

# ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ

© 2000 г.

А. П. САВИЦКИЙ

*Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН*

I. Введение. II. Методы получения конъюгатов и их флуоресцентные свойства. Выбор металлопорфирина. III. Квантовый выход флуоресценции конъюгатов. IV. Времена жизни возбужденных состояний конъюгатов PdCP. V. Твердофазный анализ с десорбцией конъюгата с поверхности. VI. Мицеллярно–стабилизированный флуоресцентный иммуноанализ, вариант десорбции. VII. Флуоресцентный иммуноанализ человеческого тиреотропина. VIII. Мицеллярно–стабилизированный флуоресцентный иммуноанализ, вариант — измерение с поверхности без десорбции. IX. Циклодекстриновый флуоресцентный иммуноанализ. X. Универсальный флуоресцентный иммуноанализ. XI. Биспецифические антитела и их использование в флуоресцентном иммуноанализе. XII. Флуоресцентный иммуноанализ — измерение с сухой поверхности. XIII. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Фотолуминесцентный анализ с временным разрешением является одним из наиболее высокочувствительных и точных методов иммунохимического анализа [2, 4, 5]. Наибольшее практическое применение в настоящее получили методы с использованием ионов лантанидов, в частности ионов европия [7]. Однако в настоящее время неизвестны металлоорганические соединения с ионами лантанидов, а координационная природа связи этих ионов с биологическими соединениями создает немало проблем при проведении иммунохимических анализов [4]. Флуоресцентный иммуно-

---

*Принятые сокращения:* BSA — бычий сывороточный альбумин; CD–PhIA — циклодекстриновый флуоресцентный иммуноанализ; hCG — человеческий хориогонадотропин; hTSH — тиреостимулирующий гормон; MS–PhIA — мицеллярно–стабилизированный флуоресцентный иммуноанализ; MS–PhIA — hTSH — флуоресцентный иммуноанализ человеческого тиреотропина; PdCP — палладий копропорфирин; Pd–DMHP — палладий диметоксигематопорфирин; StAv — стрептавидин; Uni–PhIA — универсальный флуоресцентный иммуноанализ; СТАВ — цетилтриметиламмоний бромид.

анализ с использованием металлопорфиринов свободен от многих недостатков, присущих лантанидному методу, и в то же время практически не уступает ему по чувствительности. Вплоть до настоящего времени наиболее эффективной фосфоресцентной меткой является палладий копропорфирин (PdCP) [3].

Способы измерения фосфоресценции металлопорфиринов при комнатной температуре, как в водных растворах, так и на сухой поверхности в настоящее время хорошо разработаны и подробно описаны [6]. Эти приемы достаточно просты и хорошо согласуются практически со всеми методами и приемами, используемыми в современной иммунохимии. Разработанная в настоящее время реагентная база фосфоресцентного иммуноанализа включает в себя три основных группы реагентов:

- прямые конъюгаты металлопорфиринов с антителами, антигенами,
- не прямые методы, основанные на использовании биотинилированных антител или антигенов и авидинов, меченных PdCP,
- методы нековалентного маркирования, основанные на использовании антител, специфичных к палладий копропорфрину.

Настоящий обзор посвящен подробному описанию методов работы с данными тремя группами реагентов.

## **II. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЪЮГАТОВ И ИХ ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА. ВЫБОР МЕТАЛЛОПОРФИРИНА**

Наилучшей растворимостью в воде обладают металлопорфирины, имеющие в качестве боковых заместителей сульфогруппы или карбоксигруппы. Для получения конъюгатов металлопорфиринов с белками могут быть использованы различные активированные производные сульфогрупп и карбоксигрупп. Однако поскольку квантовые выходы фосфоресценции имеют максимальное значение для производных, содержащих карбоксигруппы [6], то основное внимание при получении конъюгатов и было уделено этой группе порфиринов. Наиболее простыми и хорошо разработанными являются методы получения конъюгатов через активированные эфиры с использованием N-гидроксисукцинимиды [12]. Количество карбоксигрупп в порфирине является критическим для гидрофобно-гидрофильного баланса и, как следствие, для неспецифической адсорбции конъюгатов порфиринов. Наиболее ярко это проявляется на конъюгатах стрептавидина с Pd-копропорфорином и Pd-диметоксигематопорфорином (рис. 1) [15].

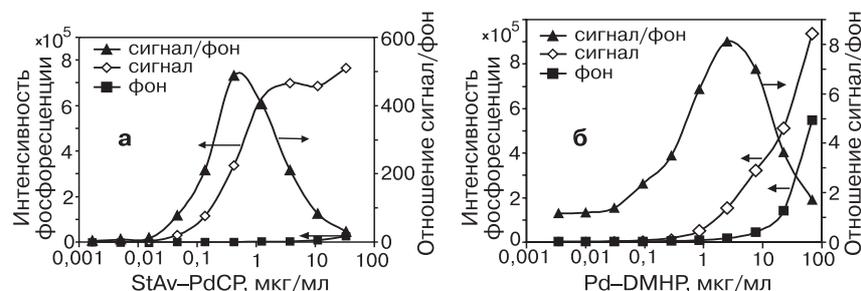


Рис. 1. Мицеллярно–стабилизированный фосфоресцентный иммуноанализ биотинилированных антител. Непрямой анализ с помощью комплексов стрептавидина.

В лунках микропланшета адсорбированы мышинные моноклональные антитела, добавлено 40 нг на лунку биотинилированных кроличьих антимышиных антител. Десорбция: 100 мкл 0,1 М КОН, 5% Triton X–405, 15 мин; измерение: 100 мкл  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (20 мг/мл) и  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (20 мг/мл).

а) Титрование StAv–PdCP. б) Титрование Pd–DMHP.

Так соотношение сигнал/фон для конъюгата StAv–PdCP (см. рис. 1а) составляет почти 500, в то время как для конъюгата StAv–PdDMHP не достигает и 10 (см. рис. 1б), при том, что максимальный сигнал для адсорбированных конъюгатов практически одинаков и составляет 700000–800000 импульсов.

Таким образом, оптимальным с точки зрения неспецифической сорбции и квантового выхода является PdCP.

### III. КВАНТОВЫЙ ВЫХОД ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ КОНЪЮГАТОВ

При связывании флуоресцирующих красителей с белками их квантовый выход часто изменяется. При ковалентном связывании карбодиимидным способом PdCP с белками его квантовый выход не изменяется, однако коэффициент усиления его фосфоресценции различными детергентами, как описано в работе [6], существенно изменяется. На рис. 2 приведены относительные квантовые выходы для различных конъюгатов PdCP.

Как видно из этого рисунка, эффективность усиления фосфоресценции конъюгатов тритоном X–405 по сравнению со свободным PdCP значительно ослабевает, что приводит к кажущемуся уменьшению квантового выхода фосфоресценции конъюгатов. В условиях реальных измерений это действительно приводит к уменьшению

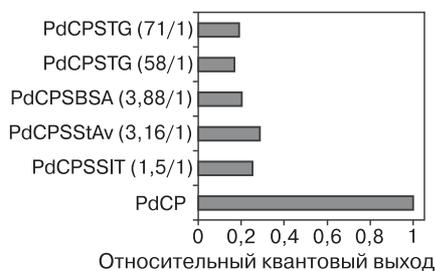


Рис. 2. Относительный квантовый выход конъюгатов PdCP с соевым ингибитором трипсина (PdCP–SIT), стрептавидином (PdCP–StAv), бычьим сывороточным альбумином (PdCP–BSA), тиреоглобулином (PdCP–TG).

В скобках приведено количество молекул PdCP на молекулу белка.

Буфер: 30 мг/мл  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 12 мг/мл  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5% TX–405, pH 7,27.

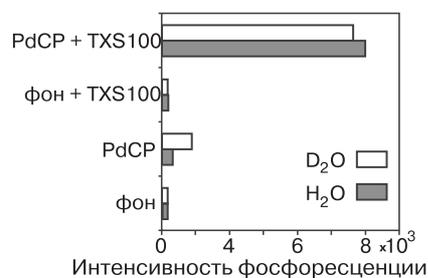


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции PdCP ( $4 \times 10^{-11}$  М) в обычной ( $\text{H}_2\text{O}$ ) и дейтерированной ( $\text{D}_2\text{O}$ ) воде в присутствии тритона X–100.

Буфер: 20 мг/мл  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 8 мг/мл  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1% TX–100, pH 7,2.

Как видно из этого рисунка, в дейтерированной воде интенсивность флуоресценции PdCP почти в 5 раз превышает интенсивность флуоресценции в обычной, в то время как добавка детергента к обоим типам воды приводит к практически одинаковому значению интенсивности флуоресценции свободного PdCP.

Конъюгация PdCP с белками, по–видимому, приводит к нарушению структуры мицелл вокруг порфирина и, возможно, к нарушению места локализации порфиринового макроцикла в мицелле: вместо ядра мицеллы это может быть структура, подобная слою Штерна. Нарушение структуры мицелл и локализации порфирина в них наиболее ярко иллюстрируется опытами с биотинилированными PdCP. По четырем карбоксильным группам PdCP карбодиимидным методом может быть присоединено четыре аминокислотных производных биотина (biotin cadaverin). Как показывают данные табл. 1 в отсутствие TX–100 химическое присоединение PdCP к белку StAv

предела детекции меченного соединения. Основная причина этого явления, как уже неоднократно отмечалось, связана с тушением флуоресценции PdCP водой [4, 14, 15]. В присутствии же детергентов порфирин уходит внутрь гидрофобного ядра мицеллы, и, таким образом, защищается от тушения водой [1, 13]. Прямым подтверждением этого является увеличение квантового выхода PdCP в тяжелой воде по сравнению с обычной водой и нивелировка этого эффекта детергентом (рис. 3).

Таблица 1  
**Относительные квантовые выходы палладий копропорфина  
и его конъюгатов с биотин-кадаверином и StAv**

	PdCP или его конъюгат	Относительный квантовый выход
1.	PdCP + 2% TX-100	1,00
2.	PdCP	0,05
3.	PdCP-StAv + 2% TX-100	0,43
4.	PdCP-StAv	0,11
5.	(PdCP/биотин-кадаверин = 1/4) + 2% TX-100	0,75
6.	PdCP/биотин-кадаверин = 1/4	0,04
7.	(PdCP/биотин-кадаверин = 1/4) + StAv	0,08
8.	(PdCP/биотин-кадаверин = 1/4) + StAv + 2% TX-100	0,74

не только не уменьшает квантовый выход фосфоресценции, но даже несколько увеличивает его (сравни строки 2 и 4 табл. 1). Однако как уже отмечалось выше, коэффициент усиления фосфоресценции PdCP тритоном X-100 в конъюгате значительно снижается (сравни строки 1 и 3 табл. 1). Химическая модификация всех четырех карбоксильных групп Pd-копропорфина (PdCP) биотин-кадаверином слабо влияет на квантовый выход фосфоресценции PdCP (сравни строки 2 и 6 табл. 1). Низкомолекулярное соединение биотин-кадаверин слабо влияет на усиление фосфоресценции PdCP тритоном X-100 (сравни строки 1 и 5 табл. 1). Таким образом, биотин-кадаверин слабо влияет на структуру мицелл вокруг PdCP, в отличие от высокомолекулярных соединений типа белков.

#### IV. ВРЕМЕНА ЖИЗНИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ КОНЪЮГАТОВ PdCP

Ковалентное присоединение палладиевых и платиновых порфиринов к белкам заметно влияет на их времена жизни в возбужденном состоянии. Для большинства конъюгатов становится характерна многоэкспоненциальность затухания фосфоресценции. Конъюгаты платинового копропорфина характеризуются наличием 2-х или 3-х экспонент, при этом многоэкспоненциальность становится более ярко выраженной при увеличении степени маркирования белка порфирином (см. PtCP-StAv). Такая же закономерность характерна и для конъюгатов PdCP: увеличение молекулярного веса белка и степени его маркирования приводят к ярко выраженному

многоэкспоненциальному характеру затухания фосфоресценции PdCP даже в простейших условиях в мицеллярном растворе TX-100 (табл. 2). Распределение между экспонентами для одного и того же конъюгата может зависеть и от природы детергента. В СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), как правило, времена жизни короче и распределение между быстрой, средней и медленной экспонентами другое по сравнению с TX-100. В общем случае многоэкспоненциальность является отрицательным фактором, поскольку несколько усложняет характер калибровочных кривых и может приводить к их различию от партии конъюгата.

Конъюгат PdCP–StAv является исключением из вышеописанного правила. Для этого конъюгата при степени маркирования 3–4 характерно либо одноэкспоненциальное затухание, либо ярко выраженное доминирование одной из экспонент (ее доля превышает 70%). Возможно это связано с тем, что стрептавидин состоит из 4-х субъединиц и предпочитительно одна и та же аминокислота реагирует на каждой субъединице. Таким образом микроокружение PdCP в конъюгате становится достаточно гомогенным, что и отображается в кинетиках затухания фосфоресценции.

По совокупности всех перечисленных свойств конъюгаты PdCP–StAv наилучшим образом удовлетворяют требованиям к конъюгатам для проведения иммунохимических экспериментов. Поэтому в дальнейшем в большинстве модельных и реальных экспериментов предпочтительно использовался именно этот конъюгат.

## **V. ТВЕРДОФАЗНЫЙ АНАЛИЗ С ДЕСОРБЦИЕЙ КОНЪЮГАТА С ПОВЕРХНОСТИ**

В настоящее время наиболее распространенным типом иммунохимического анализа является твердофазный вариант анализа с использованием полистирольных микропланшетов. Все эти методики аналогичны методу ELISA. Для такого рода методов разработан большой спектр универсальных считывающих устройств, так называемых ридеров. Все описываемые в дальнейшем измерения проводились на серийных приборах Arcus 1230, DELFIA Plate Florometer 1232 или 1234 фирмы Wallace, Финляндия, в которые было внесено только одно изменение: на этих приборах были установлены специальные фильтры для возбуждения (400 нм) и эмиссии (660 нм). В остальном эти приборы ничем не отличались от серийных. Особенностью оптической схемы этих приборов является фокусировка световых потоков на центр лунки микропланшета, поскольку метод DELFIA подразумевает десорбцию ионов ланта-

Таблица 2  
**Фотолюминесцентные свойства конъюгатов металлопорфиринов**

№	Конъюгат (белок, мол. масса, Да)	П/Б*	Условия измерения	Экспоненты						Относи- тельный квантовый выход
				быстрая		средняя		медленная		
				1**	2***	1**	2***	1**	2***	
1.	РdCP-GO (глюкозооксидаза MW = 55000)	1,3	Буфер	-	-	30	47,0	70	53	-
			TX-100	-	-	80	51,0	120	49,0	0,91
2.	РdCP-StAv (Стрептавидин MW = 60000)	11	ЛБ пленка в буфере	8,5	27,0	43	48,0	106	24,0	-
			TX-100	40,0	7,0	80	54,0	120	39,0	0,12
			Десорбция TX-100	-	-	80	58,6	120	41,3	-
			С поверхности под слоем TX-100	40,0	8,6	80	63,0	120	28,3	-
3.	РdCP-StAv	3,16	Сухая поверхность	40,0	14,9	80	75,5	120	9,6	-
			Merckoglas	-	-	80	79,9	120	20,1	-
			TX-100	-	-	-	-	920	100	0,31
			Десорбция TX-100	-	-	880	3,2	920	96,8	-
4.	РdDMHP-StAv	2	С поверхности под слоем TXS100	-	-	680	68,3	720	31,7	-
			Сухая поверхность	80,0	5,2	800	59,3	1080	35,5	-
			Merckoglas	120,0	9,3	960	9,2	1000	81,4	-
			TX-100	200,0	16,0	600	23,0	800	57,0	0,49
5.	РdCP-SIT (Соевый ингибитор трипсина MW = 25000)	1,5	Десорбция TX-100	-	-	720	51,8	760	48,1	-
			С поверхности под слоем TXS100	-	-	600	11,6	640	88,4	-
			Буфер	40,0	18,0	159	40,0	440	38,0	-
			TX-100	-	-	279	21,0	783	75,0	0,25
6.	РdCP-BSA (Бычий сывороточный альбумин MW = 65000)	3,88	СТАВ	40,0	24,0	147	39,0	459	37,0	-
			Буфер	64,0	29,0	240	33,0	640	31,0	-
			TX-100	138,0	20,0	680	31,0	760	47,0	0,20
			СТАВ	40,0	39,0	158	48,0	437	14,0	-
7.	РdCP-TG (Тиреоглобулин MW = 669000)	77	Буфер	-	-	40	45,0	246	55,0	-
			TX-100	77,0	15,0	520	37,0	680	38,0	0,19
			СТАВ	40,0	39,0	144	55,0	387	11,0	-

\* – отношение числа молекул порфирина на молекулу белка; \*\* – время жизни, мкс; \*\*\* – предэкспонента, %.

нидов с поверхности в усиливающий раствор. С целью совместимости с такого рода ридерной техникой был разработан ряд методов твердофазного анализа с десорбцией конъюгатов PdCP с полистирольной поверхности лунки микропланшета в объеме.

### VI. МИЦЕЛЛЯРНО–СТАБИЛИЗИРОВАННЫЙ ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ. ВАРИАНТ ДЕСОРБЦИИ

Десорбировать метку с поверхности ячейки полистирольного микропланшета можно разрушив взаимодействие антитело–антиген. Известно, что такое взаимодействие может быть разрушено или при очень низких (кислых) значениях pH, или при очень высоких (щелочных). Однако при таких значениях pH фосфоресценция PdCP полностью гаснет [6]. Это приводит к необходимости разделить стадию десорбции и измерения фосфоресцентного сигнала. Вариант щелочной десорбции является более универсальным, поскольку приводит не только к разрушению взаимодействия антитело–антиген, но и к разрушению взаимодействия белка с пластиком. Как видно из данных рис. 4а, pH–оптимум десорбции находится при pH 12, что соответствует 0,1 М щелочи. Наличие детергента в щелочном растворе оказывает заметное влияние на эффективность десорбции (рис. 4б).

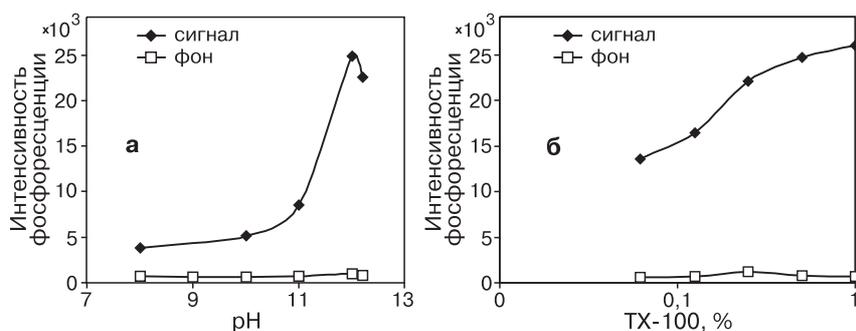


Рис. 4. Эффективность десорбции конъюгата PdCP с моноклональными антителами к человеческому хоригонадотропину (anti–hCG–PdCP).

В лунках микропланшета адсорбирован человеческий хоригонадотропин (10 мкг/мл), добавлено 500 нг/лунку конъюгата anti–hCG–PdCP, инкубация 1 час, измерение при pH 7,4.

а) Зависимость от pH при концентрации тритона X–100 1%.

б) Зависимость от концентрации тритона X–100 при pH 12.

Таким образом оптимальной является двухстадийная схема измерений:

1 – десорбция конъюгата PdCP 100 мкл 0,1 М раствором щелочи, содержащим 1% TX-100;

2 – нейтрализация до pH 7,2–7,4 и деоксигенация щелочного раствора равным объемом (100 мкл) буфера, содержащего 20 мг/мл  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 20 мг/мл  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Такая процедура является хорошо воспроизводимой и как уже указывалось ранее, условия деоксигенации в лунках микропланшета при объеме жидкости 200 мкл сохраняются в течение нескольких часов [6, 11].

Однако эффективность десорбции меченного соединения ниже, чем в случае лантанидных хелатов (табл. 3). В случае конъюгата StAv–PdCP удается десорбировать всего 6,5% метки, в то время как в случае конъюгата StAv–Eu удается десорбировать 28% метки. Это можно объяснить тем, что в случае конъюгата StAv–PdCP необходимо разрушать довольно прочную связь биотина со стрептавидином, в то время как в случае конъюгата StAv–Eu в усиливающем растворе происходит разрушение связи европия с хелатом и образование нового комплекса с дикетоном. Последний процесс, по-видимому, протекает более эффективно, чем разрушение связи биотин–стрептавидин.

Таблица 3  
Сравнительный материальный баланс десорбции  
для конъюгатов стрептавидина с PdCP и Eu

	StAv–Eu		StAv–PdCP	
	нМ	%	нМ	%
Добавлено	1,7	100	1,7	100
Десорбировано	0,47	28	0,11	6,5

В лунках микропланшета адсорбированы мышинные моноклональные антитела, добавлено 40 нг на лунку биотинилированных кроличьих антимышиных антител и либо StAv–PdCP, либо StAv–Eu.

Десорбция: для конъюгата PdCP 100 мкл 0,1 М KOH, 5% Triton X-405, 15 мин, измерение: 100 мкл  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (20 мг/мл) и  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (20 мг/мл); для конъюгата StAv–Eu усиливающий раствор фирмы Wallac, Финляндия.

## VII. ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ТИРЕОТРОПИНА

Человеческий тиреотропин (тироидстимулирующий гормон — hTSH) является гликопротеином, стимулирующим биосинтез тироидных гормонов щитовидной железой. Анализ этого гормона важен для ранней диагностики ряда врожденных заболеваний, в частности гипотиреоза. Для разработки сэндвич анализа была использована пара моноклональных антител, используемых в наборе DELFIA Neonatal hTSH, Wallac, Финляндия. Единственное отличие состояло в том, что вторые антитела были биотинилированы и для проявления был использован конъюгат PdCP–StAv. В лунки разборного микропланшета с адсорбированными первыми антителами (Wallac, Финляндия) одновременно добавляли стандарты hTSH и вторые биотинилированные антитела, затем инкубировали в течении 2 часов. После отмывки добавляли 20 нг конъюгата PdCP–StAv на лунку и инкубировали 15 мин. Затем проводили десорбцию и измерения по описанной выше схеме. Общее время проведения анализа составило 2,5 часа. Калибровочная кривая, измеренная на приборе Arcus 1230, Wallac (Финляндия) и приведенная на рис. 5, характеризуется хорошим динамическим диапазоном, покрывающим необходимый диагностический диапазон концентраций hTSH. Коэффициент вариации в этом диапазоне не превышает 7,5%.

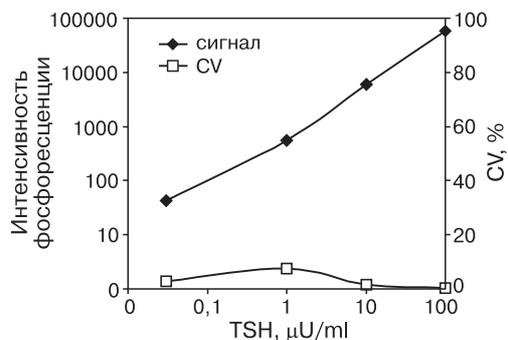


Рис. 5. Калибровочная кривая для определения тиреотропина.

Измерения проведены на приборе Arcus 1230, Wallac, снабженным фильтром 400 нм на возбуждении и 660 нм на регистрации, время задержки 200 мкс, время измерения — 800 мкс, накопление сигнала — 1 сек.

## VIII. МИЦЕЛЛЯРНО–СТАБИЛИЗИРОВАННЫЙ ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ. ВАРИАНТ — ИЗМЕРЕНИЕ С ПОВЕРХНОСТИ БЕЗ ДЕСОРБЦИИ

Как уже отмечалось выше, фосфоресцентный иммуноанализ с десорбцией конъюгата был специально разработан для адаптации

к уже имеющейся инструментальной базе. Однако, и это тоже отмечалось выше, полнота десорбции является критическим фактором и в уже разработанных методиках она, к сожалению, недостаточно высока, что приводит к снижению удельного сигнала, а это может вызывать снижение чувствительности. Поэтому были специально изучены условия, при которых возможно измерение флуоресценции в растворах, но без десорбции конъюгата. Это особенно важно для микроскопии, поскольку позволяет сохранить точку биоаффинного взаимодействия.

Добавки детергентов необходимы для предотвращения тушения водой и в то же время детергенты при высоких концентрациях (которые и используются в флуоресцентном иммуноанализе) могут разрушать взаимодействие антитело—антиген. Поскольку этот процесс рН—зависим (см. рис. 4), то был выбран нейтральный рН и более того, с целью предотвращения десорбции, в систему добавлялись вещества, обычно используемые для осаждения белков. В качестве такого вещества нами был выбран полиэтиленгликоль с молекулярным весом 6000 (ПЭГ 6000). Выбор обусловлен тем, что, как было показано в отдельных экспериментах, это соединение не тушит флуоресценцию PdCP. Схема экспериментов была следующая: измерения проводились на приборе Arcus 1230, в котором в силу особенностей фокусировки светового пучка возможно оптическое разделение фракции адсорбированной на дне или стенках ячейки и десорбированной в объем (рис. 6). В полистирольные микропланшеты с адсорбированными моноклональными антителами (antiTSH, Wallac) добавляли биотинилированные кроличьи антимышьи антитела (biotRAM, DAKO) в концентрации 1 мкг/мл, инкубировали 1 час, а затем после отмывки добавляли PdCP—StAv в концентрации 2 мкг/мл. После адсорбции конъюгата PdCP—StAv на поверхности проводилась отмывка и после добавления экспериментального состава буфера измерялась кинетика десорбции конъюгата в объем

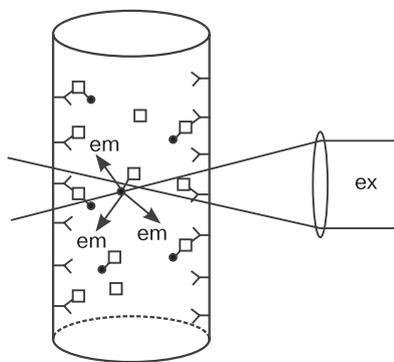


Рис. 6. Принципиальная схема анализа с адсорбцией антител на поверхности полистирольной пробирки и фокусировкой возбуждающего светового пучка на центр пробирки.

Оптически «видны» только молекулы, находящиеся в фокусе в центре пробирки. Вклад свечения с поверхности пренебрежимо мал.

в течение 2–х часов (типичное время иммунохимической реакции, рис. 7). По истечении 2–х часов микропланшеты снова отмывались, и проводилась десорбция конъюгата щелочным методом, как описано выше с использованием соответствующего детергента. После чего рассчитывался процент десорбции (табл. 4).

На рис. 7 приведены типичные кинетики десорбции для двух детергентов: тритона X–100 и СТАВ. За 2 часа десорбция не превышает 5%, при этом СТАВ более эффективно предотвращает десорбцию по сравнению с TX–100. В сводной табл. 4 приведены конечные значения десорбции для всех изученных детергентов. Минимальные значения десорбции наблюдаются для положительно заряженных детергентов и составляют около 2–х %. Поскольку обычно воспроизводимость измерений для данного типа задач составляет 5–10%, то в случае отсутствия близко расположенных в пространстве точек биоаффинного взаимодействия с различающимися на порядки сигналами, десорбцией 2–х % конъюгата можно пренебречь.

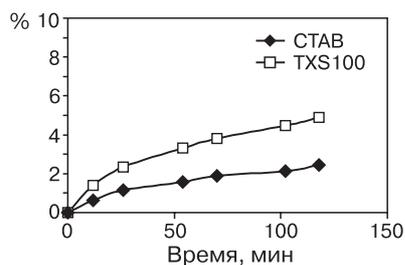


Рис. 7. Кинетика десорбции конъюгата PdCP–StAv в объеме для двух детергентов: СТАВ, 45 мкМ и TX–100, 0,6%.

Буфер: 20 мг/мл Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 8 мг/мл NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2.

Таблица 4  
Десорбция конъюгата PdCP–StAv за 2 часа инкубации при pH 7,4 в % от общего количества конъюгата, десорбирующегося 0,1М КОН в соответствующем детергенте

Детергент и его концентрация	Десорбция, 2 часа		%
	pH 7,2	0,1М NaOH	
BDHD, 0,1 мМ	14102	481290	2,8
TX-100, 0,6%	23463	478416	4,7
СТАВ, 45 мкМ	11397	465673	2,4
ВТС, 0,3 мМ	14782	451576	3,2
МВТС, 0,1 мМ	12582	458287	2,7
TX-405, 0,1%	17463	424427	4,0
TX-405, 5%	32205	441386	6,8
Tween 20, 0,1%	19734	401013	4,7
Tween 20, 0,5%	20103	407662	4,7

### IX. ЦИКЛОДЕКСТРИНОВЫЙ ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ

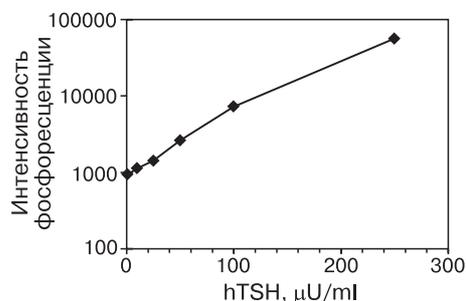
Мицеллярно–стабилизированный фосфоресцентный иммуноанализ основан на использовании недорогих и легкодоступных практически в любой лаборатории реагентах.

Циклодекстрины являются системой, альтернативной использованию детергентов. Одним из основных преимуществ их использования являются более высокие коэффициенты усиления фосфоресценции по сравнению с детергентами [6, 19]. Эффективность применения мет- $\beta$ -циклодекстрин–1,8 была продемонстрирована на примере анализа тиреотропина в схеме, аналогичной описанной в разделе IV. Только на последней стадии при десорбции было добавлено 100 мкл 0,1 М КОН, а через 15 мин, непосредственно перед измерением, был добавлен равный объем (100 мкл) буфера, содержащего 20 мг/мл  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 20 мг/мл  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и 2% мет- $\beta$ -циклодекстрина–1,8 (рис. 8).

Циклодекстрины, также как и детергенты, чувствительны к наличию ковалентной связи PdCP с белком и эффективность их применения для усиления фосфоресценции снижается при использовании конъюгатов PdCP.

Рис. 8. Калибровочная кривая для определения тиреотропина.

Измерения проведены на приборе Arcus 1232, Wallac, снабженным фильтром 660 нм на регистрации. На возбуждении использован стандартный фильтр для Eu. Время задержки — 300 мкс, время измерения - 700 мкс, накопление сигнала — 1 сек.



### X. УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ

Циклодекстрины, также как и детергенты, чувствительны к наличию ковалентной связи PdCP с белком и эффективность их применения для усиления фосфоресценции снижается при использовании конъюгатов PdCP. Однако к порфиринам могут быть получены моноклональные антитела с высокой константой афинности [9] и тогда возможно построение схем иммунохимического анализа без применения ковалентных сшивок между PdCP и белком [11].

Достоинством такого подхода является то, что на последней стадии анализа иммунный комплекс PdCP с антителами может быть разрушен и тогда ничто не будет препятствовать локализации PdCP в гидрофобном ядре мицеллы, что, соответственно, позволяет достигнуть максимальных коэффициентов усиления флуоресценции.

Гибридомы, продуцирующие такие антитела, были получены путем слияния иммунных мышиных спленоцитов с миеломной клеточной линией Sp2/0 по стандартной методике. Для иммунизации мышей линии BALB/C использовался конъюгат PdCP–BSA с соотношением метка/белок = 10/1. Как видно из табл. 5 наиболее высокоаффинные антитела 3D одинаково хорошо связываются как со свободным PdCP, так и с его конъюгатами. Эндогенные (природные) порфирины связываются с антителами 3D на несколько порядков хуже PdCP, поэтому вероятность перекрестных реакций достаточно мала [9].

Таблица 5  
Основные свойства моноклональных антител к PdCP

	Клон	Класс, подкласс	Асцитная жидкость		Изоэлектрическое фокусирование		Константы связывания, $\times 10^0$	
			Титр	Продуктивность (мг/мл)	pI основной полосы	Число полос	Свободный PdCP	Конъюгат PdCP–SIT (3/1)
1.	D3.F5	IgG1	500000	10	7,2	4	4,76	3,15
2.	D5.E3	IgG1	200000	10	6,5	6	49,9	54,8
3.	D9.E6	IgG2b	100000	5	5,5	5	211	145
4.	G6.D3	IgG1	500000	11	6,8	7	–	–
5.	C2.B5	IgG1	500000	10	6,0	5	–	73,0

Для определения потенциальных возможностей регистрации взаимодействия моноклональных антител 5D с PdCP был заранее приготовлен комплекс антитело–антиген в концентрации 100 мкг/мл антител и  $10^{-6}$  М PdCP, который затем добавляли в различных концентрациях к антивидовым антителам, адсорбированным на поверхности полистирольного микропланшета (рис. 9). Максимальный сигнал, измеряемый после отмывки и десорбции, достигал нескольких миллионов, а соотношение сигнал/фон — 450 при раститровке комплекса антитела 5D–PdCP, и 300, если использовали комплекс антитела 5D–PdCP–TG. Важно, что оптимум для белкового конъюгата достигается при более низких концентрациях комплекса.

PdCP и полученные к нему моноклональные антитела позволяют разработать простой и универсальный метод определения различных антигенов (Uni-PhIA). С антигеном, адсорбированным на твердой фазе, связываются антитела, которые через «мостиковые» антивидовые антитела взаимодействуют с антителами к метке. При постановке такой схемы анализа отпадает необходимость синтеза конъюгатов с меткой, что определяет ее простоту. При замене определяемого антигена возникает необходимость изменить только лишь один компонент — специфичные к нему антитела, поэтому этот метод является универсальным. Возможности такого подхода были продемонстрированы на примере анализа инсулина [11].

При постановке анализа инсулин в образце конкурировал с инсулином, иммобилизованным на пластике, за моноклональные антитела С4, специфичные к инсулину [11]. Концентрация инсулина в образце варьировала в диапазоне  $1,75 \times 10^{-6}$  М —  $5 \times 10^{-11}$  М. Контролем служил полистирольный микропланшет с адсорбированным альбумином. Взаимодействие антител 3D с PdCP является одним из ключевых факторов для получения максимальной чувствительности. Поэтому были оптимизированы условия взаимодействия антител 3D с антигеном (состав и pH буфера, его ионная сила, добавки детергентов) с целью уменьшения неспецифического связывания PdCP и его конъюгатов [11, 18]. Условия взаимодействия антипорфириновых моноклональных антител с конъюгатом PdCP-TG, которые были определены как оптимальные, следующие: 50 мМ TRIS (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 0,06% Tween 20. Оптимизированный состав буфера ничем принципиально не отличается от используемого в других вариантах анализа. На основании этого можно сделать вывод, что сама метка (PdCP) не вносит каких-либо дополнительных изменений в стандартные протоколы для проведения иммунохимических реакций.

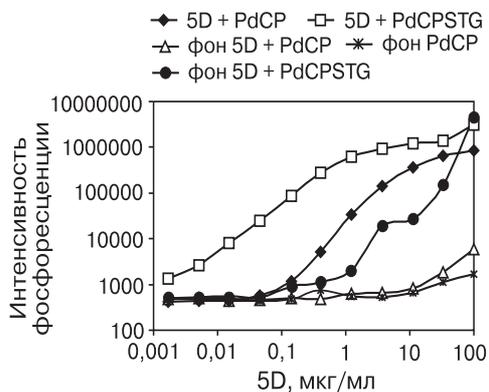


Рис. 9. Связывание иммунных комплексов 5D-PdCP и 5D-PdCP-TG антивидовыми антителами, адсорбированными в лунках полистирольного микропланшета.

Условия десорбции и измерения такие же, как на рис. 16.

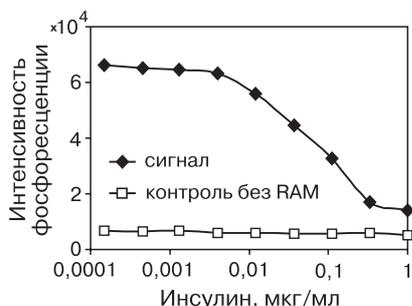


Рис. 10. Конкурентный анализ инсулина методом Uni-PhIA.

В лунках полистирольного микропланшета адсорбирован инсулин (1 мкг/мл). При проведении анализа в лунки последовательно добавлялись: образец, антитела к инсулину С4 (1 мкг/мл), кроличьи антимышьи антитела (RAM, 5 мкг/мл), антитела 5D (1 мкг/мл), конъюгат PdCP-TG (1 мкг/мл).

Условия десорбции и измерения те же, что и на рис. 1б.

на одну точку связывания возрастает почти в 15 раз. Это и объясняет повышение чувствительности почти на порядок — с 37 нг/мл до 4 нг/мл.

Минимальная концентрация инсулина, определяемая в данной схеме как нулевой образец минус стандартное отклонение, равна 37 нг/мл при использовании свободной метки. Если же использовать тиреоглобулиновый конъюгат (рис. 10), то чувствительность метода повышается и становится возможным определять уже меньшую концентрацию инсулина (4 нг/мл). Это связано с тем, что количество молекул метки на поверхности белка достигает 77. Молекула моноклонального антитела по-прежнему взаимодействует с одной молекулой PdCP, но при десорбции регистрируется фосфоресценция всех молекул метки, ковалентно связанных с белком. Несмотря на снижение квантового выхода почти в 5 раз (см. рис. 2), удельный сигнал

## XI. БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ФОСФОРЕСЦЕНТНОМ ИММУНОАНАЛИЗЕ

Uni-PhIA может быть существенно упрощен в случае проведения какого-то одного типа анализа. Упростить данную схему иммуноанализа, избегая стадии введения антивидовых антител, играющих роль связующего звена между антителами к исследуемому антигену и антителами к метке, можно, используя биспецифические антитела. Такие антитела IgG класса, имеющие один центр связывания с  $\alpha$ -субъединицей человеческого хориогонадотропина (hCG) и другой с PdCP, были получены авторским коллективом под руководством проф. А.П. Савицкого совместно с лабораторией проф. Б. Михеля (Institute of Molecular Biology, Berlin-Buch) [10].

Были оптимизированы концентрации PdCP, взаимодействующего с биспецифическими антителами, концентрация аффинно очищенных биспецифических антител и метки для постановки сэндвич анализа hCG, время инкубации тиреоглобулинового конъюгата с целью уменьшения неспецифической адсорбции. Сравнение свободного PdCP и его белковых конъюгатов в концентрации  $10^{-8}$  М по порфирину при постановке сэндвич анализа hCG, показало, что PdCP и PdCP–SIT дают практически одинаковые кривые. Когда в опыт брали PdCP–BSA, то сигнал уменьшался, что связано со стерическими препятствиями для взаимодействия с более крупной белковой молекулой. Тот же эффект наблюдается и для PdCP–TG при высоких концентрациях гормона, но при более низких концентрациях, напротив, наблюдается выигрыш в чувствительности (рис. 11). Сэндвич метод определения концентрации hCG с применением биспецифических антител дает чувствительность 10 IU/L [10].

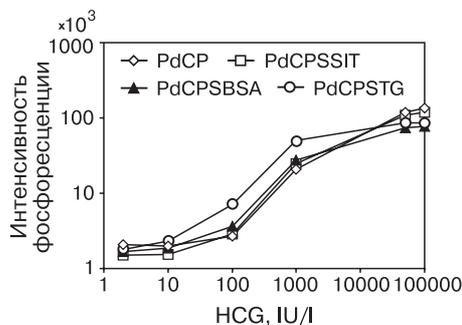


Рис. 11. Сэндвич анализ хорионического гонадотропина методом MS–PhIA с использованием биспецифических антител.

В лунках полистирольного микропланшета адсорбированы антитела к  $\beta$ -субъединице HCG (10 мкг/мл, Diagnostica Sweden). При проведении анализа в лунки одновременно добавлялись: образец, аффинно очищенные биспецифические антитела 6D12, конъюгаты PdCP.

Условия десорбции и измерения те же, что и на рис. 16.

## ХII. ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ — ИЗМЕРЕНИЕ С СУХОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Измерение с сухих поверхностей, как с использованием полимерных фиксирующих сред, так и без них, позволяет получать более высокие сигналы по сравнению с растворами детергентов при высоких концентрациях PdCP на поверхности. Интенсивность фосфоресцентного сигнала PdCP, конъюгированного со стрептавидином, с сухих поверхностей в присутствии кислорода, практически соответствует сигналу этого же конъюгата в мицеллярных растворах без кислорода, причем для достижения такого сигнала образец просто высушивается на воздухе при нормальной влажности в

течение 15 мин без каких-нибудь специальных предосторожностей. Различные полимерные вещества, подобные полимерным фиксирующим средам для микроскопии, могут быть эффективно использованы для усиления фосфоресцентного сигнала с поверхности. После затвердевания полимерной фиксирующей среды фосфоресцентный сигнал Pd-копропорфина даже выше, чем просто с сухой поверхности. Однако природа полимерного вещества очень существенна для усиления фосфоресценции. Одной из наиболее эффективных полимерных фиксирующих сред для фосфоресцирующих соединений является Мерскоглас фирмы Merck [6, 16, 17].

Как видно из данных рис. 12, на серийном ридере сигналы в случае измерения с сухой поверхности ниже, чем в случае метода MS-PhIA. Это связано с особенностями конструкции прибора DELFIA Plate Fluorometer 1232, Wallac (Финляндия), в котором световой луч и светособирающая оптика сфокусированы на центр ячейки (см. рис. 6). В специальном микроскопе для измерения фосфоресценции в режиме временной дискриминации наблюдается противоположная закономерность. Монослой клеток, выращенные на препаративном стекле, отмывались от культуральной среды и на них наносились антитела Mab 242 (10 мкг/мл). После 1 часа

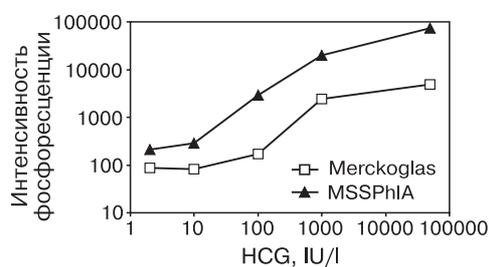


Рис. 12. Сравнение сэндвич анализа хорионического гонадотропина методом MS-PhIA и методом измерения с сухой поверхности, фиксированной Мерскоглас (DS-PhIA) с использованием биспецифических антител.

Условия десорбции и измерения для MS-PhIA те же, что и на рис. 11.

В методе DS-PhIA лунки промывались дистиллированной водой и высушивались при комнатной температуре в течение 15 мин. После этого в каждую лунку добавляли 20 мкл Мерскоглас, высушивали и проводили измерения на приборе DELFIA Plate Fluorometer 1232, снабженном необходимыми фильтрами.

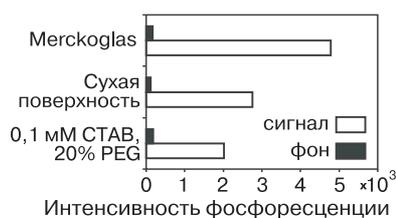
инкубации, клетки снова отмывались и на них наносились биотинилированные кроличьи антимышинные антитела (Biot RAM, 10 мкг/мл). И еще через 1 час после отмывки наносился конъюгат PdCP-StAv (10 мкг/мл). Через 15 мин клетки отмывались и покрывались тонким слоем Мерскоглас без применения покровного стекла. Для измерений использовался инвертированный микроскоп Nikon (Япония) с дополнительным импульсным источником света. В качестве источника света использовалась ксеноновая импульсная лампа,

имеющая частоту повторения 100 гц. На возбуждении использовался интерференционный фильтр с полосой пропускания 400 нм, а на регистрации — 656 нм. Время задержки 200 мкс, счета сигнала — 700 мкс; сигнал регистрировался ФЭУ в режиме счета одиночных фотонов и копился в течении 10 с.

В точно сфокусированном на поверхности световом пучке интенсивность фосфоресценции с сухой поверхности препаратов клеток опухолевой линии А380, несущих антиген для антител Mab 242, почти в 2 раза выше в случае, если препарат высушен и покрыт Merckoglas, чем для мицеллярного раствора (рис. 13). Таким образом, метод измерения фосфоресценции биологических объектов с сухой поверхности при комнатной температуре является одним из наиболее чувствительных.

Рис. 13. Интенсивность фосфоресценции одиночных клеток линии А380 при использовании различных способов детекции с поверхности в инвертированном микроскопе Nikon.

Непрямой иммунохимический тест с использованием Mab 242 (10 мкг/мл), Viot RAM (10 мкг/мл), PdCP—StAv (10 мкг/мл).



### ХИИ. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фосфоресцентный иммуноанализ является методом, альтернативным по отношению к методу с использованием лантанидов, и, в частности, европиевой метки. Металлопорфирины (например, PdCP) имеют два существенных преимущества по сравнению с лантанидами. Во—первых, PdCP является практически индивидуальным химическим соединением, из которого Pd может быть удален только в очень жестких химических условиях, которые никогда не достигаются в биологических системах. Это полностью исключает те проблемы, которые связаны с координационным характером связи лантанидов с белками. В первую очередь это различные реакции переконформационного образования, приводящие к повышению фоновых сигналов, снижающие чувствительность и требующие дополнительных мер предосторожности при подготовке образцов и реагентов. Во—вторых, PdCP имеет полосы поглощения в видимой области, что особенно важно для микроскопии, поскольку упрощает требования к элементам оптической конструкции микроскопа.

Вплоть до последнего времени основной причиной, сдерживавшей широкое применение фосфоресцентных меток, было

отсутствие специальной ридерной техники, оптимизированной для работы с PdСР. Однако в последнее время ситуация изменилась и в настоящее время коммерчески доступен прибор VICTOR фирмы Wallac (Финляндия), позволяющий без каких-либо дополнительных модификаций производить измерения PdСР.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Савицкий А.П., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 5. С. 259—267.
2. Савицкий А.П. // Флуоресцентный иммуноанализ / В кн. «Итоги науки и техники. Биотехнология». 1987. ВИНТИ, Т. 3. С. 117—167
3. Савицкий А.П. // Успехи биол. химии. 1990. Т. 31. С. 209—240.
4. Савицкий А.П. // Успехи биол. химии. 1997. Т. 37. С. 293—314.
5. Савицкий А.П., Папковский Д.Б., Пономарев Г.В., Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 304. С. 1005—1008.
6. Савицкий А.П., Соловьев К.Н., Папковский Д.Б. // Известия АН СССР. Сер. Физическая. 1990. Т. 54. С. 518—523.
7. Шаханина К.Л., Пономарева И.В., Савицкий А.П. // Иммунология. 1990. № 1. С. 4—9.
8. Demcheva M.V., Mantrova E.Yu., Savitsky A.P. // Advances in Fluorescence Sensing Technology / Eds. J.R.Lakowicz, R.B.Thompson, Proc. SPIE Bellingham, Washington. 1993. Vol. 1885. P. 258—269.
9. Demcheva M., Mantrova E., Ponomarev G., Savitsky A.P. // FEBS Lett. 1994. V. 355. P. 314—316
10. Demcheva M.V., Mantrova E.Yu., Savitsky A.P., Berzing O., Michel B., Hammila I. // Analytical Letters. 1995. Vol. 28(2). P. 249—258.
11. Mantrova E.Yu., Demcheva M.V., Savitsky A.P. // Anal. Biochem. 1994. Vol. 219. P. 109—114.
12. Martsev S. P., Preygerzon V.A., Melnikova Y.I., Kravchuk Z.I., Ponomarev G.V., Lunev V.E., Savitsky A.P. // J. Immunological Methods. 1995. Vol. 186. N 2. P. 293—304.
13. Savitsky A.P., Vorobyova E.V., Berzgin I.V., Ugarova N.N. // J. Coll. Interface Sci. 1981. Vol. 84. P. 175—181.
14. Savitsky A.P. // Advances in Fluorescence Sensing Technology / Eds. J.R.Lakowicz, R.B.Thompson. Proc. SPIE. Bellingham, Washington. 1993. Vol. 1885, P. 138—148.
15. Savitsky A.P., Ponomarev G.V., Lobanov O.I., Sadovsky N.A. // Biomedical diagnostic instrumentation / Eds. R.F.Bonner et al.. Proc. SPIE. Bellingham, Washington. 1994. Vol. 2136. P. 285—298.
16. Savitsky A.P., Mantrova E.Yu., Ponomarev G.V., Hammila I., Soini E. // Time-resolved resolved Microscopy / Ed. H.Shnekenburger. Proc. SPIE. Bellingham, Washington. 1994. Vol. 2083. P. 49—53.
17. Savitsky A., Ponomarev G., Soini E. // Optical and imagin technique in Biomedicine / Eds. H—G.Foth et al.. Proc. SPIE. Bellingham, Washington. 1995. Vol. 2329. P. 252—257.
18. Savitsky A., Lobanov O., Demcheva M., Nelen M., Yatsimirsky A., Korpipi—Tommola J. // Optical and imagin technique in Biomedicine / Eds. H—G.Foth et al.. Proc. SPIE. Bellingham, Washington. 1995. Vol. 2329. P. 353—359.
19. Savitsky A.P., Savitskaja A.V., Lukyanets E.A., Dashkevich S.N., Makarova E.A. // Advances in Fluorescence Sensing Technology III / Ed. Richard B. Thompson. Proc. SPIE. Bellingham, Washington. 1997. Vol. 2980. P. 352—357.