Рахманова С.С., Казаков Х.А., Норбаева Б.О. кизи
Суждение о значимости активной реакции для фиксации антигена на твердофазный
носитель для иммуноферментного анализа

*ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф.
В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ
(Россия, Красноярск)*

doi:10.18411/spc-15-05-2019-16

idsp: sciencepublic-15-05-2019-16

Аннотация

Целью исследования было оценка влияния pH среды на степень фиксации антигена микроорганизмов на полистироловые 96-ти луночные планшеты в эксперименте. Установлено, что при выборе твердофазного носителя и фиксации на нем антигена нужно учитывать pH сред, которые непосредственно влияют на степень адсорбции нагруженных антигенов.

Abstract

The aim of the study was to evaluate the effect of pH on the degree of microbial antigen fixation on polystyrene 96-well plates in the experiment. It has been established that when choosing a solid-phase carrier and fixing an antigen on it, it is necessary to take into account the pH of media that directly affect the degree of adsorption of loaded antigens.

Иммуноферментный анализ (ИФА) - лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов [2, 4]. Метод ИФА был предложен в начале 70-х годов прошлого столетия Engvall и Perlmann в Швеции, van Weemen и Schuur в Нидерландах и Rubenstein с соавторами в США [1, 3].

Сущность ИФА заключается в специфическом взаимодействии антитела и антигена возбудителя с последующим присоединением к полученному комплексу конъюгата (энзиммеченых антивидовых человеческих IgM, IgG, IgA). Фермент вызывает разложение хромогенного субстрата с образованием окрашенного продукта, который выявляется визуально или фотометрически. Регистрацию результатов реакции проводят на специальных фотометрах с вертикальным лучом при определенной длине волны. Результат выражают в единицах оптической плотности [2, 6].

Существует множество вариантов постановки, из которых наибольшее практическое значение получил гетерогенный твердофазный ИФА (indirect ELISA). В качестве твердой фазы во многих коммерческих диагностических наборах используют полистироловые 96-ти луночные планшеты [5, 6, 7].

Фиксация антигена возбудителя на лунки полистироловых 96-ти луночных планшетов зависит от многих факторов и одним из основных является активная реакция (pH) буферной среды.

В связи с этим **целью** исследования было оценка влияния активной реакции (pH) среды на степень фиксации антигена микроорганизмов на полистироловые 96-ти луночные планшеты в эксперименте.

Материалы и методы. Нами в эксперименте для получения антигенов были использованы грамположительные кокки, грамотрицательные бактерии, Candida sp. Для сравнения получали антигены из Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae и Candida albicans (таблица). Культуры микроорганизмов получены из «Национальной коллекции микроорганизмов инфекций человека» НИИ ЭМИЗ МЗ РУз.

Таблица

Культуры микроорганизмов, из которых получали комплексный микробный антиген в эксперименте

Штаммы	Регистрационный №	Источник выделения
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	003778/155	Копрокультура
<i>Enterococcus faecalis</i>	003460/ «СВ»	Уринокультура
<i>Staphylococcus aureus</i>	003994/ Wood - 46	Гемокультура
<i>Staphylococcus aureus</i>	003702 /14-B	Биликультура
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	003063 \306	Гной из костей
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	004145 /МЗ-87	Слизистая носа
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	000691/691	Копрокультура
<i>Escherichia coli</i>	002673/477	Копрокультура
<i>Candida albicans</i>	/7	Слизистая зева

Штаммы использовали в виде инаktivированных бактериальных взвесей с концентрацией 10^9 микробных тел/мл, прогретые при 80°C в течение 30 минут. Этот режим позволяет сохранить структуру белков, обеззаразить бактериальную взвесь. В эксперименте в качестве антител использовали IgG кроликов.

Результаты и их обсуждение. Антигены получали по Буавену - комплексный микробный антиген, путем экстракции суточной культуры микроорганизмов трихлоруксусной кислотой.

Известно, что для нагружения антигенов применяют забуференный физиологический раствор (рН 7,2-7,5), натрий-карбонатный (0,05 моль/л, рН 9,0), боратный (0,05 моль/л, рН 8,0) и трис-НСI (0,05 моль/л, рН 8,0) буферные растворы. Значения рН и ионная сила их могут варьировать [5].

Для создания экспериментальных тест-систем в лунки полистирольных 96-ти луночных планшетов вносили по 1,0 мкг антигена в 0,1М Na-бикарбонатном буфере с рН $9,7 \pm 0,1$ и оставляли на 16 часов при 4°C . По окончании фиксации микробного антигена буфер удаляли путем промывки 0,01М Na-фосфатным буфером с рН $7,3 \pm 0,1$ с 0,15М NaCl и 0,1% Твин-20. Результаты учитывали спектрофотометрически при длине волны 492 нм на иммуноферментном планшетном анализаторе «Stat Fax-300» (США).

Белковые антигены адсорбировались на твердофазном носителе интенсивнее при высоких значениях активной реакции (рН), когда их заряд отрицателен и максимален по величине. В то же время взаимодействия иммунных реагентов на следующих этапах постановки ИФА оптимальны при физиологических значениях рН. Установлено, что существенное снижение рН буферной среды во время инкубации нагруженных антигеном тест-планшетов с иммунными реагентами привело к его десорбции.

Используемый в эксперименте для создания экспериментальной тест-системы твердофазный носитель (полистироловый 96-ти луночный планшет) должен: обладать высокой связывающей способностью по отношению к иммобилизуемому реагенту; незначительно десорбировать реагент; иметь низкий уровень неспецифического связывания; обладать воспроизводимыми свойствами [6]. Нами были выбраны для эксперимента тест-планшеты именно отвечающие на все эти требования.

В зависимости от способа обработки поверхности, применяемые в настоящее время для пассивной адсорбции полистирольные носители подразделяются на 3 типа: тип X - зарядовый индекс 1, характеристика поверхности неполярная гидрофобная, связывание IgG среднее; тип Y - зарядовый индекс 12, характеристика поверхности полярная гидрофобная, связывание IgG эффективное; тип Z, зарядовый индекс 200, характеристика поверхности полярная гидрофильная, связывание IgG не эффективное.

В эксперименте проверены все три типа носителей. Из-за идентичных показателей типов X и Y, мы приводим данные носителей только X и Z. Влияние pH среды на связывание белков с полистиролами X и Z показаны на рисунках 1 и 2 соответственно.

Сорбирующая способность полистирола X, имеющего гидрофобную поверхность, сильно зависит от pH и ионной силы раствора (рисунок 1).

Рисунок 1. Влияние pH на связывание антител с полистиролом типа X

Оптимальные результаты в эксперименте были получены при использовании буферного раствора с низкой pH и носителя типа Z, который соответствовал изоэлектрической точке белка (рис. 2).

Белковые антигены использованных в эксперименте штаммов микроорганизмов адсорбировали при 4°C в течение 14 часов. После связывания иммунных комплексов на тест-планшете для предотвращения неспецифического связывания с фиксированным антигеном других иммунных реагентов на следующих этапах анализа проводили блокировку свободных мест на твердофазном носителе. Применяли различные белки и неионные детергенты - 1% раствор бычьего сывороточного альбумина, 0,5% раствора желатина, 5% раствор нормальной сыворотки, 0,05-0,5% растворы тритон X-100 и Твин-20.

Рисунок 2. Влияние pH на связывание антител с полистиролом типа Z

Использованные блокирующие вещества и иммунные реагенты растворяли в том же буферном растворе, что и адсорбированный антиген. Полученные иммунные адсорбенты

хранили продолжительное время (в течение 8 месяцев) при 4⁰С без потери специфической активности иммунных реагентов. Их десорбцию предотвращали, внося блокирующий раствор, который содержит 0,02% азида натрия. Поскольку азид натрия является ингибитором пероксидазы хрена, экспериментальные тест-планшеты перед инкубацией с иммунным реагентом, конъюгированным этим ферментом, отмывали буферным раствором для прекращения действия азида натрия.

Продолжительность и условия проведения инкубации адсорбированного иммунного реагента с тестируемыми субстратами и с реагентами на разных этапах проведения ИФА в эксперименте подбирали эмпирически.

Выводы. 1. При выборе твердофазного носителя (полистирольный 96-ти луночный планшет) и фиксации на нем антигена нужно учитывать pH буферных сред, которые непосредственно влияют на степень адсорбции нагруженных антигенов.

2. Оптимальные результаты по фиксации микробных антигенов в эксперименте были получены при использовании отрицательно заряженного полярного гидрофильного полистирола типа Z, при применении буферного раствора с низкой активной реакцией (pH).

1. Авазова Д.Э., Онгарбаев А.Б., Мусабаев Э.И. Создание референтной панели сывороток содержащих и не содержащих антитела к ВИЧ 1/2 для определения качества ИФА тест-систем, используемых в Республике Узбекистан // Журнал теоретической и клинической медицины. - Ташкент, 2005. - №2. - С.79-83.
2. Егоров А.М., Осипов А.П. Теория и практика иммуноферментного анализа. - Москва, Высшая школа, 1991. - 186 с.
3. Колосова А.Ю., Блинцов А.Н., Самсонова Ж.В., Егоров А.М. Разработка твердофазного иммуноферментного анализа гентамицина в сыворотке крови человека // Антибиотики и химиотерапия. - Москва, 1998. - №2. - С.9-13.
4. Манжос М.В., Шкадов С.А., Никишин А.В. Иммуноферментный метод определения специфических антител в слюне больных полинозом // Клиническая лабораторная диагностика. - Москва, 2006. - №5. - С.44-45.
5. Павлов С.Б. Иммуноферментный анализ. Интерпретация результатов // Клиническая антибиотикотерапия. - Москва, 2000. - №1. - С.16-18.
6. Таранов А.Г. Диагностические тест-системы: радиоиммунный и иммуноферментный методы диагностики. - Новосибирск: Изд-во НГУ, 2000. - 260 с.
7. Флуер Ф.С., Прохоров В.Я., Веснина А.Ф., Акатов А.К. Иммуноферментная тест-система для определения стафилококкового энтеротоксина типа С // Журнал микробиологии. - Москва, 2002. - №6. - С.65-68.

Дьячук И.С, Файзуллин Э.Р.

Цитокины как биологические маркёры онкопатологий

*ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет
(Россия, Уфа)*

doi:10.18411/spc-15-05-2019-17

idsp: sciencepublic-15-05-2019-17

Аннотация

Изучен уровень синтеза провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α) и экспрессии маркеров апоптоза (CD-95-L, Bcl-2) лимфоцитами периферической крови у больных с тяжелым ЯК на фоне индукционного курса биологическим препаратом инфликсимабом. Результаты многих исследований свидетельствуют о исходно высокой продукции иммунокомпетентными клетками крови провоспалительных медиаторов, в частности, ФНО- α и ИЛ-1 β , и о нарушении процесса апоптоза при тяжелом течении онкологических заболеваний.

Ключевые слова: цитокины, интерлейкины, хемолейкины, меланома, фактор некроза опухолей.