

1 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

1 – Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: stanyar@yandex.ru
Тел. 8 (499) 936 85 99

СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ БЕЗАППАРАТНОЙ ДИАГНОСТИКИ ДИНАМИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ (СООБЩЕНИЕ 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ)

Я.М. Станишевский^{1*}

Резюме. Рассмотрены теоретические аспекты создания диагностических тест-систем, функционирующих на микро-, и наноуровнях, для безаппаратной диагностики динамических макромолекулярных маркеров заболеваний. Обсуждены особенности иммобилизации биолигандов на поверхности полимерных микросфер при создании диагностических тест-систем, используемых в реакции латексной агглютинации (РЛА). Систематизированная информация об основных методах иммобилизации биолигандов на поверхности полимерных микросфер должна помочь при направленном выборе способа конструирования высокочувствительных тест-систем для конкретной диагностической задачи.

Ключевые слова: диагностика, тест-системы, биолиганд, полимерные микросферы, макромолекулярный маркер, иммобилизация, реакция латексной агглютинации.

CREATING TEST-SYSTEM FOR DIAGNOSTIC DYNAMIC MACROMOLECULAR MARKERS (MESSAGE 1. THEORETICAL ASPECTS)

Ya.M. Stanishevskiy^{1*}

Abstract. The theoretical aspects of the creation of diagnostic test-systems operating at the micro-, and nanoscale for diagnostics of dynamic macromolecular disease markers. The characteristic features of the surface immobilization bioligands polymeric microspheres to create diagnostic test-systems used in the reaction of latex agglutination (RLA). Systematic information about the basic methods of immobilization bioligands the surface of polymer microspheres should help in selecting a method for designing directional highly sensitive test-systems for specific diagnostic tasks.

Keywords: diagnostic test-systems, bioligands, polymeric microspheres, macromolecular marker, immobilization, latex agglutination reaction.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальной задачей отечественного здравоохранения и ветеринарии является экспресс-диагностика заболеваний различной этиологии. Своевременный и правильно поставленный диагноз позволяет четко оценить ситуацию и выбрать систему адекватных оздоровительных мероприятий. Именно поэтому необходима и оправданна разработка недорогих, не требующих стационарного оборудования (безаппаратная диагностика) тест-систем и применение их в экспресс-диагностике обнаружения, количественной оценки динамических макромолекулярных маркеров заболеваний.

В медицинской и ветеринарной практике широко используют различные диагностические методы анализа: двойная радиальная иммунодиффузия [1], иммуноэлектрофорез [2], радиоиммунологический анализ (РИА) [3], иммуноферментный анализ (ИФА) [4], иммунохроматографический анализ (ИХА) [5] и т.д. Однако эти методы

обладают рядом недостатков, а именно: отсутствием необходимой чувствительности и специфичности; воспроизводимости от партии к партии; быстроты и простоты постановки реакции; стабильности при конструировании и хранении препаратов; долговременной пригодности и т.д., что не в полной мере отвечает современным задачам клинико-диагностических лабораторий.

Значительные преимущества перед уже известными методами появились с началом применения полимерных частиц, которые используются в качестве носителей биолигандов (антител, антигенов) при создании диагностических тест-систем для реакции латексной агглютинации (РЛА) [6–8].

Относительная дешевизна анализа, высокая чувствительность, специфичность и воспроизводимость метода РЛА, простота и возможность постановки теста практически в любых условиях делают подобные диагностические тест-системы на основе полимерных частиц очень удобными, что

позволяет проводить более качественную диагностику обнаружения макромолекулярных маркеров заболеваний как при одиночных, так и при скрининговых исследованиях.

Несмотря на большое количество предлагаемых способов получения диагностических тест-систем на основе полимерных частиц – носителей биополимеров, они не лишены недостатков, что во многом связано с недостаточной научной проработкой теории и технологии конструирования высокочувствительных тест-систем. Остаются недостаточно проработанными такие задачи, как выбор полимерных частиц с оптимальными физико-химическими параметрами, пригодными для использования в качестве носителей биополимеров, выбор биополимеров и их целенаправленная иммобилизация на поверхности полимерных частиц, обеспечивающих высокую активность выявления макромолекулярных маркеров заболеваний, выбор условий и параметров конструирования тест-систем с использованием полимерных частиц и биополимеров и ряд других проблем.

Все это делает работы в этом направлении важными и актуальными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание тест-систем методом физической адсорбции биополимеров на поверхности полимерных микросфер

В литературе содержится большое количество публикаций, касающихся исследования физической адсорбции биополимеров [альбумина, иммуноглобулина G (IgG)] на поверхности полимерных микросфер, и создания на их основе диагностических тест-систем, используемых в РЛА [9–17].

При конструировании диагностических тест-систем до сих пор остается важным изучение влияния различных факторов (ионной силы, температуры, pH) на процесс физической адсорбции биополимеров на поверхности полимерных микросфер различной природы, которые определяют основные свойства диагностических тест-систем.

Влияние pH среды на количество адсорбированного биополимера на поверхности полимерных микросфер подробно изучено и описано в работах [9, 13, 14]. В качестве специфического биополимера использовали человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), а полимерного носителя – полистирольные микросферы. Значения pH изменяли в интервале 4,0–7,7, используя ацетат-уксуснокислый буфер (pH=4,0; 5,0) и фосфатный буфер (pH=5,8; 6,8; 7,7; 9,0). Изоэлектрическая точка ЧСА составляет pH=4,7. Было установлено, что максимальная адсорбция молекул ЧСА на поверхность полистирольных микросфер наблюдается при pH среды 5,0, минимальная – при pH 7,7. Для максимальной плотности упаковки белка на поверхности полимер-

ных микросфер необходимо проводить адсорбцию белка при значениях pH среды, лежащих вблизи изоэлектрической точки ЧСА. По мере удаления от изоэлектрической точки ЧСА (при смещении pH среды в щелочную область) количество белка, адсорбированного на поверхности полистирольных микросфер, уменьшается, а адсорбция ЧСА на поверхность полистирольных микросфер при pH среды 4,0 приводит к потере агрегативной устойчивости системы. Со смещением pH среды в щелочную область уменьшается и сродство между молекулами ЧСА и полистирольной поверхностью микросфер.

На физическую адсорбцию белков существенное влияние оказывает и величина ионной силы раствора [16]. Так, при адсорбции ЧСА в диапазоне pH от 3,0 до 11 было изучено влияние ионной силы среды, которую меняли в диапазоне значений от 0,001 М до 0,3 М. В кислой области (pH < 4,7) ниже изоэлектрической точки ЧСА количество адсорбированного белка на поверхности полистирольных микросфер увеличивается с повышением ионной силы раствора. В щелочной области (pH > 7) с увеличением ионной силы раствора с 0,001 М до 0,1 М наблюдалось уменьшение адсорбированного белка на поверхности полимерных микросфер с 2 до 0,3 мг/м². Высокая ионная сила (> 0,1) не препятствовала процессу физической адсорбции ЧСА на поверхности полистирольных микросфер, однако повышение ионной силы раствора способствовало протеканию спонтанной агрегации полистирольных микросфер. Максимальная адсорбция ЧСА (3 мг/м²) и отсутствие спонтанной агрегации частиц полистирольной суспензии наблюдалось при низких значениях ионной силы раствора 0,001 при pH=4,7.

Влияние условий адсорбции ЧСА на поверхности полистирольных микросфер на чувствительность получаемых тест-систем оценивали методом РЛА. В качестве детектируемого компонента были выбраны антитела к ЧСА, содержащиеся в моноспецифической сыворотке. При значениях pH 5,8; 6,8 и 7,7 с увеличением концентрации ЧСА в растворе с 0,3 до 3 мг/мл происходит снижение чувствительности РЛА с 1:4096 до 1:256. Показано также, что увеличение pH среды, т.е. смещение pH в щелочную область (> 7,7), приводит к снижению чувствительности РЛА с 1:4096 до 1:4. Наибольшую чувствительность РЛА 1:4096 удалось получить при величинах адсорбции ЧСА на поверхности полистирольных микросфер, не достигших своего предельного значения и составляющих 0,3–0,5 мг/мл. Выбор pH среды для проведения адсорбции ЧСА и постановке РЛА также определяется максимальной чувствительностью тест-систем, которая достигается при pH среды 5,8 и ионной силе раствора 0,01 М. В этом случае молекулы ЧСА имеют небольшой отрицательный заряд, который достаточен для стабилизации частиц и не препятствует проведению реакции РЛА.

Кроме ионной силы среды и pH, существенное влияние на чувствительность РЛА оказывает темпера-

тура, при которой проводят физическую адсорбцию биологандов. На примере адсорбции иммуноглобулина G (IgG) [18–20 °C (инкубация 24 ч), 37 °C (инкубация 60 мин) и 60 °C (инкубация 15 мин)] на поверхности полимерных микросфер [9,17] было показано, что при температуре 60 °C тест-системы эффективно выявляли С-реактивный белок (СРБ) и миоглобулин в диапазоне концентраций 5–750 мкг/мл и 100–20000 мкг/мл соответственно.

Влияние природы полимерных микросфер было показано при изучении адсорбции ЧСА на поверхности полимерных микросфер, полученных сополимеризацией стирола (СТ) с метакриловой кислотой (МАК), концентрация которой различалась в 10 раз (2,0; 0,2% масс в расчете на стирол) [9]. Поверхностный слой микросфер суспензий, полученных при разной концентрации МАК в исходной эмульсии, различается концентрацией поверхностно-связанных карбоксильных групп, а следовательно, зарядом и устойчивостью микросфер. С увеличением в поверхностном слое частиц количества полимерных цепей, содержащих звенья МАК, т.е. с повышением отрицательного заряда поверхности возрастают силы электростатического отталкивания между полимерными микросферами и молекулами ЧСА. Максимальное количество ЧСА адсорбируется на поверхности полимерных микросфер при pH среды, равном 4,0. Адсорбцию ЧСА на поверхности сополимерных микросфер исследовали при ионной силе среды 0,05 М и при значениях pH: 4,0; 6,0; 7,0; 8,0. Было показано, что характер кривых адсорбции ЧСА на поверхности сополимерных микросфер СТ/МАК_{0,2} и СТ/МАК_{2,0} при pH среды 4,0; 6,0; 7,0; 8,0 практически одинаков, различаются эти кривые лишь наклоном и величиной максимальной адсорбции.

Важную роль при создании тест-систем играет и концентрация специфических биологандов, физически адсорбированных на поверхности полимерных микросфер [9]. Показано, что при адсорбции человеческого IgG низкой концентрации (< 3 мг/мл) на поверхности полистирольных микросфер происходит спонтанная агрегация полимерных микросфер, содержащих IgG, что, по-видимому, связано с недостаточной насыщенностью гидрофобной поверхности полистирольных микросфер молекулами IgG. Для обеспечения агрегативной устойчивости полимерных микросфер, содержащих на поверхности IgG низкой концентрации, дополнительно проводили адсорбцию альбумина или смещали pH среды в щелочную область, приводящую к значительному возрастанию заряда иммобилизованных IgG, содержащихся на поверхности полимерных микросфер, тем самым сохраняя устойчивость системы.

Существенное влияние на чувствительность РЛА оказывает и количество активных центров (детерминант), находящихся на поверхности биологандов, адсорбированных на поверхности полимерных микросфер [18]. При физической адсорбции биологандов

[иммуноглобулина M (IgM) и Fab-фрагмента иммуноглобулина G (IgG)] на поверхности полистирольных микросфер было показано, что количество адсорбированных Fab-фрагментов IgG превышает в четыре раза количество иммуноглобулинов IgM на поверхности полимерных частиц. Несмотря на это, общее количество активных центров связывания с антигеном было выше на поверхности полимерных микросфер, содержащих IgM, благодаря тому, что молекула IgM имеет в своей структуре пять активных центров (Fab-фрагментов). Однако чувствительность РЛА диагностической тест-системы с физически адсорбированными Fab-фрагментами на поверхности полистирольных микросфер оказалась намного выше (>1:1000) в сравнении с тест-системой с адсорбированными моноклональными IgM на поверхности полистирольных микросфер (1:10–1:500). Это свидетельствует о том, что немаловажное влияние на чувствительность РЛА оказывает количество активных центров (Fab-фрагментов), содержащихся на поверхности полистирольных микросфер, способных связываться с антигеном.

Негативный эффект на чувствительность и специфичность тест-систем оказывает присутствие в исследуемой биологической среде поверхностно-активных веществ [9]. Так, было показано, что при адсорбции IgG из цельной сыворотки на поверхности полистирольных микросфер в первую очередь адсорбируются более поверхностно активные белки, такие как β-липопротеиды, содержащиеся в сыворотке. Было высказано предположение также о том, что большой размер молекулы β-липопротеида, возможно, приводит к экранизации адсорбированных IgG на поверхности полимерных микросфер и тем самым предотвращает их взаимодействие с дифтерийным анатоксином. Поэтому при конструировании диагностических тест-систем для выявления дифтерийного анатоксина на поверхности полимерных микросфер была иммобилизована не цельная сыворотка, а выделенная из сыворотки с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) γ-глобулиновая фракция, содержащая IgG. В этом случае иммунохимическая реакция РЛА с использованием диагностической тест-системы составила 1:8192, что говорит о ее высокой чувствительности при выявлении дифтерийного анатоксина [9].

К негативным факторам, которые влияют на чувствительность и специфичность диагностических тест-систем, относится и десорбция специфических биологандов с поверхности полимерных микросфер. Так, при небольшом изменении условий (pH и ионной силы среды, температуры и т.п.) с поверхности полимерных микросфер происходила десорбция биологандов в водную фазу, что приводило к снижению чувствительности тестов и неспецифическим реакциям с другими биообъектами, содержащимися в сыворотке крови [19, 20].

Таким образом, при иммобилизации специфических биолигандов на поверхности полимерных микросфер путем физической адсорбции и создании на их основе диагностических тест-систем необходимо учитывать следующее:

- сродство между молекулами специфического биолиганда и поверхностью полимерных микросфер существенно зависит от ионной силы, температуры и pH;
- молекулы биолиганда характеризуются высокой адсорбционной способностью к поверхности гидрофобных полимерных микросфер;
- концентрация биолигандов на поверхности полимерных микросфер и количество их активных центров (детерминант) существенно влияет на чувствительность диагностических тест-систем;
- наличие поверхностно-активных веществ в исходном адсорбционном материале негативно сказывается на чувствительности и специфичности диагностических тест-систем.

Способы получения диагностических тест-систем с использованием полимерных микросфер с физически адсорбированными на их поверхности биолигандами «легко» осуществимы. Однако ряд серьезных недостатков, среди которых следует выделить возможную десорбцию биолиганда с поверхности полимерных микросфер, обуславливают невысокую диагностическую эффективность тест-систем, недостаточное время их хранения, а также невозможность результатов анализа со временем.

Свободными от указанных недостатков оказались полимерные суспензии с функциональными группами на поверхности полимерных микросфер, которые способны к ковалентному связыванию с функциональными группами биолигандов, образуя при этом прочную ковалентную связь.

Создание тест-систем методом ковалентного связывания функциональных групп биолигандов и полимерных микросфер

Частицы полимерных суспензий, которые применяются при создании диагностических тест-систем, на поверхности должны содержать функциональные группы, способные ковалентно связываться с функциональными группами биолигандов [21–40].

К функциональным группам, способным непосредственно реагировать с амино-, карбоксильными или сульфгидрильными группами биолигандов, относятся хлорметильные [21–25], хлорсульфоновые [22], альдегидные [26–28], эпоксидные [29] и сульфгидрильные [30] группы (рисунок 1).

Такие группы, как карбоксильные [31,32], гидроксильные [33], аминные [34], амидные [34–38], гликоле-

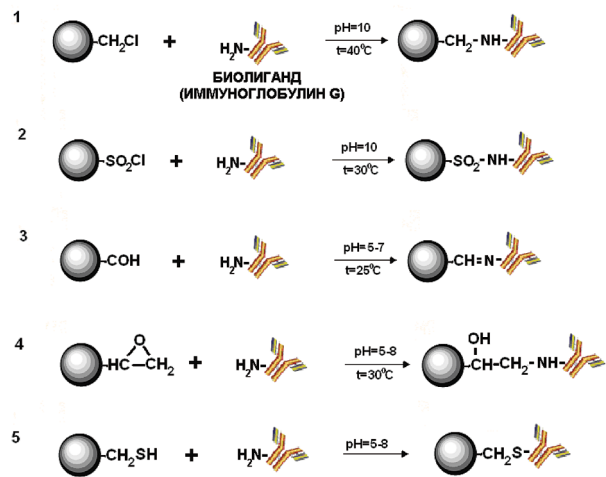


Рисунок 1. Полимерные микросферы, содержащие на поверхности функциональные группы, способные непосредственно взаимодействовать с функциональными группами биолиганда [иммуноглобулин G (IgG)]

вые [38], могут взаимодействовать с функциональными группами биолигандов только после относительно простой реакции их активации.

Карбоксильные группы полимера взаимодействуют с аминогруппами биолиганда после реакции активации с водорастворимым карбодиимидом (ВРК) [39] (рисунок 2).

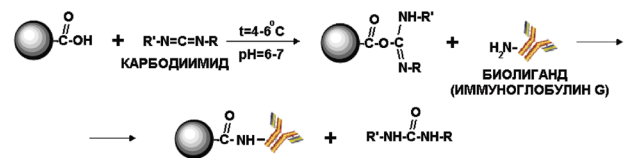


Рисунок 2. Взаимодействие карбоксильных групп полимерных микросфер с аминогруппами биолиганда [иммуноглобулин G (IgG)] после реакции активации с водорастворимым карбодиимидом

Часто используемые ВРК: 1-циклогексил-3(2-морфолиноэтил)карбодиимид толуолсульфонат и 1-этил3(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид.

Наиболее распространенным методом активации гидроксильных групп полимера является цианоген-бромидный метод [40] (рисунок 3). При обработке гидроксильных групп бромцианом в щелочной среде pH=10 возникают реакционноспособные цианаты и имидокарбонаты, способные вступать в реакции с аминогруппами биолиганда:

Методы активации функциональных групп, содержащихся на поверхности частиц полимерной суспензии, должны удовлетворять следующим требованиям:

- проходить необратимо и количественно при возможно более мягких условиях;

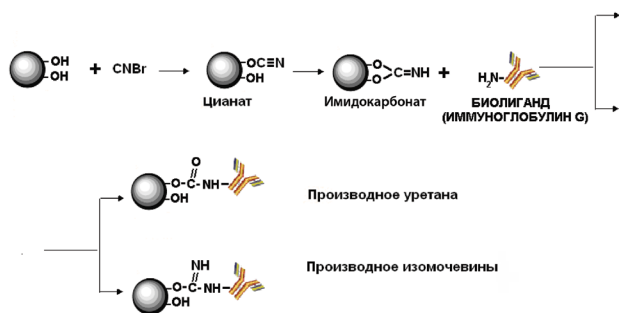


Рисунок 3. Взаимодействие гидроксильных групп полимерных микросфер с аминогруппами биолиганда [иммуноглобулин G (IgG)] после реакции активации бромистым цианом

- не уменьшать стабильность суспензий, не оказывать заметного влияния на диаметр микросфер и распределение частиц по размерам (РЧР);
- сохранять биохимическую активность молекул биолиганда после процесса ковалентного связывания с функциональными группами полимера.

Влияние природы функциональных групп на чувствительность РЛА тест-систем изучено и описано в работах [41, 42]. В качестве биолиганда использовали антиген *Yersinia enterocolitica* серотипов 03 и 09 (иерсиниоз), аминогруппы которого ковалентно связывали с эпоксидными или альдегидными группами (концентрация которых изменялась в интервале значений $6,7\text{--}40 \cdot 10^{-3}$ моль/г полимера), содержащимися на поверхности полимерных микросфер. Показано, что чувствительность РЛА при выявлении антител к *Y. enterocolitica* была выше при использовании тест-систем, содержащих эпоксидные группы на поверхности полимерных микросфер.

На чувствительность РЛА существенное влияние оказывает и концентрация функциональных групп, содержащихся на поверхности полимерных микросфер [41]. При ковалентном связывании функциональных групп антигена – паприна было изучено влияние концентрации аминогрупп, содержащихся на поверхности полимерных микросфер (концентрацию изменяли от $2,4 \cdot 10^{-3}$ до $300 \cdot 10^{-3}$ моль/г полимера), на чувствительность РЛА [41]. В ходе исследований было показано, что при увеличении концентрации аминогрупп с $10,4 \cdot 10^{-3}$ до $100 \cdot 10^{-3}$ моль/г полимера чувствительность реакции РЛА возрастала с 1:256 до 1:1024. При концентрации аминогрупп выше $100 \cdot 10^{-3}$ моль/г полимера чувствительность РЛА не менялась и составляла 1:1024. Снижение концентрации аминогрупп ниже $10,4 \cdot 10^{-3}$ моль/г полимера негативно влияло на чувствительность РЛА.

Путем варьирования концентрации функциональных групп на поверхности частиц возможно контролировать концентрацию биолигандов, иммобилизованных на поверхности частиц, что особенно важно при создании диагностических тест-систем с высокой чувствительностью РЛА.

Так, при использовании в качестве специфических биолигандов антигенов клеточных стенок грибов р. *Candida*, концентрацию которых меняли в интервале от 0,01 до 0,25 мг/мл при постоянной концентрации аминогрупп, равной $100 \cdot 10^{-3}$ моль/г полимера, содержащихся на поверхности полимерных микросфер, было показано, что максимальная чувствительность РЛА (1:1024) наблюдается при использовании антигенов клеточных стенок грибов р. *Candida* при концентрации 0,05 мг/мл [41]. Уменьшение концентрации антигенов приводило к ухудшению контроля РЛА, а увеличение концентрации антигенов – к снижению диагностической эффективности тест-систем (титр РЛА снижался до 1:32).

Кроме концентрации биолигандов, существенное влияние на чувствительность РЛА оказывает температура и сродство (аффинитет) биолиганда к детектируемому компоненту. На примере иммобилизации IgG на поверхности полимерных микросфер при различных температурных режимах 18–20 °C и 56 °C [9] было показано, что при температуре 56 °C тест-системы максимально (титр РЛА – 1:512) выявляли иммуноглобулины класса М [ревматоидный-фактор (RF)]. При высокой температуре иммобилизации происходит модификация Fc-фрагмента молекулы IgG, которая влияет на аффинитет IgG к иммуноглобулину класса М, повышая чувствительность РЛА с 1:64 до 1:512. Было показано, что повышение чувствительности РЛА связано исключительно с повышением аффинитета модифицированных Fc-фрагментов IgG до и после процесса иммобилизации IgG на поверхности полимерных микросфер.

При ковалентном связывании функциональных групп биолигандов и полимерных микросфер при создании диагностических тест-систем необходимо учитывать:

- природу и концентрацию функциональных групп, содержащихся на поверхности полимерных микросфер;
- концентрацию биолигандов, содержащихся на поверхности полимерных микросфер, и аффинитет биолигандов к детектируемому компоненту.

Следует отметить, что важным фактором, влияющим на чувствительность РЛА, является сохранение доступности активных центров (детерминант) биолигандов после проведения процесса иммобилизации биолиганда на поверхности полимерных микросфер. Для сохранения реакционной способности специфических биолигандов предпочтительно использовать полимерные микросферы, содержащие на поверхности молекулы спейсера, которые позволяют увеличить расстояние между биолигандом и полимерной поверхностью, тем самым сохранить нативную конформацию биолиганда, а следовательно, его иммунологическую активность.

Создание тест-систем методом иммобилизации биолигандов на поверхности полимерных микросфер, используя спейсер

Молекула, выполняющая роль спейсера – «мостика», должна иметь небольшие размеры и после присоединения к функциональным группам полимерной микросферы сохранять ещё одну функциональную группу, способную вступить в реакцию с функциональными группами биолиганда.

В качестве такой спейсерной молекулы могут выступать соединения различной природы: 1-6-диаминогексан, ε-аминокапроновая кислота, глутаровый альдегид и др.

В работах [39, 43–46] подробно рассмотрено ковалентное связывание аминогрупп иммуноглобулина G (IgG) и карбоксильных групп полимерных микросфер с использованием спейсера 1-6-диаминогексана. В этом случае проводят реакцию активации карбоксильных групп полимерных микросфер карбодиимидом при температуре 4–6 °С и pH=6-7 в течение 2–4 часов при отсутствии или в присутствии инертного буфера, например N-2-гидроксиэтил пиперазин-N-этансульфоновой кислоты.

Затем к активированным карбоксильным группам полимерных микросфер присоединяют аминогруппу спейсера 1-6-диаминогексана.

К преимуществам данного способа активации карбоксильных групп (карбодиимидный метод) следует отнести его простоту. Однако вследствие того, что спейсерная молекула 1-6-диаминогексана содержит две аминогруппы, а молекула биолиганда содержит как карбоксильные, так и аминогруппы, возможно протекание меж- и внутримолекулярного сшивания, что снижает активность биолиганда при выявлении детектируемого компонента в РЛА [47–49].

Ковалентное связывание аминогрупп иммуноглобулина G (IgG) и аминогрупп полимерных микросфер с использованием спейсера глутарового альдегида подробно рассмотрено в работах [50,51] (рисунок 4). Спейсерная молекула глутарового альдегида содержит на концах цепи две альдегидные группы. Эти группы при нейтральных значениях pH реагируют со свободными аминогруппами. Таким образом, один конец молекулы глутаральдегида может быть присоединен к аминогруппам частицы полимера, а другой – к аминогруппам биолиганда (IgG).

Образующееся в результате взаимодействия амино- и альдегидной групп основание Шиффа восстанавливают боргидридом натрия BH_4Na (температура 25 °С, 30 мин) (рисунок 5).

Введение в систему спейсерных молекул позволяет не только увеличить расстояние между молекулой биолиганда и полимерной поверхностью, тем самым

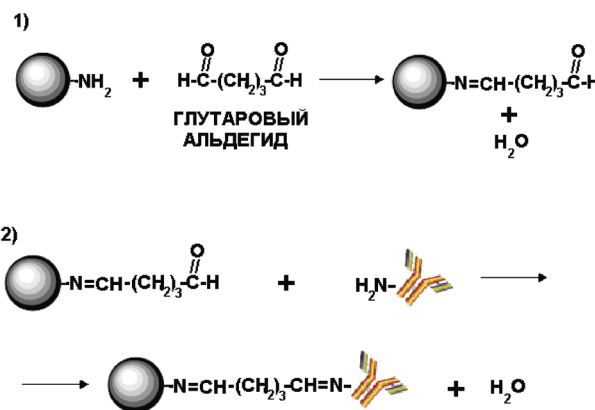


Рисунок 4. Ковалентное связывание аминогрупп иммуноглобулина G (IgG) и аминогрупп полимерных микросфер с использованием спейсера глутарового альдегида

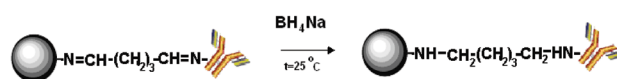


Рисунок 5. Восстановление боргидридом натрия основания Шиффа, образующегося в результате взаимодействия амино- и альдегидных групп.

увеличивая вариабельность биомолекулы, но и определенным образом обеспечить доступность активных центров (детерминант) биолиганда для аффинного связывания с детектируемым компонентом, как показано в работе [52–54].

В качестве специфического биолиганда использовали молекулу иммуноглобулина G (IgG), а в качестве спейсеров – молекулы стрептавидина (авидина) и биотина. Способность к комплементарному взаимодействию стрептавидина и биотина легло в основу создания спейсерного «мостика» между биолигандом и полимерной микросферой при создании диагностических тест-систем для выявления антигена – сердечного тропонина I [52].

Изначально на поверхности полистирольных микросфер физически адсорбировали молекулу стрептавидина или авидина. К молекуле IgG присоединяли биотин с образованием конъюгативных комплексов «биотин-биолиганд»:

Затем к полимерным микросферам, содержащим на поверхности стрептавидин, фиксировали конъюгат «биотин – биолиганд» за счет аффинного сродства молекулы биотина и стрептавидина [53, 54]. Посредством спейсерного присоединения были получены высокочувствительные диагностические тест-системы для выявления сердечного тропонина.

В таблице 1 представлены основные полимерные суспензии и методы иммобилизации биолигандов на поверхности полимерных частиц при создании диагностических тест-систем для РЛА [55].

Таблица 1.

Полимерные суспензии и методы иммобилизации биолигандов на поверхности полимерных частиц при создании диагностических тест-систем для РЛА

Полимерная суспензия	Диаметр частиц, мкм	Тип связывания лиганда с полимерными микросферами (иммобилизация)	Диагностические тест-системы, созданные на их основе
Полистирольная суспензия	0,5	1) Адсорбция рекомбинантным оболочечным антигеном Cbre HIV; 2) адсорбция антигенами Toxoplasma gondii.	Для скрининга специфических к нему антител в сыворотках крови. Для выявления специфических антител в сыворотках крови.
Полистиролметакриловая суспензия	0,7	Ковалентная иммобилизация: 1) тиреоглобулина (TgG) человека; 2) антител к АФП; 3) иммуноглобулина G (IgG) человека, Fc-фрагмент которого модифицирован прогреванием; 4) антител к АМГФ и ТБГ.	Для диагностики ревматоидных заболеваний, заболеваний щитовидной железы, ранней стадии беременности. Для определения альфа-фетопротеина (АФП) в сыворотке крови больных первичным раком печени. Для выявления RF-фактора. Для определения альфа-микроглобулина фертильности (АМГФ) и трофобластического β-глобулина (ТБГ) в сыворотке крови.
Полистирольная суспензия с эпоксидными группами на поверхности полимерных микросфер	0,6-0,8	Ковалентная иммобилизация противостафилококковых антител.	Для выявления S. aureus и его антигенов в биосубстратах больных гнойно-воспалительными заболеваниями.
Полистирольные суспензии с эпоксидными и альдегидными группами на поверхности частиц	1-3	Ковалентная иммобилизация: 1) антигенов Y. enterocolitica, сероварианты 03 и 09; 2) липополисахаридный бруцеллезный антиген; 3) фракция MB-50 дифтерийный анатоксин.	Тест-системы на: иерсиниоз; бруцеллез; дифтерит.
Полиакролеиновая суспензия (окрашенная флуоресцентным красителем)	1,5	Ковалентная иммобилизация: 1) моноклональными антителами против 2,4-D; 2) стрептавидином.	Для полуколичественного определения гаптена (2,4-дихлор-феноксиуксусная кислота). Детекция ДНК-фага λ в дот-анализе.
Полиакролеиновая суспензия (окр. малахитовым зеленым)	1,5	Ковалентная иммобилизация антигенов вируса кори гамма Л-16	Для определения противокоревых антител в сыворотке крови.
Меламинформ-альдегидная суспензия	0,6	Адсорбция искусственных антигенных детерминант белков ВИЧ в воде синтетических пептидов	Для определения антител, вызываемых ВИЧ.
Поли(изопрен-состирольная) суспензия, модифицированная цистеином	1,2	Сорбция биолиганда (поверхностного антигена клеточных стенок грибов р. Candida)	Для определения паприна
Поли(изопрен-состирольная) суспензия, модифицированная серосодержащими аминокислотами	1,2		Для иммуногистохимических исследований, в частности, маркеров клеточной поверхности лимфоцитов крови больных с диагнозом СПИД.
Полистирольная суспензия, полученная при отсутствии ПАВ и в присутствии полидиметил-силоксана (ПДС), а также полистирол-метакриловая суспензия	0,3-0,6	На полистирольную суспензию белок (конъюгат IgG-фракции, выделенной из антисыворотки к CRP) адсорбировали физически, а с использованием частиц полистирол-метакриловой суспензии проводили ковалентное связывание белка.	Для определения С-реактивного белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание диагностических тест-систем, функционирующих на микро- и наноуровнях, для безаппаратной диагностики [реакция латексной агглютинации РЛА] требует от авторов научно обоснованного подхода к технологии их получения, позволяющего обеспечить определенное распределение полимерных частиц по размерам и составу с заданным комплексом свойств, а также целенаправленных способов иммобилизации биолигандов на поверхности полимера, что является необходимым условием для разработки высокочувствительных тест-систем для экспресс-детекции динамических макромолекулярных маркеров и их промышленного производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Тертон, Д.Р. Бангхем, К.А. Колкотт. Новые методы иммуноанализа. – М.: Мир, 1991. 116 с.
2. Г. Фримель. Иммунологические методы. – М.: Медицина, 1987. С. 89–96.
3. R.S. Yalow. Radioimmunoassay // *Annu Rev. Biophys. Bioeng.* 1980. V. 9. P. 327.
4. А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: Высшая школа. 1991.
5. R. Wennig, M.R. Moeller, J.M. Haguenoer et al. Development and evaluation of immunochromatographic rapid tests for screening of cannabinoids, cocaine, and opiates in urine // *J. Anal. Toxicol.* 1998. V. 22. P. 148–155.
6. В.А. Быков, И.А. Грицкова, Н.И. Прокопов, Я.М. Станишевский. Полимерные микросферы в диагностике: Учебное пособие. – М.: 2004.
7. Я.М. Станишевский, И.А. Грицкова. Диагностические тест-системы: монография // Германия. 2013. 207 с.
8. L.J. Lucas, J.-H. Han, J. Chesler, J.-Y. Yoon. Latex immunoagglutination assay for a vasculitis marker in a microfluidic device using static light scattering detection // *Biosensors and Bioelectronics.* 2007. V. 22. P. 2216–2222.
9. Л.Ю. Басырева. Создание диагностических тест-систем на основе полимерных суспензий и факторы, определяющие их чувствительность и специфичность: дисс. ... канд. хим. наук. – М.: 1994.
10. H.A. Tsai, C.H. Chen, W.C. Lee. Influence of Surface Hydrophobic Groups on the Adsorption of Proteins Onto Nonporous Polymeric Particles with Immobilized Metal-Ions // *J. Colloid and Interfaces Sci.* 2001. V. 240(2). P. 379–383.
11. E.B. Zhulina, A.V. Dobrynin, M. Rubinstein. Adsorption-Isotherms of Polyampholytes at Charged Spherical-Particles // *J. Phys. Chem. B.* 2001. V. 105(37). P. 8917–8930.
12. B.D. Fair, A.M. Jamieson. Studies protein adsorption on polystyrene latex surfaces // *J. Colloid and Interfaces Sci.* 1980. V. 77. № 2. P. 525–534.
13. И.А. Грицкова, П.В. Нусс, Е.А. Дорохова, С.А. Гусев, И.Г. Крашенинникова, Д.И. Аль-Хаварин. Адсорбция белков на полистирольных микросферах и постановка реакции латекс-агглютинации // *Коллоидный журнал.* 1994. Т. 56. № 4. С. 491–495.
14. И.А. Грицкова, И.Г. Крашенинникова, Е.А. Дорохова, П.В. Нусс, С.А. Гусев, Д.И. Аль-Хаварин. Адсорбция белков на поверхности частиц полистирол-метакрилатных суспензий // *Коллоидный журнал.* 1994. Т. 56. № 4. С. 487–490.
15. В.Н. Измайлова, Г.П. Ямпольская, Б.Д. Сумм. Поверхностные явления в белковых системах. – М.: Химия. 1988.
16. T. Suzawa, H. Shirahama. Adsorption of plasma proteins onto polymer latices // *Advances in Colloid and Interface Science.* 1991. V. 35. P. 139–172.
17. В.К. Гаспарян. Полистирольные латексы в реакции агглютинации, приготовление и сенсibilизация // *Клиническая лабораторная диагностика.* 2001. № 1. С. 43–45.
18. H. Nakanishi, T. Ohmori, T. Akutsu, K. Sakurada. Preparation of latex reagents combined with IgM and its F(ab')₂ fragment from commercial ABO blood grouping reagent // *J. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2007. V. 54. P. 114–117.
19. N. de Baillcu, J. Voegel, A. Sohmitt. Adsorption of human albumin and fibrinogen onto heparin-like materials: 1. Adsorption isotherms // *Colloids and Surfaces.* 1985. V. 16. P. 271–288.
20. W. Norde, J. Fraaye, J. Lyklema. Protein adsorption at solid-liquid interfact: a colloid-chemical approach // *AGC Symposium Series.* 1987. № 343. P. 36–47.
21. S. Margel, E. Nov, I. Fisher. Polychloromethylstyrene Microspheres – Synthesis and Characterization // *J. Polym.Sci., Polym.Chem.Ed.* 1991. V. 29(3). P. 347–355.
22. M. Shahar, H. Meshylam, S. Margel. Synthesis and characteristics of microspheres of polystyrene derivatives // *J. of Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* 1986. V. 24. P. 203–213.
23. D.A. Upson. Reactive functional latex polymers // *J. of Polym. Sci., Polym. Symposium.* 1985. № 72. P. 45–54.
24. C.H. Suen, H. Moravetz. Reactive latex studies. I. Kinetics of reactions of poly(vinilbenzyl chloride) latex with water-soluble dyes // *Macromol.* 1984. № 17. P. 1800–1803.
25. M. Okubo, K. Ikegami, Y. Yamamoto. Preparation of micron-size monodisperse polymer microspheres

- having chloromethyl group // *Coll. Polym. Sci.* 1989. V.267 P.193–200.
26. Y. Changhong, X. Zhang, Z. Sun, H. Kitano, N. Ise. Poly(styren-co-acrolein) latex particles: copolymerization and characteristics // *J. of Appl. Polym. Sci.* 1990. V. 40. P. 89–98.
 27. S. Margel, A. Rembaum. Synthesis and characterization of poly(glutaraldehyde), a potential reagent for protein immobilization and cell separation // *Macromol.* 1980. № 13. P. 19–24.
 28. S. Margel. Characterization and chemistry of polyaldehyde microspheres // *J. of Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* 1984. V. 22. P. 3521–3533.
 29. B. Schlund, T. Pith, M. Lambla. Syntheses et caractéristiques structurales de latex reactifs // *Macromol. Chem. Suppl.* 1985. № 10/11. P. 419–433.
 30. A. Rembaum, M. Chang, J. Richards, M. Li. Synthesis and characterization hydrophilic microspheres // *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* 1984. V. 22. P. 609–619.
 31. H.J. Hager. Latex polymer reagent for diagnostics tests: US Pat. № 3857931 от 11.10.1974.
 32. L.C. Dorman. Method for covalent coupling of a protein molecules onto amide containing polymer particles: US Pat. № 4046723 от 23.06.1977.
 33. G. Quash. Method of a carboxylate latex producing: French. Pat. № 2 378094. 1982.
 34. L.C. Dorman. Method for covalent coupling of a protein molecules onto amide containing polymer particles: US Pat. № 4046723. 1977.
 35. R.S. Molday, W.J. Dreyer. New immunolates spheres visual markers of antigen on lymphocytes for scanning electron microscopy // *J. Cell. Biol.* 1975. № 64. P. 75–88.
 36. L. Johansen, K. Nustad, T.B. Orstavik, J. Ugelstad, A. Berge, T. Ellengsen. The new latex agglutination test kit for immunological assay // *J. Immunol. Methods.* 1983. № 59. P. 255–264.
 37. C. Pichot. Latex structures et fonctionnalisés // *Bulletin de la Societe Chimique de France.* 1987. № 4. P. 725–733.
 38. L.C. Dorman. Method for forming an amide bound between a latex and protein: US Pat. №4045384. 1976.
 39. F. Kurzer, K. Douraghi-Zadeh. Advances in the chemistry of carbodiimides // *Chem. Rev.* 1967. V. 67. P. 107.
 40. P. Sundaram. Protein carrying latices for immunoserological research // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974. V. 61. № 2. P. 667–672.
 41. Н.И. Прокопов. Синтез полимерных суспензий с узким распределением частиц по размерам методом гетерофазной полимеризации: дисс. ... докт. хим. наук. – М. 1999.
 42. Н.В. Яшина. Иммунохимические реагенты на основе окрашенных микросфер полистирольного латекса: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М. 1997.
 43. L. Johansen, K. Nustad, T. Orstavik, J. Ugelstad, A. Berge, T. Ellengsen. The new latex agglutination test kit for immunological assay // *J. Immunol. Methods.* 1983. № 59. P. 255–264.
 44. T. Wagner, C. Hsu, G. Kelleher. The preparation of immunomicrospheres for enzyme immobilization // *Biochem. J.* 1968. V. 108. P. 892–898.
 45. G. Quash, A. Roch, A. Nivelian, J. Grange, T. Keolnangkhot, J. Huppert. The preparation of latex particles with covalently bound polyamines, IgG and measles agglutinins and their use in visual agglutination // *J. of Immunological Methods.* 1978. V. 22. № 1/2. P. 165–174.
 46. R. Patel, S. Price. The preparation of latex particles for covalent bounding of biochemicals // *Biopolymers.* 1967. V. 5. P. 583–587.
 47. K. Kjellqvist. Reactive Acid Curing Waterborne Microparticles // *Prog. in org. coatings.* 1994. V. 24(1–4). P. 209–223.
 48. H. Kitano, Z.H. Sun, N. Ise. Functionalized polymer lattices. Catalytic effects of imidazole-containing lattices on hydrolyses of phenyl esters // *Macromol.* 1983. V. 16. P. 1306–1310.
 49. H.J. Hager. Latex polymer reagent for diagnostics tests: US Pat. № 3857931. 1974.
 50. S. Margel. Characterization and chemistry of polyaldehyde microspheres // *J. of Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* 1984. V. 22. P. 3521–3533.
 51. S. Margel, A. Rembaum. Synthesis and characterization of poly(glutaraldehyde), a potential reagent for protein immobilization and cell separation // *Macromol.* 1980. № 13. P. 19–24.
 52. I.-H. Cho, E.-H. Paek, H. Lee, J.Y. Kang, T.S. Kim, S.-H. Paek. Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces // *Analytical Biochemistry.* 2007. V. 365. P. 14–23.
 53. J. Butler, R. Nessler, L. Ni, K. Joshi, M. Suter, B. Rosenberg, J. Chang. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene // *J. Immunol. Methods.* 1992. № 24. P. 77–90.
 54. W. Schramm, S. Paek. Antibody-antigen complex formation with immobilized immunoglobulin // *Anal. Biochem.* 1992. V. 205. P. 47–56.
 55. Я.М. Станишевский. Диагностические тест-системы на основе конъюгатов «полимерная микросфера – биолиганд» медико-биологического применения: дисс. ... д. хим. наук. – М. 2012.