

Нуралиев Н.А., ²Рахманова С.С., ³Бектимиров А.М.-Т.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ БУФЕРНОЙ СРЕДЫ И ТВЕРДОФАЗНОГО НОСИТЕЛЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СОРБЦИЮ АНТИГЕНА В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

НИИ санитарии, гигиены и профзаболеваний МЗ РУз, ²Ургенчский филиал ТМА, ³НИИ ЭМИЗ МЗ РУз

Современное состояние клинической иммунологии позволяет определить иммунные механизмы формирования и развития многих патологических состояний. В этом большая заслуга иммунологических лабораторных методов исследования, среди которых особое место отводится иммуноферментному анализу (ИФА).

ИФА это метод качественного определения, а также количественного измерения антигенов в сыворотке крови [1]. Этот иммунологический метод был предложен в начале 70-х годов XX века Engvall и Perlmann в Швеции, van Weemen и Schuur в Нидерландах, Rubenstein с соавторами в США [2].

Сущность ИФА заключается в специфическом взаимодействии антитела и антигена с последующим присоединением к полученному комплексу конъюгата (энзиммеченых антивидовых иммуноглобулинов). Фермент вызывает разложение хромогенного субстрата с образованием окрашенного продукта, который выявляется визуально или фотометрически. Результат выражают в единицах оптической плотности [3].

Существует множество вариантов ИФА, из которых наибольшее практическое значение получил гетерогенный твердофазный ИФА (indirect ELISA). В настоящее время в качестве твердой фазы часто используют полистироловые 96 луночные планшеты [4, 5].

Фиксация антигена микроорганизма на лунки полистироловых планшетов зависит от многих факторов, в том числе от активной реакции (pH) буферной среды и свойств сорбционной поверхности носителя.

Целью настоящего исследования было оценка влияния физико-химических параметров буферной среды и твердофазного носителя на степень фиксации антигена к твердой фазе в эксперименте.

Материалы и методы. В ходе эксперимента нами были использованы бактериальные антигены, полученные из грамположительных кокков, грамотрицательных бактерий и дрожжеподобных грибов рода Кандида (таблица). Инаktivированные культуры микроорганизмов получены из «Национальной коллекции микроорганизмов

инфекций человека» НИИ ЭМИЗ МЗ РУз.

Бактериальные взвеси в концентрации 10^9 микробных тел/мл, инаktivировали прогреванием при $+80^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут. Этот режим температуры позволяет сохранить структуру белков, обеззаразить использованную нами бактериальную взвесь.

Антигены получали по Буавену - комплексный микробный антиген (Boivin A., Mesrobian I., 1935), путем экстракции гретой суточной культуры микроорганизмов трихлоруксусной кислотой. Данный подход относится к группе химических методов экстракции антигена.

Результаты учитывали спектрофотометрически при длине волны 492 нм на иммуноферментном планшетном анализаторе «Stat Fax-300» (США).

Результаты и обсуждение. Полученные ранее авторами [3] результаты показывают, что для нагущения антигенов применяют забуференный физиологический раствор (pH 7,2-7,5), натрий-карбонатный (0,05 моль/л, pH 9,0), боратный (0,05 моль/л, pH 8,0) и трис-HCl (0,05 моль/л, pH 8,0) буферные растворы. Значения pH и ионная сила этих буферных растворов могут варьировать. Продолжительность и условия проведения инкубации адсорбированного иммунного реагента с тестируемыми субстратами и с реагентами на разных этапах проведения ИФА подбирали экспериментально.

В эксперименте применяли буферные среды с различным значением pH (от 5,0 до 10,0). Условия сорбции при $+4^{\circ}\text{C}$ и $+37^{\circ}\text{C}$. Концентрация антигена от 0,5 до 20 мкг. По окончании фиксации микробного антигена буфер удаляли путем промывки 0,01M Na-фосфатным буфером с pH $7,3 \pm 0,1$ с 0,15M NaCl и 0,1% Твин-20.

В последующем полученные белковые антигены адсорбировались на выбранном нами твердофазном носителе интенсивнее при высоких значениях активной реакции (pH), когда их заряд отрицателен и максимален по величине. В то же время взаимодействия иммунных реагентов на следующих этапах постановки ИФА оптимальны при физиологических значениях pH. В ходе экспериментальных исследований нами установле-

Таблица. Культуры микроорганизмов, из которых получали комплексный микробный антиген в эксперименте

Штаммы	Морфология	Регистрационный номер	Источник выделения
Грамположительные кокки			
Staphylococcus aureus	Гр «+» кокки	003994/Wood-46	Гемокультура
Staphylococcus aureus	Гр «+» кокки	003702 /14-B	Биликультура
Staphylococcus epidermidis	Гр «+» кокки	003063 \306	Гной
Staphylococcus epidermidis	Гр «+» кокки	004145 /МЗ-87	Слизистая носа
Enterococcus faecalis	Гр «+» кокки	003460/«СВ»	Уринокультура
Грамотрицательные бактерии			
Klebsiella pneumoniae	Гр «-» палочки	000691/691	Копрокультура
Pseudomonas aeruginosa	Гр «-» палочки	003778/155	Копрокультура
Escherichia coli	Гр «-» палочки	002673/477	Копрокультура
Дрожжеподобные грибы рода Кандида			
Candida albicans	Друза	/7	Слизистая зева

но, что существенное снижение pH использованной буферной среды во время инкубации нагруженных антигеном тест-планшет с иммунными реагентами привело к его десорбции.

Известно [4], что используемый для создания тест-системы твердофазный носитель должен: обладать высокой связывающей способностью по отношению к иммобилизуемому реагенту; незначительно десорбировать реагент; иметь низкий уровень неспецифического связывания и обладать воспроизводимыми свойствами. Мы при проведении наших исследований для выбора твердофазного носителя для создания экспериментальной тест-системы также руководствовались этими критериями.

В зависимости от способа обработки поверхности, применяемые в настоящее время для пассивной адсорбции полистирольные носители подразделяются на 3 типа: тип X - зарядовый индекс 1, характеристика поверхности неполярная гидрофобная, связывание IgG среднее; тип Y - зарядовый индекс 12, характеристика поверхности полярная гидрофобная, связывание IgG эффективное; тип Z, зарядовый индекс 200, характеристика поверхности полярная гидрофильная, связывание IgG не эффективное.

В эксперименте проверены все три типа носителей. Из-за идентичных показателей типов

X и Y, мы приводим данные носителей только X и Z. Влияние pH среды на связывание антигенов с полистиролами X показаны на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1 сорбирующая способность полистирола X, имеющего гидрофобную поверхность, зависит от pH (оптимальный pH 7,0 -8,2) и ионной силы раствора.

Для твердого носителя типа Z оптимальные результаты в эксперименте были получены при использовании буферного раствора с низкой pH - 5,0 (рисунок 2).

Белковые бактериальные антигены адсорбировали при +4°C в течение 14 часов. После связывания иммунных комплексов на тест-планшете для предотвращения неспецифического связывания с фиксированным антигеном других иммун-

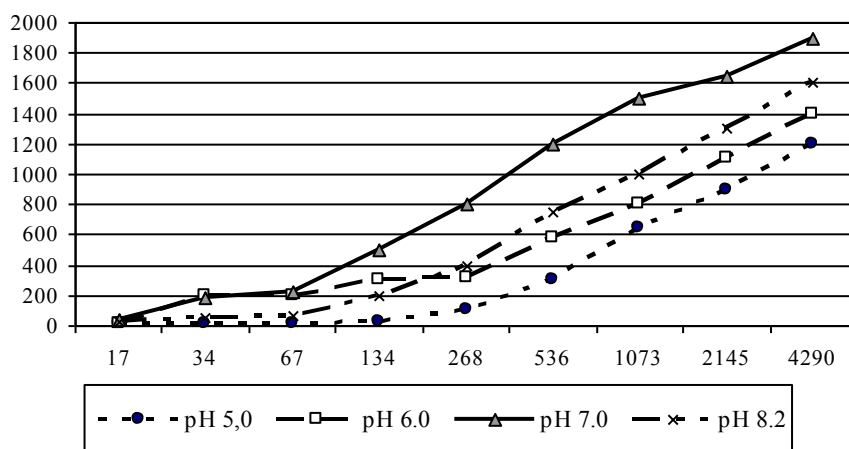


Рисунок 1. Влияние pH на связывание антител с полистиролом типа X

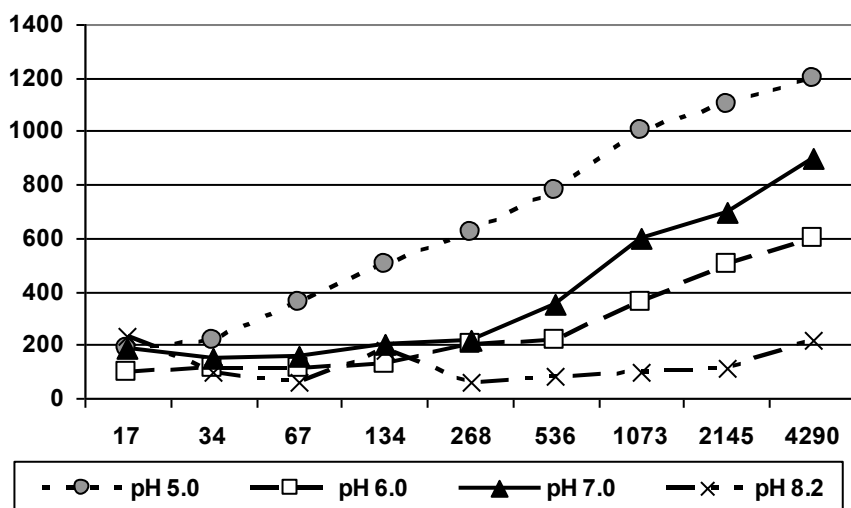


Рисунок 2. Влияние pH на связывание антител с полистиролом типа Z

ных реагентов на следующих этапах анализа проводили блокировку свободных мест на твердофазном носителе. Применяли различные белки и не ионные детергенты (1% раствор бычьего сывороточного альбумина, 0,5% раствора желатина, 5% раствор нормальной сыворотки, 0,05-0,5% растворы тритон X-100 и Твин-20).

Использованные блокирующие вещества и иммунные реагенты растворяли в том же буферном растворе, что и адсорбированный антиген. Полученные иммунные адсорбенты хранили продолжительное время (в течение 8 месяцев) при

+4⁰С (в холодильнике) без потери специфической активности иммунных реагентов. Их десорбцию предотвращали, внося блокирующий раствор, который содержит 0,02% азид натрия. Поскольку азид натрия является ингибитором пероксидазы хрена, использующиеся в тест-системах экспериментальные тест-планшеты перед инкубацией с иммунным реагентом, конъюгированным этим ферментом, отмывали буферным раствором для прекращения действия азид натрия.

Выводы. 1. Установлено, что при выборе твердофазного носителя и фиксации на нем антигена нужно учитывать pH бу-

ферных сред и свойства твердофазного носителя, которые непосредственно влияют на степень адсорбции нагружаемого антигена.

2. Оптимальные результаты по фиксации микробных антигенов в проведенном эксперименте были получены при использовании отрицательно заряженного полярного гидрофильного полистирола типа Z, при применении буферного раствора с низкой pH.

3. При использовании неполярного гидрофобного полистирола оптимальная pH установлена нами в пределах 7,0-8,2.

Использованная литература:

1. Егоров А.М., Осипов А.П. Теория и практика иммуноферментного анализа. - Москва, «Высшая школа», 1991. - 186 с.
2. Колосова А.Ю., Блинцов А.Н., Самсонова Ж.В., Егоров А.М. Разработка твердофазного иммуноферментного анализа гентамицина в сыворотке крови человека //Антибиотики и химиотерапия. - Москва, 1998. - №2. - С.9-13.
3. Павлов С.Б. Иммуноферментный анализ. Интерпретация результатов //Клиническая антибиотикотерапия. - Москва, 2000. - №1. - С.16-18.
4. Таранов А.Г. Диагностические тест-системы: радиоиммунный и иммуноферментный методы диагностики. - Новосибирск: Издательство НГУ, 2000. - 260 с.
5. Флуер Ф.С., Прохоров В.Я., Веснина А.Ф., Акатов А.К. Иммуноферментная тест-система для определения стафилококкового энтеротоксина типа С //Журнал микробиологии. - Москва, 2002. - №6. - С.65-68.