

« М.А. Гендельманның 110 жылдығына арналған «Сейфуллин окулары – 19» халықаралық ғылыми-практикалық конференциясының материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 19», посвященной 110 - летию М.А. Гендельмана» - 2023.- Т.І, Ч.ІІ.- Б.215-217.

ИХТ ҚҰРАСТЫРУ БАРЫСЫНДА ПОЛИКЛОАЛДЫ АНТИДЕНЕ МЕН КОЛЛОЙДТЫ АЛТЫН КОНЪГАЦИЯСЫН ПАРАМЕТРЛЕРІН ОҢТАЙЛАНДЫРУ

УДК: №632.938: 576.8(043.2)

*Жумат А.С., 2-курс магистранты,
Жумалин А.Х., жетекші ғылыми қызметкер
Әкібеков Ө.С., в.з.к., қауымдастырылған профессоры
С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті,
Астана қ.*

Трихинеллез (*Trichinellosis*) – *Trichinella* тұқымдасының нематодтары тудыратын жануарлар мен адамның инвазиялық ауруы, әсіресе етқоректілер арасында кең таралған және оларда асимптоматикалық түрде өтеді [1].

Ауру жабайы (борсық, қабан, морж, т.б.) және үй жануарларының (әсіресе, шошқаның) шала піскен етін жегенде жұғады.

Медициналық тәжірибеде трихинеллезға диагнозды иммунологиялық әдістермен (ИФТ, КБР және т.б.) қояды. Жануарларға диагнозды көбінесе өлгеннен кейін – трихинеллоскопия әдістерімен немесе жасанды асқазан сөліндегі қорыту әдістерімен қойылады [2].

Иммунохимиялық тест жүйелері медициналық және ветеринариялық диагностикада кеңінен қолданылады. Индеттің бар-жоғын сенімді анықтауға мүмкіндік береді. Бірқатар аурулар үшін телімді антигендер мен антиденелерді диагностикалық бақылаудың негізгі құралы болып табылады [3].

Иммунологиялық әдістер қандағы телімді антиген мен антиденелді анықтауға негізделген. Иммунологиялық әдістердің ішінде телімділігі мен сезімталдылығы жақсы әдіс ол – имунды хромотографиялық талдау (ИХТ). Жоғарыда айтылғандарды ескере отырып, біз трихинеллез қоздырғышын анықтау үшін жедел-тест жасау бойынша зерттеулер қымбат құрал-жабдықтарды қолданбай жүзеге асыру міндетін қойдық. Реакция компоненттерінің иммунохимиялық әрекеттесуі 15-20 минут ішінде жүргізуге мүмкіндік береді [4,5]. Мұндай тесттерді құрастыру бірнеше компоненттерді жасауды талап етеді, олардың негізгісі конъюгат (коллоидты алтынмен таңбаланған поликлонды антиденелер).

Жұмыстың мақсаты – поликлоналды антидене мен коллоидты алтын нанобөлшектерінің конъюгациялау параметрлерін оңтайландыру.

Зерттеу материалдары мен әдістері.

Зерттеу жұмыстары Қазақстан Республикасының Ғылым және Жоғары білім министрлігі қаржыландыратын № АР09058176 «Трихинеллезді балауға арналған экспресс – тест» ғылыми жоба тақырыбы аясында С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ауылшаруашылық Биотехнологиясының Ғылыми-Зерттеу Платформасында жүргізілді.

Зерттеудің материалдары мен әдістері. Зертханалық жануарларды трихинеллездің антигендерімен иммундеу арқылы алынған телімді поликлоналды антиденелер қолданылды. Алтын-хлорсутекті қышқылының сутегі ерітіндісі HAuCl_4 («Sigma-Aldrich», АҚШ), саңылауларының диаметрі әр түрлі нитроцеллюлозды мембраналар CNPF (5 μ), CNPF (8 μ), CNPF (10 μ), CNPC (15 μ), үлгі енгізіге арналған мембраналар (TYPE-GBF-R7L), коллоидты алтынды конъюгаттын енгізуге арналған талшықты мембраналар (TYPE-RT-R5) және адсорбциялаушы мембраналар (TYPE-AP-045) өндіруші компания Advanced Microdevices (Ambala Cantt, Үндістан).

Коллоидты алтынды дайындау. Бөлшектердің қажетті мөлшері бар коллоидты алтын ерітінділерін Френс әдісімен жасалды [6]. Бұл үшін 0,01% алтын-хлорсутегі қышқылының сутегі ерітіндісі HAuCl_4 ("Sigma") колбада қайнағанға дейін магнитті араластырғышта қыздырып, белсенді араластыра отырып 1 % натрий цитратының ерітіндісін қостық. Ерітіндіні 15 мин қайнатып, содан соң суытып 4-6 °C-та сақтадық.

Антидене (ПКА) конъюгаттары мен коллоидты алтын нанобөлшектерін оңтайландыру үшін 3 әдіс қолданылды.

Бірінші әдіс. КА ерітіндісінің рН-ы калий карбонатымен 8.5-ке жеткізілді, содан кейін рН 8.5 болатын 10 мм Tris-HCl буферіндегі антиденелер (ПКА және) мен БСА ерітінділері тамшылатып қосылды. Инкубациядан кейін 30 минут ішінде алынған конъюгатты байланыспаған антиденелерден үш рет 10 000 айн/мин центрифугалау арқылы 30 минут ішінде тазарту жүргізілді.

Екінші әдіс. 10 мл коллоидты алтын ерітіндісінің рН 7,0-7,5 жеткізіп, 1 мл антидене ерітіндісін тамшылатып қосып 30 минут бойы араластырамыз. Содан кейін алынған ерітіндіге соңғы концентрацияға дейін 1% БСА және Tris-HCl қосылды. Байланыспаған антиденелерден тазалау үшін конъюгат центрифугаланады (30 мин, 11000 айн/мин, 4°C). Тұнба үстіндегі сұйықтық алынып тасталады, тұнба қажетті мөлшерде 1% БСА қосылған Tris-HCl буферімен қайта ерітіледі. Дайын конъюгат +4°C температурада сақталды.

Үшінші әдіс. Коллоидты алтынның 10 мл ерітіндісінің рН-ын 9-ға калий карбонатымен жеткізілді. 10 мм Tris-HCl буферіндегі антиденелер (ПКА және Protein A) мен БСА ерітінділері тамшылатып қосылды. Инкубациядан кейін 30 минут ішінде алынған конъюгатты байланыспаған антиденелерден үш рет 10 000 айн/мин центрифугалау арқылы тазарту жүргізілді. Тұнба 1% БСА қосылған Tris-HCl буферімен қайта ерітіледі.

Жасалған конъюгаттардың белсенділігін нитроцеллюлоза мембранасында (НЦМ) ИФТ «нүктелік» қойылымы арқылы тексерілді. Трихинеллездің антигені нитроцеллюлоза мембранасының жолақтарына 1:1 сұйылтудан бастап фосфатты тұз ерітіндісінде (ФТЕ) титрленіп 1 мкл

мөлшерінде енгізілді. Бейспецификалық адсорбция болдырмау мақсатында, НЦМ 1%-ды БҚС көмегімен бекітілді. Реакцияның әр сатысында НЦМ жолақшалары Tween-20 қосылған ФТЕ буферінде 3 рет жуылды. Реакцияның келесі сатысында дайындалған конъюгат ерітінділері енгізіліп, 15 минут бойы термостатта инкубацияланды. Реакция нәтижелері визуалды түрде бағаланды. Нәтижесінде үшінші әдіс бойынша жасалған конъюгат трихинелла антигенімен жақсы байланысты және оның титрі 1:8 – 1:16 қатынсаында болды. Ал бірінші және екінші әдіс бойынша әзірленген конъюгаттардың антигенмен байланысу титрі төмен (1:1 – 1:2) болды.

Жасалған жұмыстардың нәтижесінде поликлоналды антидене мен коллойдты алтын нанобөлшектерінің конъюгация параметрлерін оңтайландырылды және конъюгаттардың қажетті мөлшері алынды. Конъюгат әзрлеу үшін қолданылған Protein A оңтайлы концентрациясы 5 мкг/мл құрады, ал ПКА – 0,1 мг/мл. Көрсетілген деңгейден антиденелерді көп енгізу фондық сигналдың пайда болуына әкеледі. Осылайша, трихинеллезге телімді антиденелер мен коллойдты алтын нанобөлшектерінің конъюгаты дайындалды және алынған конъюгаттар трихинеллез індетін балау үшін иммунохроматографиялық тест құрастыруда қолданылады.

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі:

- 1 Бритов В. А. Возбудители трихинеллеза[Текст]: В. А. Бритов. – М. : Наука, 1982. – 272 с.
- 2 Ryan K.J. Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. [Текст]/ Ryan K.J., Ray C.J. Sherris// New York: McGraw-Hill, - 2004.- P.-925.
- 3 Долгов В.В., Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство[Текст] // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2012. – Т. 1. – С. 928.
- 4 Chareonsirisuthigul T. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis [Текст]/ Chareonsirisuthigul T., Khositnithikul R., Intaramat A., Inkomlue R., Sriwanichrak K., Piromsontikorn S., Kitiwanwanich S., Lowhnoo T., Yingyong W., Chairasert A. // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2013. – V. 76, No 1. – P. -42-45.
- 5 Birhanu H., Surra Sero K-SeT, a new immunochromatographic test for serodiagnosis of Trypanosoma evansi infection in domestic animals [Текст]/ Birhanu H., Rogé S., Simon T., Baelmans R., Gebrehiwot T., Goddeeris B. M., Büscher P. Surra // Veterinary Parasitology. – 2015. – V. 211, No 3. – P. -153-157.
- 6 Grimaldi G., Teva A., Ferreira A. L., dos Santos C. B., Pinto I. d.-S., de-Azevedo C. T., Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid

test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis [Text]/ Grimaldi G., Teva A., Ferreira A. L., dos Santos C. B., Pinto I. d.-S., de-Azevedo C. T., Falqueto A. // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2012. – V. 106, No 1. – P. -54-59.

7 Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [Text] // Nature Phys. Sci. – 1973. – №241. – P. -20-22.