

Спектрофотометрическая характеристика конъюгатов иммуноглобулинов для диагностики возбудителей особо опасных инфекций

© А.Н. Спицын¹, Д.В. Уткин¹, М.Н. Киреев¹, М.В. Овчинникова¹, О.С. Кузнецов¹,
П.С. Ерохин¹, В.И. Кочубей^{2,3}

¹ Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“ Роспотребнадзора,
410005 Саратов, Россия

² Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
410012 Саратов, Россия

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет,
634050 Томск, Россия

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила в редакцию 25.02.2019 г.

В окончательной редакции 16.04.2019 г.

Принята к публикации 28.10.2019 г.

Рассмотрена возможность применения спектрофотометрического анализа для характеристики флуоресцирующих иммуноглобулинов в качестве метода контроля. Проведен сравнительный анализ оптических свойств препаратов флуоресцирующих иммуноглобулинов и компонентов, входящих в их состав — иммуноглобулинов, флуорохрома. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предложенный методический подход оптического детектирования меченых молекул иммуноглобулинов может явиться перспективным для контроля получения конъюгатов, используемых при постановке иммунологических реакций по выявлению специфических антигенов возбудителей особо опасных инфекции.

Ключевые слова: спектрофотометрия, иммуноглобулины, конъюгаты, ФИТЦ.

DOI: 10.21883/OS.2020.03.49071.76-19

Введение

Впервые возможность присоединения флуоресцирующих молекул к антителам была представлена Альбертом Кунсом в 1942 г. [1]. Разработанный метод применялся исследователем для обнаружения пневмококкового антигена в тканях. Метод, получивший название метод флуоресцирующих антител (МФА) или иммунофлуоресценция, основан на использовании специфичности иммунологической реакции и чувствительности люминесцентной (флуоресцентной) микроскопии [2]. В настоящее время МФА имеет широкое распространение и является важной составляющей в биологических и медицинских исследованиях, в том числе для специфической индикации возбудителей особо опасных инфекционных болезней.

Различают прямой метод МФА (пМФА), разработанный Кунсом и Мелвином Капланом [3], и непрямой МФА (нМФА), представленный Томасом Уиллером и Кунсом [4]. При прямом методе на исследуемый образец — препарат с антигеном — наносят известную, предположительно соответствующую ему сыворотку с флуоресцентными антителами. В случае образования комплекса „антиген–антитело“ прикрепившиеся антитела обнаруживаются с помощью люминесцентной микроскопии в виде флуоресцентного сигнала разной степени интенсивности, определяемой визуально исследователем

и зависящей от количества меченых флуорохромом антител, присоединенных к клетке. При проведении непрямого анализа на антиген наносят немеченую к искомому возбудителю иммунную сыворотку. В случае соответствия антител сыворотки антигену происходит образование иммунного комплекса „антиген–антитело“. Далее на препарат наносят антивидовую сыворотку с флуорохромом. Таким образом, антитела первой сыворотки служат антигеном для меченых антител антивидовой сыворотки. Образовавшийся двойной комплекс определяется с помощью люминесцентного микроскопа. Непрямой метод является более универсальным, так как использование одной флуоресцирующей сыворотки позволяет выявлять различные виды микроорганизмов.

Меченые флуоресцирующим красителем антитела сохраняют способность вступать в специфическую реакцию с гомологичным антигеном, положение которого определяется посредством люминесцентной микроскопии по характерному свечению, возникающему после возбуждения флуоресцирующего агента ультрафиолетовым излучением. Основными требованиями к флуорохромам, используемым для мечения специфических белков, являются отличие цвета их флуоресценции от аутофлуоресценции исследуемого объекта, контрастирование с фоном, высокая интенсивность флуоресценции после конъюгации с белком, а также сохранение основных физико-химических, серологических свойств

антител. В качестве флуорохрома применяют изотиоцианат флуоресцеина (ФИТЦ) [5,6], сульфохлорид родамина (РСХ) [7,8], сульфотриодид родамина (РСФ) [9,10], тетраметилродамин изотиоцианат (МРИТЦ) [11,12], дихлортриазиниламинофлуоресцеин (ДХТАФ) [13,14] и др. Такие органические соединения обладают желто-зеленым, желтым и красным свечением. Наиболее часто в качестве метки антител используется краситель ФИТЦ. Данный краситель, имеющий молекулярную формулу $C_{21}H_{11}NO_5S$, вызывает зеленое свечение, он ковалентно связывается с биомолекулами через функциональную группу NCS и обладает высоким квантовым выходом [15,16]. Максимумы длин волн поглощения и флуоресценции составляют 495 и 520 nm соответственно [17], благодаря чему сведена к минимуму фоновая флуоресценция биологических образцов.

Контроль получения конъюгированных антител традиционно осуществляется с использованием метода флуоресцирующих антител. Также рекомендуется для каждого конъюгата определять молярное соотношение краситель/белок оптическими методами. В спектре поглощения меченого антитела присутствуют пик красителя и пик поглощения антитела. Для того чтобы вычислить степень мечения (число молекул флуорохрома, введенных на одну молекулу антитела), необходимо измерить оптическую плотность раствора при максимуме поглощения антител (A_{AB}) и длине волны максимума поглощения красителя (A_{Dye}). Число молекул флуорохрома на одну молекулу антитела рассчитывается [18] по формуле

$$\frac{D_{ye} \epsilon_{AB}}{AB} = \frac{A_{Dye} \epsilon_{AB}}{(A_{AB} - A_{Dye} CF) \epsilon_{Dye}}, \quad (1)$$

где D_{ye}/AB — искомое число молекул красителя на молекулу антитела, A_{Dye} — оптическая плотность образца на длине волны максимума поглощения красителя, A_{AB} — оптическая плотность образца на длине волны максимума поглощения белков (280 nm), ϵ_{AB} — мольный коэффициент экстинкции антитела на длине волны 280 nm (для IgG — 210000), ϵ_{Dye} — мольный коэффициент экстинкции красителя на длине волны максимума поглощения (для ФИТЦ $72000 M^{-1} cm^{-1}$), CF_{280} — фактор коррекции для красителя на длине волны 280 nm.

Ориентировочное определение концентрации белка (C) и молярного соотношения краситель/белок (Kp/δ) конъюгатов путем измерения оптической плотности (A) на различных длинах волн осуществляется [2] в соответствии с формулами

$$C \text{ (mg/ml)} = \frac{A_{280} - (0.35A_{495})}{1.4}, \quad (2)$$

$$\frac{Kp}{\delta} = \frac{2.87A_{495}}{A_{280} - (0.35A_{495})}. \quad (3)$$

При оптимальном соотношении Kp/δ

$$0.5 < \frac{A_{495}}{A_{280}} < 1.5.$$

Оптимальная степень мечения для получения хорошего флуоресцентного сигнала в большинстве случаев составляет 2–3 молекулы красителя на молекулу антитела. Дальнейший рост степени мечения не приводит к существенному усилению флуоресцентного сигнала, поскольку наблюдается концентрационное тушение флуоресценции. Если степень мечения недостаточна, необходимо уменьшить количество антитела, вводимого в реакцию.

Цель работы

Оценить возможность применения спектрофотометрического анализа для контроля получения флуоресцирующих иммуноглобулинов,

На примере ФИТЦ определить критерии связывания флуоресцентного красителя с антителами.

Материалы и методы

Оптическая схема для проведения спектрофотометрического анализа включала: — компактный источник излучения AvaLight-HAL (Avantes, Нидерланды) для измерений в спектральном диапазоне длин волн от 360 до 1700 nm;

— спектрометр высокого разрешения HR4000 (Ocean Optics, США) для регистрации спектральных характеристик исследуемых образцов в диапазоне длин волн 200–1100 nm;

— оптоволоконные кабели (Ocean Optics, США);

— держатель кювет (Avantes, Нидерланды);

— пластиковые спектрофотометрические кюветы UVette (Eppendorf, Германия) для измерения в диапазоне длин волн от 220 до 1600 nm.

В работе использовали:

— иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей (ФКУЗ РосНИПЧИ „Микроб“, рег. уд. № ФСР 2007/0881-240409), представляющие собой меченую флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) иммуноглобулиновую фракцию чумной агглютинирующей сыворотки;

— иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие (ФГБУ „НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи“, рег. уд. № ФСР 2010/08923), представляющие собой меченую флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) глобулиновую фракцию, полученную из лошадиной гипериммунной туляремийной сыворотки;

— иммуноглобулины диагностические чумные адсорбированные лошадиные для реакции агглютинации на стекле, лиофилизат для диагностических целей (ФКУЗ РосНИПЧИ „Микроб“, рег. уд. № ФСР 2008/02592-270409);

— сыворотку диагностическую туляремийную сухую для реакции агглютинации (ФКУЗ Иркутский НИПЧИ, рег. уд. № ФСР 2011/10029);

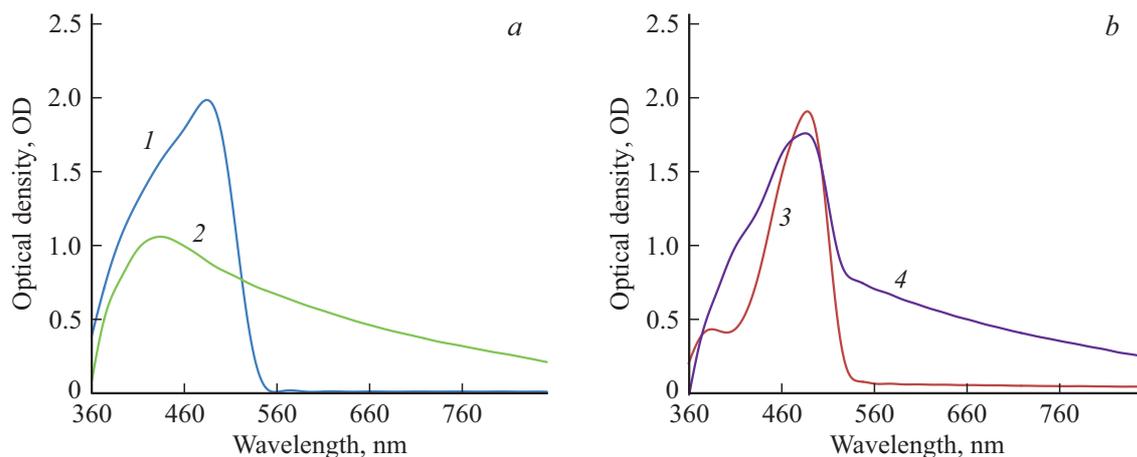


Рис. 1. Спектры поглощения: (а) 1 — раствор ФИТЦ; 2 — иммуноглобулины чумные; (б) 3 — иммуноглобулины чумные флуоресцирующие; 4 — смесь ФИТЦ и чумных иммуноглобулинов.

— флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ) (Sigma-Aldrich F7250-5G, США).

Конъюгация иммуноглобулинов с ФИТЦ

Концентрацию иммуноглобулинов доводили до 2% по белку и добавляли ФИТЦ из расчета 2–3 mg на 100 mg белка. Процесс конъюгирования происходил в холодильнике в течение 18 h при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке.

Удаление не связанного с иммуноглобулинами ФИТЦ проводили хроматографически с использованием колонки с сефадексом G-25.

Для удаления химически не связанного с белком флуорохрома полученный конъюгат наносили на подготовленную хроматографическую колонку, предварительно уравновешенную 0.15 M раствором хлорида натрия, содержащим 5% карбонатно-бикарбонатного буфера (КББ). Для элюирования меченого белка из колонки применяют тот же буфер.

Проверку активности готового конъюгата осуществляли люминесцентной микроскопией бактериальных клеток соответствующих инфекций. Специфичность выявляли с помощью микроскопии клеток других видов бактерий.

Экспериментальные измерения

Спектрофотометрический анализ и регистрацию спектральных характеристик флуоресцирующих чумных и туляремийных иммуноглобулинов, меченых ФИТЦ, немеченых иммуноглобулинов, ФИТЦ и смеси ФИТЦ и немеченых иммуноглобулинов осуществляли с использованием спектрометра HR4000 в соответствии с инструкцией по применению [19].

Перед началом измерений в программе управления спектрометром Spectra Suite (Ocean Optics, США) для

исключения спектра растворителя (физиологического раствора) и внешних световых излучений сохраняли опорный и темновой спектры. Для этого в чистую кювету наливали 100 μ l физиологического раствора, кювету помещали в держатель кювет и регистрировали опорный спектр при включенном источнике излучения и темновой спектр — при выключенном. Затем регистрировали спектр света, прошедшего через образец в 10 повторях в соответствии с прилагаемым к прибору руководством пользователя. Используемое программное обеспечение позволяет учитывать возможность перепоглощения и эффект внутреннего фильтра, а максимальное значение оптической плотности, измеряемой прибором, составляет 3.8. Оптическая плотность (поглощение света) исследуемых образцов на каждой длине волны рассчитывается в программе Spectra Suite по следующей формуле и представляется в виде графика-спектра:

$$A_{\lambda} = -\log_{10} \left(\frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \right), \quad (4)$$

где S_{λ} — аналитический сигнал на длине волны λ , D_{λ} — темновой сигнал на длине волны λ , R_{λ} — опорный сигнал на длине волны λ .

Спектры каждой пробы экспортировали в виде табличных данных в программу OriginTM (OriginLab Corp., США) для последующего анализа.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведения экспериментальной работы были получены спектры поглощения чумных и туляремийных иммуноглобулинов, меченых ФИТЦ, отдельно спектры поглощения ФИТЦ и немеченых иммуноглобулинов, а также спектр поглощения смеси немеченых иммуноглобулинов и ФИТЦ.

Установлено, что раствор ФИТЦ в воде имел максимум поглощения при длине волны 495 nm, что соответ-

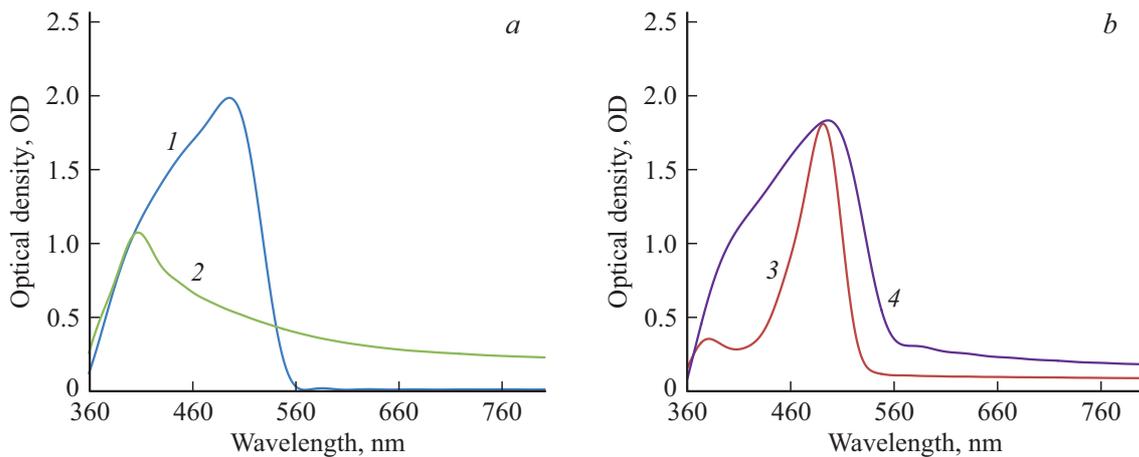


Рис. 2. Спектры поглощения: (а) 1 — раствор ФИТЦ; 2 — сыворотка туляремийная; (б) 3 — иммуноглобулины туляремийные флуоресцирующие; 4 — смесь ФИТЦ и туляремийных иммуноглобулинов.

ствовало литературным данным [20,21], и отсутствие поглощения при длине волны более 560 nm (рис. 1, а, 2, а). Спектры поглощения немеченых чумных и туляремийных иммуноглобулинов имели пиковые значения в области 380–450 nm с постепенным снижением в длинноволновой области, обусловленной светорассеянием растворов белков (рис. 1, а, 2, а). Кривая светорассеяния растворов белков на участке длин волн 500–850 nm описывалась с высокой степенью аппроксимации уравнением, предложенным W. Heller *et al.* [22] для описания светорассеяния сферических частиц (рис. 3):

$$A_{\text{scat}} = \beta \lambda^{-n}, \quad (5)$$

где A_{scat} — оптическая плотность, обусловленная светорассеянием, ОЕ; λ — длина волны, nm; β , n — коэффициенты.

При смешивании раствора ФИТЦ с немечеными иммуноглобулинами получали результирующий спектр поглощения (рис. 1, б, 2, б), равный математической сумме спектров поглощения ФИТЦ и немеченых иммуноглобулинов, что указывает на отсутствие взаимодействия между компонентами, составляющими смесь в момент смешивания и отсутствие других поглощающих компонентов в смеси.

Конъюгация белка с флуорохромом является химической реакцией, в результате чего образуется новое соединение, в котором краситель присоединен к белку ковалентной связью, следствием чего является изменение оптической (спектральной) характеристики полученного конъюгата (рис. 1, б, 2, б).

Спектральные кривые флуоресцирующих иммуноглобулинов после конъюгации с ФИТЦ и последующей очистки имели два четко выраженных максимума спектра поглощения, один из которых соответствовал поглощению антител в диапазоне 380–450 nm, но смещенному в коротковолновую область на 50 и 20 nm и сниженному по амплитуде на 60–70%, а второй — поглощению флуоресцентной метки при длине волны 495 nm (рис. 1, б, 2, б).

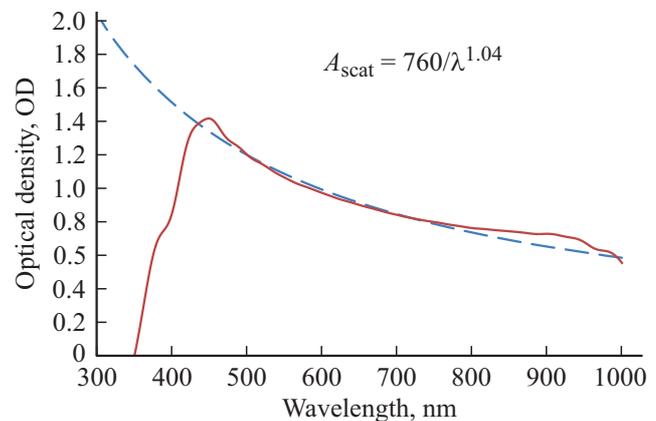


Рис. 3. Кривая оптической плотности чумных иммуноглобулинов (сплошная кривая) и математически рассчитанная кривая светорассеяния (штриховая кривая).

Выводы

В результате проведенных исследований были получены спектральные характеристики чумных и туляремийных иммуноглобулинов, меченых ФИТЦ. Изучение спектров поглощения флуоресцирующих иммуноглобулинов показало наличие двух максимумов поглощения: при длине волны 495 nm, соответствующей флуоресцентной метке, и 380 nm, характерной для немеченых иммуноглобулинов. В отличие от спектра поглощения сывороток, немеченых флуоресцирующей меткой, характерный пик поглощения антител располагался ближе к коротковолновой полосе на 50 и 20 nm, а также наблюдалось уменьшение интенсивности поглощения в этом спектральном диапазоне в среднем на 60–70%. Наличие двух пиков поглощения у флуоресцирующих иммуноглобулинов является критерием отличия готовых конъюгатов от смеси немеченых иммуноглобулинов и ФИТЦ и может использоваться для предварительного

контроля синтеза конъюгата на этапе производства флуоресцирующих иммуноглобулинов.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что метод абсорбционной спектрофотометрии позволяет дифференцировать по спектру поглощения флуоресцирующие иммуноглобулины, полученные в результате химической конъюгации иммуноглобулинов с красителем, от несвязавшихся с флуорохромом антителами и может быть использован для контроля получения флуоресцирующих конъюгатов в дополнение к люминесцентной микроскопии.

Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

- [1] Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N., Berliner E. // J. Immunol. 1942. V. 45. N 3. P. 159–170.
- [2] Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1987. 472 с.
- [3] Coons A.H., Kaplan M.H. // J. Exp. Med. 1950. V. 91. N 1. P. 1–13.
- [4] Weller T.H., Coons A.H. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954. V. 86. N 4. P. 789–794.
- [5] Talian J.C., Olmsted J.B., Goldman R.D. // J. Cell Biol. 1983. V. 97. N 4. P. 1277–1282. doi 10.1083/jcb.97.4.1277
- [6] Ogawa T., Aoyagi S., Miyasaka T., Sakai K. // Sensors. 2009. V. 9. N 10. P. 8271–8277. doi 10.3390/s91008271
- [7] Beija M., Alfonso C.A., Martinho J.M. // Chem. Soc. Rev. 2009. V. 38. N 8. P. 2410–2433. doi 10.1039/b901612k
- [8] Lefevre C., Kang H.C., Haugland R.P., Malekzadeh N., Arttamangkul S. // Bioconjugate Chem. 1996. V. 7. N 4. P. 482–489. doi 10.1021/bc960034p
- [9] Sivaraman G., Chellappa D. // J. Mater. Chem. B. 2013. V. 1. N 42. P. 5768–5772. doi 10.1039/C3TB21041C
- [10] Jiao Y., Zhu B., Chen J., Duan X. // Theranostics. 2015. V. 5. N 2. P. 173–187. doi 10.7150/thno.9860
- [11] Cunha-Reis C., El Haj A., Yang X., Yang Y. // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2013. V. 7. N 1. P. 39–50. doi 10.1002/term.494
- [12] Seo K.Y., Han S.J., Cha H.R., Seo S.U., Song J.H., Chung S.H., Kweon M.N. // J. Immunol. 2010. V. 185. N 6. P. 3610–3619. doi 10.4049/jimmunol.1000680
- [13] Denisov V.N. // Bull. Exp. Biol. Med. 1977. V. 83. N 4. P. 505–506.
- [14] Morrison S.A. // Int. J. Peptide Protein Res. 1984. V. 24. N 4. P. 377–385. doi 10.1111/j.1399-3011.1984.tb00965.x
- [15] Мчедлов-Петросян Н.О. // Вестн. Харьковского национального ун-та. 2004. В. 11 (34). № 626. С. 221–312.
- [16] Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 496 с.
- [17] Sert M., Cakir Koc R., Budama-Kilink Y.B. // Sci. Rep. 2017. V. 7. N 852. P. 1–7. doi 10.1038/s41598-017-00930-1
- [18] Электронный ресурс. Режим доступа: <https://ru.lumiprobe.com/manual/antibody-labeling-kits>
- [19] Спицын А.Н., Уткин Д.В., Киреев М.Н., Шаранова Н.А., Ерохин П.С., Германчук В.Г., Кочубей В.И. // Опт. и спектр. 2018. Т. 125. № 5. С. 716–720; Opt. Spectrosc. 2018. V. 125. N 5. P. 810–814. doi 10.1134/S0030400X18110280
- [20] Calcagno J.V., Sweeney M.J., Oels H.C. // Infect. Immun. 1973. V. 7. N 3. P. 366–399.
- [21] Chen K.F., Lee H., Liu J.T., Lee H.A., Lin C.H. // Forensic Sci. Int. 2013. V. 228. N 1–3. P. 95–99. doi 10.1016/j.forsciint.2013.02.045
- [22] Heller W., Kleven H.B., Oppenheimer H. // J. Chem. Phys. 1946. V. 14. N 9. P. 566–567. doi 10.1063/1.1724197