

«Сейфуллин окулары – 12: Ғылым жолындағы жастар-болашақтың инновациялық әлеуеті» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференция материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения-12: Молодежь в науке - инновационный потенциал будущего" . – 2016. – Т.1, ч.1 – С.257-260

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ IgG И IgM ЧЕЛОВЕКА

***А.К. Булашев, А.Х. Жумалин,
Д. Кожжахметова, С. Серикова***

Антитела являются главным реагентом любого иммунологического анализа. Специфичность и аффинность антител во многом определяют объективность результатов диагностических тест-систем. Получение антисыворотки для иммунологических реакций – дело не простое, и успех работы зависит природы и свойств иммуногена, вида используемого адъюванта, схемы иммунизации, способа введения антигена, его оптимальной дозы, вида животного [1] и т.д. Следовательно, в каждом конкретном случае перед исследователем встает проблема определения оптимальных условий получения антисывороток (антител) против конкретного антигена, пригодных для иммуноанализа.

Антитела против иммуноглобулинов человека являются основными компонентами иммуноферментного анализа (ИФА), используемого в серологической диагностике ряда инфекционных и инвазионных болезней, в том числе токсоплазмоза [2, 3], сифилиса [4] и др., являющиеся причиной тяжелых внутриутробных инфекций. Своевременная диагностика этих болезней имеет первостепенное значение в профилактике мертворождений, аборт, ранней детской смертности, слепоты и инвалидности детей. На рынке медицинских препаратов для серодиагностики этой группы болезней имеется ряд коммерческих тест-систем, основанные на определении IgG и IgM антител к различным антигенам возбудителя в сыворотке крови.

В настоящее время особую актуальность приобретает своевременная диагностика токсоплазмоза. По данным J.M. Wastling and J.G. Mattsson в Европе и Северной Америке распространенность токсоплазмоза колеблется в пределах от 20 до 80% [5]. Инфицированность токсоплазмозом населения Российской Федерации в среднем составляет около 20,0% (<http://www.lvrach.ru/2011/11/15435295>), а в нашей стране более 77% людей страдает от токсоплазмоза (www.agrodom.kz/98-opasnost-protzojnykh-boleznej.html). Для эффективной борьбы с этой инвазией необходимо проводить массовый диагностический скрининг населения, в первую очередь женщин. К сожалению, Казахстан не производит тест-системы для диагностики вышеназванных болезней, поэтому высокая стоимость

импортных диагностикумов делает их недоступными для широкого круга населения.

Целью работы явилось разработка методов получения антител против IgG и IgM человека, которые могут быть использованы в создании технологии производства отечественных ИФА-наборов.

Методом сульфат-аммонийного осаждения и хроматографии на анионообменнике ДЭАЭ сефадексе А-50 [6] из 100 мл сыворотки человека было получено 80,0 мл очищенного IgG с концентрацией белка 0,125 мг/мл, т.е. выход IgG из 1,0 мл нормальной сыворотки человека составил 0,1 мг. Раствор препарата концентрировали с помощью ПЭГ-6000 до содержания в нем белка 1мг/мл. Для получения препарата IgM был использован метод, описанный Кэтти Д. и соавт. (1991) [7].

Для определения степени очистки препарата IgG проводили электрофорез в 12,5% ПААГ-ДСН. Анализ электрофореграммы IgG с помощью программного обеспечения Photo-Capt Version 12.4 компании «VILBER LOURMAT» позволил выявить до 11 электрофоретических полос глобулярных белков всех главных зон ($\alpha 1$, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ и γ -глобулины) с мол.м. от 20,7 до 134,5 кД. Молекула IgG разделилась на две белковые полосы с мол.м. 60,8 и 23,2 кД. Очистка иммуноглобулинов на ДЭАЭ-сефадексе А-50 после сульфат-аммонийного высаливания позволила исключить белковые полосы с мол.м. 70,7 кД; 66,6 кД и 55,0 кД, расположенных в районе тяжелой цепи IgG, и получить ярко выраженную полосу легкой цепи IgG.

IgG человека был использован для получения класс-специфичных антивидовых антител. Для иммунизации кроликов использовали три метода. При первом методе полученный иммуноглобулиновый препарат в количестве 4,0 мг в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) в смеси с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) или неполным адьюванте Фрейнда (НАФ) вводили в четырех местах подкожно в области живота и внутримышечно в верхнюю часть бедра трехкратно с интервалом в две недели. На 35-ый день иммунизации инъецировали 1,0 мг IgG подкожно без адьюванта и через 7 дней осуществляли забор крови. Во втором методе взятие крови проводили через 3 дня после внутривенного введения бустерной дозы в объеме 0,2 мг. Третий метод был выполнен по схеме второго метода с использованием в качестве антигена IgG препарата фирмы Sigma-Aldrich. Расход IgG человека при первом методе иммунизации составил 7,0 мг, а продолжительность иммунизации была равна 42 дням. Второй и третий методы иммунизации длились 38 дней, при этом было израсходовано по 6,2 мг антигена. Определение титров полученных антисывороток проводили по стандартной методике непрямого варианта ИФА с использованием полистирольных 96-луночных плоскодонных планшетов для ИФА (Nunc, Дания).

В результате тестирования сывороток кроликов установлено, что приготовленный нами препарат IgG НИИСХБ имеет большую

иммуногенность при использовании второго метода иммунизации. Причем, по иммуногенности он не уступал своему коммерческому аналогу. Так, антитела против IgG человека против обоих видов иммуноглобулинов обнаруживались до титра 50×217 , тогда как титр антисыворотки, полученной по первому методу не превышал 50×213 . Заметная разница между первым и вторым методами иммунизации, с одной стороны, и третьим методом, с другой стороны, имела место начиная с разведения сывороток 50×210 , а с титра 50×211 реакционная жидкость более интенсивно окрашивалась в лунках, в которых раститровалась антисыворотка, полученная по третьей схеме.

С целью определения степени специфичности антивидовых антител каждая антисыворотка была протестирована в ИФА против IgG-, и IgM- человека в пяти повторах. Полученные титры антисывороток были подвергнуты статистической обработке по методике, описанной Т.С.Сайдулдином (1981) [8].

Результаты статистической обработки титров антител гипериммунных сывороток показали, что внутривенное введение бустерной дозы антигена (второй и третий методы) вызывает более выраженный иммунный ответ, чем подкожная инъекция (первый метод иммунизации). Например, при подкожной бустеризации средний титр специфических антител был равен $1:540\,470$ ($+9,3\%$; $-8,5\%$), тогда как инъекция приготовленного нами иммуноглобулина и его коммерческого аналога в краевую вену уха позволила получить антисыворотки с более высокими титрами $1:1\,080\,940$ ($t=5,26$; $P<0,01$) и $1:713\,160$ ($t=2,0$; $P<0,05$), соответственно. Тем не менее, наибольшую специфичность показала антисыворотка, полученная по первому методу. Так, подкожная бустеризация позволила получить антисыворотку против IgG человека, которая в разведении выше $1:50\,500$ позволяла дифференцировать этот класс иммуноглобулина от IgM, в то время внутривенное введение бустерной дозы IgG (второй метод) и его фирменного аналога (третий метод) приводило к существенному увеличению кросс-реактивности антител по отношению к IgM. Например, если антисыворотка против IgG НИИСХБ перекрестно реагировала с IgM человека до титра $1:204\,400$ ($+12,5\%$; $-11,3\%$), то иммунизация кролика его коммерческим аналогом приводила к получению антител, реагирующих в одинаковой степени с использованными классами иммуноглобулинов.

Для получения антител против IgM человека нами была разработана следующая схема иммунизации. Аликвоту IgM в количестве 1,0 мл с концентрацией белка 1 мг/мл смешивали с 1,0 мл ПАФ и вводили ее кролику подкожно и внутримышечно в 4-х местах. Далее, трижды с интервалом в один месяц повторяли иммунизацию, вводя дважды по 0,5 мг иммуноглобулина в НАФ и последний раз 0,1 мг антигена в ЗФР. Через неделю после последней инъекции IgM производили забор крови.

Сыворотки кроликов, иммунизированные против IgM и IgG человека, были протестированы на титр антител против гомологичного и гетерологичного

антигенов. Результаты ИФА показали, что антисыворотка против IgM вступает в связь с гомологичным иммуноглобулином до титра 50×28 , тогда как положительная реакция по отношению к IgG отмечалась до разведения 50×25 . Титры анти-IgG сыворотки против гомологичного иммуноглобулина по сравнению с IgM также были выше на три порядка (50×214 и 50×211 , соответственно).

IgG-фракция антисывороток против IgG и IgM человека была очищена методом хроматографии на ДЭАЭ сефадекс А-50. В процессе хроматографии данный класс иммуноглобулина элюировалась в виде трех пиков. Практический выход IgG в результате очистки сывороток кролика составил 65%. Элюаты упомянутых пиков были протестированы на активность по отношению к использованным иммуноглобулинам человека с использованием конъюгата против IgG кролика в ИФА. Результаты анализа показали, что все три пика содержат антитела IgG класса, специфичные к IgG или IgM человека.

Таким образом, методологические подходы, использованные нами для выделения IgG человека, позволили получить иммуноглобулины данного класса с достаточной степенью чистоты. По антигенности приготовленный препарат не уступал своему коммерческому аналогу. Важно отметить, что коммерческий anti-human IgG конъюгат при оптимальной концентрации иммуноглобулинов на твердой фазе лучше связывался с препаратом НИИСХБ, и тем самым более отчетливо дифференцировал два вида иммуноглобулинов.

Метод получения анти-IgG сыворотки при котором бустерная доза антигена вводилась внутривенно оказалась более эффективным, чем при подкожном его введении. Причем, иммуногенность приготовленного IgG была на таком же высоком уровне, как у коммерческого IgG (Sigma-Aldrich). Однако, следует подчеркнуть, что антисыворотка, полученная после подкожной инъекции бустерной дозы, характеризовалась более высокой специфичностью и позволяла различать IgG от IgM, тогда как внутривенное введение бустерной дозы обоих видов IgG вызвала активизацию кросс-реактивности антител по отношению к IgM. Видимо, поступление в кровотоки высокой концентрации антигена вызывает усиленный синтез антител с низкой авидностью, что было зарегистрировано на третий день после введения бустерной дозы. Схема иммунизации кроликов IgM человека также позволила получить антисыворотку, которая в непрямом ИФА позволяет дифференцировать IgM от IgG.

На основании полученных результатов можно заключить, что разработанные нами методы получения антисывороток против IgG и IgM могут быть использованы в приготовлении антивидовых конъюгатов при производстве ИФА-наборов для диагностики инфекционных и инвазионных болезней человека.

Список литературы

1 Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Капанадзе Г.Д. Методические подходы к получению антивидовых антисывороток с целью их использования в иммунофармакологических исследованиях // Биомедицина. – 2013. – №2. – С. 95-102.

2 Oliveira A.C., Borges H.D., Carvalho F.R., de Macêdo A.G. Jr, Mota C.M., Oliveira A.M., Santiago F.M., Araújo C.G., Silva D.A., Mineo T.W., Abdallah V.O., Mineo J.R. Evaluation of colostrum as an alternative biological sample for the diagnosis of human congenital toxoplasmosis // BMC Infect Dis. – 2015. Nov 14; 15(1):519. doi: 10.1186/s12879-015-1242-z. 3 Iddawela D, Ehambaram K, Kumarasiri PV, Wijesundera S. Development and validation of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test for the diagnosis of toxoplasmosis in Sri Lanka // Ceylon Med J. – 2015. - Vol. 60, №3. - P. 82-86.

4 Li L, Cai B, Tao C, Wang L. Performance Evaluation of CLIA for Treponema Pallidum Specific Antibodies Detection in Comparison with ELISA // J Clin Lab Anal. - 2015. - Feb 25. doi: 10.1002/jcla.21839.

5 Wastling J.M. and Mattsson J.G. Detection of Toxoplasma gondii // J. Methods in Molecular Biology. – 2003. – Vol. 216. – P. 289-298.

6 Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. М.: Изд-во «Мир». - 1979. - С. 267.

7 Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Дж., Линг Н.Р. Антитела. Методы. – М.: Мир, 1991. – С. 287.

8 Сайдулдин Т.С. Основы серологии. – Алма-Ата: Ғылым, 1992. – 272 с.