

УДК 612.577.11

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ АДСОРБЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ НА АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2012 г. Ю. Н. Тараканова*, Д. А. Дмитриев*, Ю. С. Массино*, М. Б. Смирнова**, О. Л. Сегал**, О. В. Фартушная*, Д. А. Яковлева*, Г. И. Коляскина***, В. Ф. Лавров*, А. Д. Дмитриев*

* Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, 105064

** Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

*** Научный центр психического здоровья РАМН, Москва

e-mail: add0547@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.11.2011 г.

Исследована антигенсвязывающая активность иммобилизованных антител в зависимости от pH насыщающего буфера. Проанализировано 28 моноклональных антител (МКА), секретированных различными гибридомами к трем вирусным антигенам: ядерный белок p23 вируса гепатита С (С core-protein p23), белок p24 ВИЧ 1 и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Антитела адсорбировали на поверхности иммунных планшетов в кислом (pH 2.8), нейтральном (pH 7.5) и щелочном (pH 9.5) буферах. Проведено тестирование связывания меченых антигенов (биотинилированные или конъюгированные с пероксидазой хрена) с иммобилизованными антителами. Показано, что 10 из 28 (36%) проанализированных МКА значительно лучше сохраняли антигенсвязывающую активность, если процесс их пассивной адсорбции на поверхности полистироловых планшетов происходил в кислом буфере (pH 2.8). Этот подход позволил сконструировать высокочувствительный сэндвич-метод определения HBsAg с минимальной, достоверно определяемой концентрацией антигена – 0.013–0.017 нг/мл. Описанный прием может быть рекомендован для оптимизации сэндвич-методов и твердофазных конкурентных методов.

Биологическая активность сорбированных антител является важнейшим фактором, определяющим эффективность твердофазных конкурентных и сэндвич-методов тестирования антигенов. В упомянутых методах пассивная адсорбция является наиболее распространенным способом иммобилизации антител на поверхность твердой фазы, что обусловлено ее простотой и дешевизной [1–5]. Вместе с тем адсорбция на поверхности пластиковых иммунных планшетов вызывает значительное уменьшение антигенсвязывающей активности МКА. Показано, что после адсорбции биологическую активность утрачивают от 75 до 99% МКА [6, 7]. К числу наиболее существенных факторов, влияющих на сохранение биологической активности антител, относятся состав и физико-химические свойства буферных систем, используемых в процессе сорбции [5]. Имеется большое число работ, посвященных анализу влияния pH на адсорбцию разнообразных антигенов (вирусные белки, липополисахариды и др.) на поверхности иммунных пластиковых планшетов в твердофазных вариантах иммуноферментного анализа (ИФА) [8–10]. Однако, как ни парадоксально, вопрос воздействия pH на биологическую активность сорбированных антител в литературе освещен весьма скудно. Традиционно полагают, что оптимальными буферными системами для адсорбции антител на полистироловую поверхность

являются фосфатный (pH 7.0–7.5) и карбонатный (pH 9.0–9.6) буферы [5]. Вместе с тем в некоторых более ранних работах описаны поликлональные и моноклональные антитела, требующие для сохранения своей биологической активности использования буферов с низким значением pH [11, 12]. Так, в работе французских авторов [11] наблюдали увеличение активности поликлональных козьих антител (обнаружено по возрастанию сигнала в ИФА) после их сорбции на полистироловые планшеты при pH 5.0 (по сравнению с pH 7.5). Кроме того, согласно неопубликованным в реферируемых журналах, но известным среди специалистов техническим заметкам [12], встречаются такие МКА, которые дают лучшие результаты при конструировании сэндвич-методов после их адсорбции на полистироловую поверхность при pH 3.0. Однако в указанной работе [12] не было представлено подробного анализа антигенсвязывающей активности МКА после их адсорбции при разных значениях pH.

Цель работы – анализ биологической активности 28 МКА после их сорбции при различных значениях pH: в щелочном (pH 9.5), нейтральном (pH 7.5) и кислом (pH 2.8) буферах.

МЕТОДИКА

В исследовании использовали 96-луночные полистироловые планшеты “MaxiSorp” фирмы “Nunc” (Дания), стрептавидин-пероксидазу фирмы “Biosource” (США) и LC-LC-биотин фирмы “Pierce” (США). Прочие реактивы были произведены фирмой “Sigma” (США). Рекомбинантные белки р24 ВИЧ1 (генотип 1a) [13] и core-белок р23 вируса гепатита С (генотип 1b) [14] были экспрессированы в *Escherichia coli*. Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) серотипа ауw (S-полипептид) [14] был экспрессирован в *Pichia pastoris*. Рекомбинантные белки произведены НПО “Диагностические системы” (Россия).

Получение моноклональных антител к рекомбинантным белкам. Гибридомы, секретирующие МКА к рекомбинантным белкам, получали, как описано ранее [15, 16]. Отбирали гибридомы, антитела которых давали окрашивание в ИФА при связывании с иммобилизованным антигеном при разведении культуральных супернатантов в $(2-3) \times 10^4$ раз. Положительные гибридомы клонировали не менее трех раз. МКА очищали из асцитной жидкости до чистоты более 95% с помощью хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе, как было описано ранее [16, 17].

Биотинилирование рекомбинантных белков и моноклональных антител. Белки р24, р23 и МКА 18С8 биотинилировали в соответствии с рекомендациями фирмы “Pierce” (США). С этой целью белок р24 ВИЧ 1 и МКА растворяли в 0.1 М гидрокарбонате Na. Core-белок вируса гепатита С (р23) растворяли в том же буфере с 0.5% лаурилсаркозила и биотинилировали 2 ч в ледяной бане. Молярное отношение LC-LC-биотина (2 мг/мл в диметилсульфоксиде) и белка в инкубационной смеси составляло 4 : 1. Биотинилированный белок отделяли от свободного лиганда путем хроматографии на сефадексе G-25.

Получение конъюгата HBsAg с пероксидазой хрена. HBsAg (S-полипептид серотипа ауw) конъюгировали с пероксидазой хрена методом Накане [18]. Молярное отношение антигена и пероксидазы при ковалентном связывании составляло 1 : 1.

Определение антигенсвязывающей активности иммобилизованных антител. МКА адсорбировали на поверхности 96-луночных полистироловых планшетов “MaxiSorp” (3 мкг/мл, 100 мкл на лунку, ночь при комнатной температуре) в следующих буферах: 0.1 М глицин-HCl-буфер, pH 2.8; 0.025 М Na-фосфатный буфер, pH 7.5, и 0.05 М Na-гидрокарбонатный буфер, pH 9.5. Насыщенные антителами планшеты инкубировали (120 мин, 37°) с серийными разведениями меченых антигенов (1, 2, ..., 64 нг/мл). Антигены разводили в 0.025 М Na-фосфатном буфере (pH 7.5), содержащем 0.15 М NaCl, 0.2% БСА и 0.05% твина 20 (ELI-буфер). После отмывки в лунки добавляли стрептавидин-пероксидазу (50 нг/мл), растворенную в ELI-буфере, содержащем 1% казеина вместо БСА. После инкубации (30 мин, 37°) и

отмывки иммунные комплексы окрашивали тетрамethylбензидином (ТМБ). Окрашивание регистрировали на плащечном сканере при длине волны 450 нм.

Определение относительного количества антител, иммобилизованных на поверхности 96-луночных полистироловых планшетов при кислых, нейтральных и щелочных значениях pH сорбции. Первый подход: биотинилированные антитела клона 18С8 адсорбировали на поверхности полистироловых планшетов в кислом, нейтральном и щелочном буферах, как описано выше. После отмывки планшеты инкубировали со стрептавидин-пероксидазой, растворенной в ELI-буфере с казеином в концентрациях 0, 0.5, ..., 16 нг/мл. Комплексы биотинилированных антител и стрептавидин-пероксидазы окрашивали, как описано выше. Второй подход: антитела клона 18С8 сорбировали, как описано выше. После отмывки планшеты инкубировали с антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в концентрациях: 0, 1.25, 2.5, ..., 40 нг/мл. Комплексы антител с антимышиным конъюгатом окрашивали, как описано выше.

Сэндвич-метод тестирования HBsAg. Полистироловые планшеты насыщали при комнатной температуре в течение ночи антителами клона 18С8, растворенными в 0.1 М глицин-HCl-буфере, pH 2.8, или в 0.025 М Na-фосфатном буфере, pH 7.5 (3 мкг/мл, 100 мкл на лунку). Инкубационная смесь (конечный объем 200 мкл) включала 150 мкл стандарта (разведенного в сыворотке крови, заведомо не содержащей HBsAg) и 50 мкл раствора детектирующих антител: конъюгат МКА F4F3 с пероксидазой хрена в ELI-БСА буфере (1.5 мкг/мл). Планшеты инкубировали 2 ч при 42°С и после серии отмывок выявляли иммунные комплексы, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мы проанализировали биологическую активность иммобилизованных антител, секретируемых 52 гибридами к трем вирусным антигенам: белок р24 ВИЧ 1 – антитела 20 гибридом, core-белок р23 вируса гепатита С – антитела 16 гибридом, HBsAg – антитела 16 гибридом. Очищенные антитела сорбировали на 96-луночные полистироловые планшеты “MaxiSorp” при pH 7.5 в концентрации 3 мкг/мл. В предварительных экспериментах для антител клонов 18С8, Р6 и С11 нами было показано, что увеличение насыщающей концентрации антител при pH 7.5 не приводило к увеличению связывания меченого антигена с сорбированными антителами. К сорбированным антителам добавляли нарастающие количества меченых антигенов: биотинилированных белков р24 ВИЧ 1 или core-белка р23 вируса гепатита С; HBsAg был конъюгирован с пероксидазой хрена. Типичные кривые связывания меченого антигена с сорбированными антителами

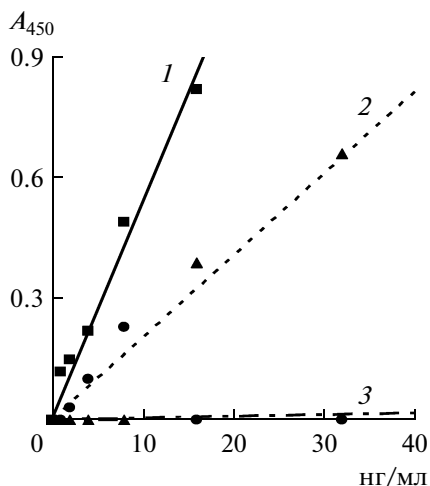


Рис. 1. Связывание биотинилированного белка р24 ВИЧ 1 (нг/мл) с моноклональными антителами различных клонов к белку р24, адсорбированными (3 мкг/мл) на поверхность полистироловых планшетов "MaxiSorp" при нейтральных значениях pH (7.5). Имобилизованы антитела клона (приведены уравнения кривых связывания): 1 – антитела клона P3, $y = 0.054x$; 2 – антитела клона P5, $y = 0.021x$; 3 – антитела клона P9, $y = 0.001x$.

ми к белку р24 ВИЧ 1 (для антител трех гибридом) приведены на рис. 1.

Эффективность связывания меченого антигена с иммобилизованными антителами можно охарактеризовать коэффициентом кривой связывания (то есть, тангенсом угла наклона линейного участка кривой к оси концентраций), что является принятым способом количественной характеристики чувствительности [19]*. Можно видеть, что иммобилизованные МКА P9 практически не связывают биотинилированный антиген (кривая 3, совпадает с осью концентраций). МКА P3 характеризовались относительно высокой способностью связывать биотинилированный антиген (кривая 1, $k = 0.05$). Несколько меньшей антигенсвязывающей активностью отличались антитела клона P6 (кривая 2,

$k = 0.02$). Сходным образом было проанализировано связывание меченых антигенов со всеми антителами нашей панели (кривые связывания не приведены). Было обнаружено, что половина исследованных антител (24 из 52) практически полностью утрачивали способность связывать антиген после адсорбции при pH 7.5 (остаточное связывание составляло менее 20% от максимального значения для панели МКА данной специфичности). После адсорбции на твердую фазу при pH 7.5 способность связывать антиген сохраняли десять МКА к HBsAg (62%), одиннадцать МКА к р24 ВИЧ1 (55%) и семь МКА к core-белку вируса гепатита С (44%) (таблица). Значения коэффициента кривых в этих случаях составляли 20–100% от максимального значения для панели МКА к данному антигену. Эти МКА использовали для анализа воздействия pH сорбции на антигенсвязывающую активность. Прочие антитела были исключены из рассмотрения, так как они не могли представлять практической ценности как сорбируемые при конструировании как конкурентных, так и сэндвич-методов.

Отобранные МКА адсорбировали на планшеты в кислом (pH 2.8), нейтральном (pH 7.5) и щелочном (pH 9.5) буферах и анализировали процесс сравнительного связывания меченых антигенов с иммобилизованными антителами. Некоторые кривые связывания адсорбированных антител с антигенами (р24 ВИЧ1, core-белок р23 вируса гепатита С и HBsAg), которые были получены в этих опытах, представлены на рис. 2. Сводные данные по воздействию pH адсорбции МКА на антигенсвязывающую активность антител приведены в таблице. Ни в одном из опытов не наблюдали увеличения антигенсвязывающей активности исследуемых МКА при pH-адсорбции 9.5 (по сравнению с адсорбцией при pH 7.5). Вместе с тем при адсорбции в кислом буфере (pH 2.8) антигенсвязывающая активность некоторых антител существенно возрастала: в серии опытов (3–4 эксперимента) для антител данного клона всякий раз наблюдалось увеличение коэффициента кривой связывания при pH 2.8 в сравнении с коэффици-

Влияние pH-сорбции антител на их биологическую активность

Антиген	Проанализировано антител (всего гибридом)	Сохранение биологической активности после сорбции при pH 7.5	Увеличение связывания меченого антигена с сорбированными антителами	
			pH 2.8	pH 9.5
р24 ВИЧ	20	11	3	не наблюдается
core-белок р23 вируса гепатита С	16	7	4	не наблюдается
HBs-антиген	16	10	3	не наблюдается

Примечание. Указанные антитела (3 мкг/мл) адсорбировали на поверхность полистироловых планшетов при pH 7.5 и тестировали на способность связывать антигены. Антитела, сохранявшие биологическую активность после сорбции при pH 7.5, дополнительно проверяли на способность взаимодействовать с антигенами после сорбции при pH 2.8 и pH 9.5 (см. "Методику").

* Коэффициенты кривых связывания меченых антигенов с сорбированными антителами приведены в подписях к рисункам 1, 2 и 3. Коэффициенты калибровочных кривых в сэндвич-методе приведены в подписи к рисунку 4.

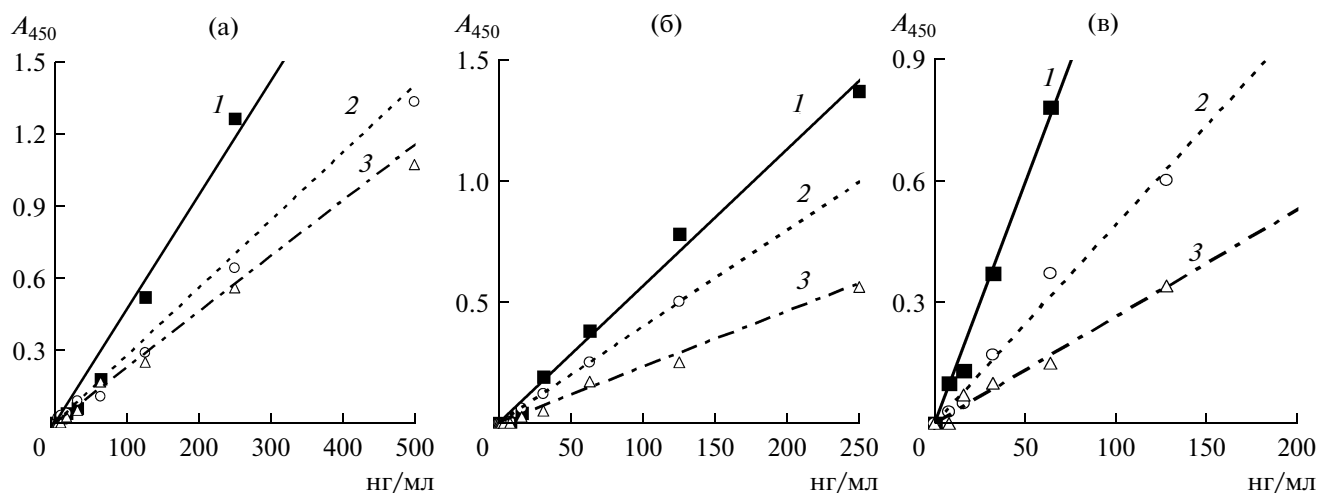


Рис. 2. Связывание меченых антигенов с моноклональными антителами, иммобилизованными на поверхности полистироловых планшетов (3 мкг/мл) при кислых – 2.8 (1), нейтральных – 7.5 (2) и щелочных – 9.5 (3) значениях pH.

а – связывание биотинилированного белка р24 ВИЧ1 с антителами клона Р6; уравнения кривых связывания: 1 – $y = 0.005x$; 2 – $y = 0.003x$; 3 – $y = 0.002x$.

б – связывание биотинилированного белка р23 к core-белку вируса гепатита С с антителами клона С11; уравнения кривых связывания: 1 – $y = 0.006x$; 2 – $y = 0.004x$; 3 – $y = 0.002x$.

в – связывание HBsAg, конъюгированного с пероксидазой хрена, с антителами клона 18С8; уравнения кривых связывания: 1 – $y = 0.012x$; 2 – $y = 0.005x$; 3 – $y = 0.002x$.

ентом кривой при pH 7.5. Так, в случае МКА к HBsAg эффект увеличения антигенсвязывающей активности наблюдали у трех из десяти проанализированных антител (таблица). Показательными в этом отношении были МКА 18С8, связывание которых после адсорбции при pH 2.8 увеличилось в 2.4 раза (по сравнению с pH 7.5), на рис. 2в, сравнить кривые 1 и 2. Сходные результаты были получены после сорбции МКА 18С8 в 0.1 М цитратном буфере pH 2.8, а также в 0.1 М глициновом буфере, pH 2.8, в присутствии 0.05 М–0.2 М NaCl (данные не приведены). Таким образом, наблюдаемый нами эффект связан со значениями pH буферного раствора, используемого для адсорбции антител, и не зависит от его состава и молярности.

При изучении антигенсвязывающей активности антител к core-белку вируса гепатита С ее увеличение, после адсорбции при pH 2.8, наблюдали у 4 из 7 тестированных МКА (таблица). Наиболее выраженный усиливающий эффект был получен с МКА клона С11 (связывание увеличилось в 1.4 раза), на рис. 2б, сравнить кривые 1 и 2. Для МКА к белку р24 ВИЧ 1 увеличение способности улавливать антиген после иммобилизации при низком значении pH наблюдали у 3 из 11 проанализированных антител (таблица). Наиболее показательными были опыты с МКА клона Р3: в этом случае наблюдали увеличение связывания в 1.7 раза: на рис. 2а сравнить кривые 1 и 2.

Феномен увеличения сигнала (чувствительность) в ИФА в результате адсорбции некоторых МКА при кислом значении pH может быть обусловлен различными причинами. Во-первых,

можно предположить, что адсорбция указанных “ацидофильных МКА” при кислом значении pH приводит к возрастанию поверхностной концентрации иммобилизованных антител на твердой фазе. В этой связи следует заметить, что согласно теоретическим расчетам (основанным на геометрических соображениях) на 1 см² полистироловых планшетов могло бы максимально разместиться 650 нг молекул иммуноглобулина G при условии, что все молекулы ориентированы вертикально [20]. Обычно для насыщения 96-луночных полистироловых планшетов белками (например, иммуноглобулинами) в каждую лунку добавляют по 100–200 мкл насыщающего раствора. При этом с насыщающим раствором соприкасается часть внутренней поверхности лунок площадью около 0.9–1.5 см², включая дно и стенки лунки [21, 22]. Таким образом, при достижении указанной максимально возможной поверхностной концентрации антител (650 нг/см²) в каждой лунке планшета “MaxiSorp” будет иммобилизовано около 600–900 нг антител (в зависимости от объема добавленного раствора). Если часть молекул находится в “лежащем” положении на твердой фазе, то максимально возможная поверхностная концентрация антител, в силу чисто геометрических соотношений, будет уже ниже [20]. На расположение молекул на твердой фазе могут влиять физико-химические характеристики пластика, использованного для изготовления планшетов, микрорельеф поверхности, условия насыщения (буферные системы) [20, 23]. Кроме того, в действительности, даже в условиях предельного на-

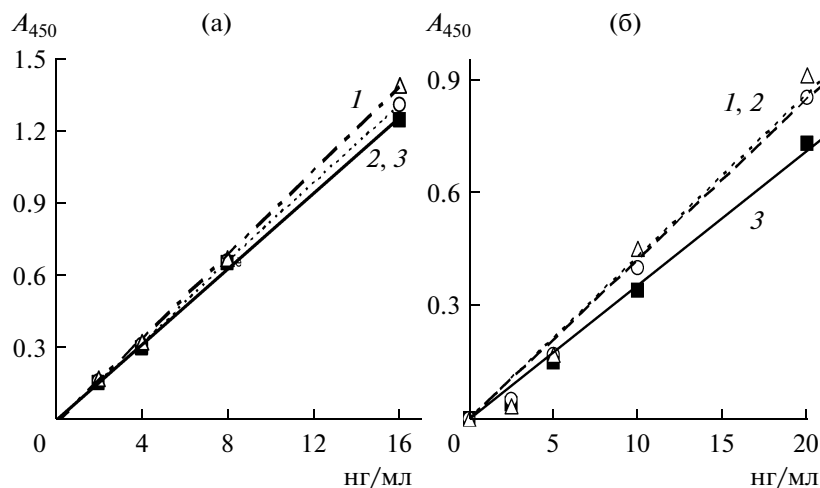


Рис. 3. Определение относительного количества антител клона 18С8, которые адсорбируются (3 мкг/мл) на поверхность иммунных планшетов при щелочных, (1), нейтральных (2) и кислых (3) значениях рН.

а – сорбировали биотинилированные антитела и тестировали связывание стрептавидин-пероксидазы (нг/мл) с иммобилизованными антителами; уравнения кривых связывания: 1 – $y = 0.079x$, 2 – $y = 0.082x$, 3 – $y = 0.086x$.

б – после адсорбции антител тестировали связывание конъюгата кроличьих антимышиных антител с пероксидазой хрена (нг/мл) с иммобилизованными антителами; уравнения кривых связывания: 1 – $y = 0.043x$, 2 – $y = 0.42x$, 3 – $y = 0.36x$.

сращения антитела, по-видимому, располагаются на поверхности полистирольных планшетов кластерами, не образуя сплошного монослоя [7, 23]. Согласно экспериментальным оценкам, ранее сделанным в работе Стивенса и Келсо [21], в каждой лунке 96-луночных полистироловых планшетов “Immulon 2” (“Dynatech”, США) при добавлении 100 мкл насыщающего раствора удавалось иммобилизовать около 300 нг крысиных или мышиных иммуноглобулинов G, что в пересчете на поверхностную концентрацию антител составляло 320 нг белка на см². Эти данные, полученные с помощью биотинилированных антител, практически совпали с результатами работ Батлера с соавт. [7, 24], полученных с помощью другого подхода – использования ¹²⁵I меченых антител. Они также хорошо согласуются с теоретическими расчетами специалистов фирмы “Nunc” в отношении максимальной сорбирующей способности планшетов “MaxiSorp” (650 нг/см²) и “PolySorp” (220 нг/см²) для иммуноглобулина G [20].

Второе объяснение наблюдаемого нами усиливающего эффекта после адсорбции МКА в кислом буфере может заключаться в том, что поверхностная концентрация антител на твердой фазе (полистироловая поверхность) не изменяется (или даже уменьшается), однако при кислых значениях рН сорбции антигенсвязывающая активность МКА сохраняется в гораздо большей степени. Для определения относительного количества антител, которые иммобилизуются на твердой фазе при различных значениях рН, мы использовали два подхода. На поверхности планшетов сорбировали нативные и биотинилированные МКА 18С8 при кислых, нейтральных и щелочных

рН (рис. 3). В качестве параметра, характеризующего относительное количество нативных МКА, которые сорбировались на твердой фазе, использовали коэффициенты кривых связывания антимышиного конъюгата с иммобилизованными антителами (рис. 3а). Относительное количество сорбированных биотинилированных МКА оценивали по коэффициентам кривых связывания стрептавидин-пероксидазы с биотинилированными антителами (рис. 3б). Оба параметра прямо коррелировали с количеством антител, адсорбированных на твердой фазе.

Из результатов, представленных на рис. 3, следует, что кривые связывания антимышиного конъюгата с сорбированными антителами практически не зависят от рН сорбции антител – отклонение коэффициента кривой связывания от среднего значения не более 12% (рис. 3а). Кривые связывания стрептавидин-пероксидазы с биотинилированными МКА 18С8, иммобилизованными при рН 2.8; 7.5 и 9.5, практически совпадают: отклонение коэффициента кривой связывания от среднего значения не превышают 5% (рис. 3б). Эти данные позволяют заключить, что при нейтральных, кислых и щелочных рН на поверхности полистироловых планшетов сорбируется одинаковое количество молекул МКА. Вместе с тем молекулы антител, адсорбированные при кислом значении рН, в большей мере сохраняют антигенсвязывающую активность.

В целом наши данные согласуются с результатами, ранее полученными Батлером с соавт. на модели меченых ¹²⁵I МКА [7, 24]. По наблюдениям этих авторов, количество иммобилизованных на поверхности полистироловых планшетов мо-

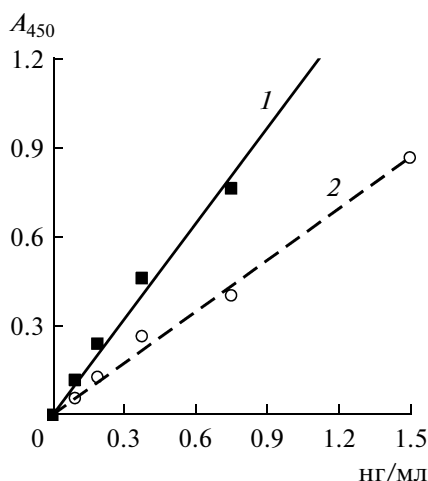


Рис. 4. Калибровочные кривые в сэндвич-методе тестирования HBsAg (сорбируемые антитела 18С8 – детектирующие антитела F4F3) при кислых – 2.8 (1) и нейтральных – 7.5 (2) значениях pH-адсорбции; уравнения калибровочных кривых: 1 – $y = 1.072x$; 2 – $y = 0.58x$.

лекул иммуноглобулина G (мышинные МКА) в условиях достижения насыщения не зависело от pH адсорбции (диапазон изменения составлял pH 4.5–9.6) [7]. Количество адсорбированных молекул антител было одинаковым для разных видов МКА: 300 нг/лунку (объем насыщающего раствора не указан) для использованных авторами планшетов Immulon 2 (“Dynatech”, Virginia) [24]. Биотинилирование МКА не влияло на процесс их пассивной адсорбции на полистироловые планшеты [24]. Это хорошо согласуется и с определенным нами оптимумом концентрации сорбируемых антител 3 мкг/мл.

Антитела 18С8, адсорбированные при pH 2.8, были использованы для конструирования сэндвич-метода тестирования HBsAg. После иммобилизации при pH 2.8 эти антитела характеризовались максимальной антигенсвязывающей активностью в ряду всей панели МКА к HBsAg, адсорбированных при нейтральных, кислых и щелочных pH (данные не представлены). Для подбора эффективных детектирующих антител все антитела панели (16 МКА, включая антитела, которые инактивировались после адсорбции на твердую фазу) конъюгировали с пероксидазой хрена и строили калибровочные кривые с сорбируемыми при pH 2.8 антителами 18С8 и мечеными антителами (данные не приведены). Самый эффективный сэндвич-метод был получен с детектирующими МКА F4F3, мечеными пероксидазой. Результаты, представленные на рис. 4, показывают, что аналитическая чувствительность (коэффициент калибровочной кривой) данного сэндвич-метода при адсорбции МКА 18С8 при pH 2.8 (кривая 1) в 1.8 раза превышает таковую при адсорбции антител в буфере с pH 7.5 (кривая 2); прочие условия были одинаковы.

Для сконструированного сэндвич-метода определяли минимальную достоверно определяемую концентрацию антигена для $n = 5$ (превышение поглощения при тестируемой концентрации над поглощением, даваемым нулевым стандартом ± 3 среднеквадратичного отклонения). Указанный параметр измеряли после адсорбции МКА 18С8 при pH 7.5 и 2.8 с использованием трех независимо полученных конъюгатов МКА F4F3 с пероксидазой хрена. После адсорбции МКА 18С8 при pH 7.5 данный параметр составил: 0.1, 0.17 и 0.11 нг/мл (для трех различных препаратов конъюгата). В результате адсорбции антител при pH 2.8 этот показатель для тех же препаратов конъюгата уменьшился до 0.014, 0.017 и 0.013 нг/мл. Таким образом, очень простой методический прием – адсорбция антител на поверхность 96-луночных полистироловых планшетов при pH 2.8 позволил на порядок уменьшить минимальную достоверно определяемую концентрацию HBsAg.

Результаты анализа 28 МКА, секретируемых различными гибридами к трем вирусным антигенам, позволяют нам сделать вывод, что 36% данных антител (10 из 28) после их адсорбции при pH 2.8 сохраняют свою антигенсвязывающую активность значительно лучше, чем при других значениях pH (таблица). В противоположность этому, мы не наблюдали увеличения активности МКА после адсорбции антител в щелочном (pH 9.5) буфере по сравнению с антителами, иммобилизованными при pH 7.5 (см. таблицу).

Эффект неодинакового воздействия кислых значений pH на антигенсвязывающую активность МКА при их адсорбции на твердой фазе (полистироловая поверхность) может быть связан с различиями в заряде и степени гидрофобности варьируемых участков антител, что может определять ориентацию и конформационное состояние молекул антител, в зависимости от условий их адсорбции. Принято считать, что “правильная” ориентация иммуноглобулиновых молекул на твердой фазе – это ориентация, при которой антигенсвязывающие участки обращены в раствор, так как подобное расположение антител обеспечивает их максимальную биологическую активность [20, 25, 26].

Описанный в настоящей работе простой методический прием, заключающийся в использовании буферных растворов с низким значением pH для адсорбции антител на полистироловую поверхность планшетов, может быть рекомендован для оптимизации конкурентных и сэндвич-методов определения антигенов в твердофазном ИФА. По нашим данным, этот прием в немалом числе случаев может способствовать достижению более высокой поверхностной концентрации биологически активных антител, иммобилизованных на твердой фазе, что является важнейшим условием высокой аналитической чувствительности подобного рода тест-систем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
2. Gosling J.P. // Clin. Chem. 1990. V. 36. № 8. P. 1408–1427.
3. Portsmann T., Kiessig S.T. // J. Immunol. Methods. 1992. V. 150. № 1–2. P. 5–21.
4. Kricka L.J. // Clin. Chem. 1994. V. 40. № 3. P. 347–357.
5. Khan M.N., Findlay J.W.A. Ligand-binding assay: development, validation and implementation in the drug development arena / Eds. M.N. Khan, J.W.A. Findlay. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2010. 424 p.
6. Butler J.E. // Methods in Molecular Medicine. V. 94. Eds. J. Decker, U. Reischl. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2004. P. 333–372.
7. Butler J.E., Ni L., Nessler R., Joshi K.S., Suter M., Rosenberg B., Chang J., Brown W.R., Cantarero L.A. // J. Immunol. Methods. 1992. V. 150. № 1–2. P. 77–90.
8. Geerligs H.J., Weijer W.J., Bloemhoff W., Welling G.W., Welling-Wester S. // J. Immunol. Methods. 1988. V. 106. № 2. P. 239–244.
9. Craig J.C., Parkinson D., Goatley L., Knowles N. // J. Biol. Stand. 1989. V. 17. № 3. P. 281–289.
10. Bantroch S., Buhler T., Lam J.S. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1994. V. 1. № 1. P. 55–62.
11. Cuvelier A., Bourguignon J., Muir J.F., Martin J.P., Sessboue R. // J. Immunoassay. 1986. V. 17. № 4. P. 371–382.
12. Sponholtz D.K. // IVD Technol. Technical Bulletin. 1995. V. 1. № 3. P. 12–15.
13. Hashida S., Ishikawa S., Hashinaka K., Nishikata I., Oka S., Ishikawa E. // Clin. Diagn. Laboratory Immunol. 2000. V. 7. № 6. P. 872–881.
14. Лобзин Ю.В., Жданов К.В., Волжанин В.М., Гусев Д.А. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение. СПб: ООО “Издательство Фолиант”, 2006. 192 с.
15. Massino Yu.S., Kizim E.A., Dergunova N.N., Vostrikov V.M., Dmitriev A.D. // Immunol. Lett. 1992. V. 33. № 3. P. 217–222.
16. Massino Y.S., Dergunova N.N., Kizim E.A., Smirnova M.B., Tereskina E.B., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. // J. Immunol. Methods. 1997. V. 201. № 1. P. 57–66.
17. Nikulina V.A., Kizim E.A., Massino Y.S., Segal O.L., Smirnova S.P., Avilov V.V., Saprigin D.B., Smotrov S.P., Tichtchenko V.A., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. // Clin. Chim. Acta. 2000. V. 299. № 1–2. P. 25–44.
18. Nakane P.K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. 1974. V. 22. № 12. P. 1084–1091.
19. Pardue H.L. // Clinical Chemistry. 1997. V. 43. № 10. P. 1831–1837.
20. Esser P. // Thermo Sci. Nunc Bull. 1988. № 6. P. 1–5.
21. Stevens P.W., Kelso D.M. // J. Immunol. Methods. 1995. V. 178. № 1. P. 59–70.
22. Valimaa L., Laurikainen K. // J. Immunol. Methods. 2006. V. 308. № 1–2. P. 203–215.
23. Qian W., Yao D., Yu F., Xu B., Zhou R., Bao X., Lu Z. // Clin. Chem. 2000. V. 46. № 9. P. 1456–1463.
24. Suter M., Butler J.E. // Immunol. Letters. 1986. V. 13. № 6. P. 313–316.
25. Esser P. // Thermo Scientific Nunc Bulletin. 1990. № 11. P. 3–6.
26. Liu F., Dubey M., Takahashi H., Castner D.G., Grainger D.W. // Analyt. Chem. 2010. V. 82. № 7. P. 2047–2058.

Effect of Conditions of Monoclonal Antibody Adsorption on Antigen-Binding Activity

Yu. N. Tarakanova^a, D. A. Dmitriev^a, Yu. S. Massino^a, M. B. Smirnova^b, O. L. Segal^b,
O. V. Fartushnaya^a, D. A. Yakovleva^a, G. I. Kolyaskina^c, V. F. Lavrov^a, and A. D. Dmitriev^a

^a Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Academy of Sciences of Bashkortostan,
Ufa, Bashkortostan, 105064 Russia

^b Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, Russia

^c Research Center for Mental Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

e-mail: add0547@yandex.ru

Received November 28, 2011

Abstract—The dependence of the antigen-binding activity of immobilized antibodies on pH of a saturating buffer has been investigated. We analyzed 28 monoclonal antibodies (MCAs) produced by various hybridomas to three virus antigens, i.e., the nuclear p23 protein of hepatitis C virus (C core protein p23), p24 protein of HIV 1, and the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg). Antibodies were adsorbed on the surfaces of immune plates in acidic (pH 2.8), neutral (pH 7.5), and alkaline (pH 9.5) buffers. The binding of labeled antigens, i.e., biotinylated or conjugated with horseradish peroxidase, with immobilized antigens was tested. It was shown that 10 out of 28 analyzed MCAs (36%) considerably better preserved their antigen-binding activity if their passive adsorption was carried out on the surface of polystyrene plates in an acidic buffer (pH 2.8). This approach allowed constructing a highly sensitive sandwich method for HBsAg assay with a minimal reliably determined antigen concentration of 0.013–0.017 ng/ml. The described approach may be recommended for the optimization of sandwich methods and solid-phase competitive methods.