

АКТИВАЦИЯ АНТИТЕЛ ПЕРЕД ПОКРЫТИЕМ

Наборы для радиоиммунологического анализа (РИА) используются в радиологических лабораториях и применяются для оценки состояния щитовидной железы, уровня стероидных гормонов, количественного содержания онкомаркеров, гормонов и т.д.

Компоненты диагностического набора [1]:

- 1) исследуемая сыворотка (или исследуемый антиген);
- 2) антитела, связанные на сорбенте (пластиковой пробирке).
- 3) диагностические антитела против иммуноглобулинов, меченые радиоизотопами;
- 4) контрольные сыворотки;
- 5) буферный раствор.

На твердую фазу адсорбируют моноклональные антитела (МКАТ), специфичные в отношении одного из эпитопов тестируемого антигена, затем инкубируют ее со смесью определяемого антигена и меченых (детектирующих) антител. Имобилизованные и меченые антитела соответствуют, как правило, разным эпитопам определяемого антигена. В результате иммунной реакции на поверхности твердой фазы образуется трехслойный комплекс [имобилизованные антитела – антигены – меченые антитела]. В таком иммунном комплексе концентрация определяемого антигена пропорциональна концентрации меченых антител, детектирующий агент которых обеспечивает регистрируемый сигнал.

На сегодняшний день при производстве твердофазного покрытия для набора ИРМА-ПРОЛАКТИН-СТ проводят непрямую сорбцию МКАТ на поверхность твердой фазы. Связывание происходит через авидин-биотиновые мостики, при этом концентрация МКАТ при нанесении составляет 2 мкг/мл.

Пассивная (прямая) адсорбция интересна в силу своей простоты. Но в ходе проведенных экспериментов было выявлено, что при сохранении антигенсвязывающей активности минимально допустимая концентрация МКАТ при нанесении составляет 5 мкг/мл.

Таким образом, проведение исследований по активации антител перед нанесением на твердую фазу является весьма актуальной задачей. Поэтому были проведены работы по модификации конфигурации антитела путем кислотной обработки с участием HCl-глицин.

Были подобраны оптимальные значения следующих параметров:

- 1) молярность буферного активирующего раствора 0,1 М (буфер HCl-глицин);
- 2) pH активирующего раствора 2,5 (буфер HCl-глицин 0,1 М + антитела, pH=7,2-7,4);
- 3) время обработки 10 мин;
- 4) нейтрализация после активации с помощью покрывающего буфера (pH=8,2-8,4).

В ходе оптимизации рабочих условий предобработки антител были рассмотрены концентрации антител активирующего раствора в ряду 100, 200 и 300 мкг/мл. Максимальное связывание антител с антигеном было обнаружено в пробирках, куда были нанесены антитела с концентрацией при активации 300 мкг/мл. Также было проведено множество экспериментальных работ по уменьшению концентрации МКАТ при нанесении и сравнению воспроизводимости результатов – было выявлено, что концентрацию МКАТ при нанесении можно уменьшить с 5 мкг/мл (результаты прямой адсорбции) до 3 мкг/мл.

Таким образом, данную технологию можно внедрить при производстве твердофазного покрытия для набора ИРМА-ПРОЛАКТИН-СТ, так как появляется возможность уменьшить количество стадий изготовления твердофазного покрытия и отказаться от такого дорогостоящего компонента как авидин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммунодиагностические реакции: учеб. пособие / Г.К. Давлетшина [и др.]. – Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2016. – 34 с.