модель 26769 UA, МПК (2006) C12N5/00. Моноклональні антитіла 4G11 до вакцинного штаму вірусу поліомієліту другого типу P712CH2ab / І.В.Ніколаєнко, О.Ю.Галкін. — № u 2007 04447; Заявл. 23.04.2007; Опубл. 10.10.2007.

А.Ю.Галкин, А.М.Дуган. Разработка иммуноферментного набора для количественного определения общего IgM человека. Киев, Украина.

Ключевые слова: *IgM человека, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, количественное определение.*

На основе комплексной характеристики моноклональных антител к IgM человека разработан иммуноферментный набор для количественного определения суммарных IgM-антител с высокой аналитической чувствительностью. Динамический диапазон разработанного ИФА составляет 2 порядка (11-3200 нг/мл). Показатель вариабельности является допустимым для данного метода. Ни один из исследуемых белков сыворотки (IgG, IgA, IgE человека, альбумин) не влияет на определение тест-концентрации (100 нг/мл) IgM человека.

O.Yu.Galkin, O.M.Dugan. Development of immunoassay kit for quantitative determination of total human IgM. Kyiv, Ukraine.

Key words: *human IgM, monoclonal antibodies, ELISA, assay.*

Based on the complex characteristics of monoclonal antibodies to human IgM enzyme immunoassay kit for quantitative determination of total IgM-antibodies with high analytical sensitivity has been developed. Dynamic range of the developed ELISA is 2 orders (11-3200 ng/ml). Performance variability are valid for this method. None of the serum proteins (human IgG, IgA, IgE, albumin) has not affected the determination of test concentration (100 ng/ml) human IgM.

Надійшла до редакції 19.03.2011 р.