



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 57.083.3'112

## ФЛУОРОИММУННЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ

Цыпленков П. В., Морозов В. И., Rogozkin В. А.

*Отдел гормональной регуляции,  
Научно-исследовательский институт физической культуры, Ленинград*

Обзор посвящен одному из актуальных направлений аналитической иммунохимии — флуороиммунному анализу (ФИА) белков. Данные литературы свидетельствуют о том, что по специфичности, чувствительности, точности и другим характеристикам ФИА лишь незначительно уступает таким широко известным методам, как радиоиммунный анализ (РИА) и иммуноферментный анализ (ИФА), объединяя достоинства обоих методов. ФИА лишен серьезного недостатка ИФА, связанного с возможным присутствием в биологических пробах ферментов, активных в отношении субстрата энзима-метки, и вместе с тем подобно ИФА является экономичным и безопасным методом. Приведены литературные данные о специфичности и чувствительности ФИА, описаны свойства наиболее перспективных флуоресцентных меток и способы их присоединения к белкам. На примере ФИА белков показано практическое использование ФИА в растворе и твердой фазе. Приведена информация по шести флуориметрам, разработанным для ФИА. Рассмотрены перспективы развития ФИА и его использования в медико-биологических исследованиях.

## Введение

Разработка все более специфичных и чувствительных методов анализа белков — одно из основных условий развития исследований в биологии и медицине. Для одновременного анализа нескольких белков в сложных по своему составу биопробах широко используются методы изоэлектрофокусирования, двумерного электрофореза, хроматографии. При определении отдельных белковых компонентов, присутствующих в низких концентрациях, успешно используются иммунологические методы, основанные на применении специфичных антител и обеспечивающие высокую селективность анализа.

В настоящее время наиболее распространенным иммунологическим методом, используемым для определения различных компонентов биопроб, является радиоиммунный анализ (РИА). Применение радиоактивных меток обуславливает высокую чувствительность РИА, достигающую в ряде случаев  $10^{-12}$ — $10^{-15}$  моль определяемого вещества в пробе [1]. Вместе с тем РИА имеет определенные недостатки. Например, радиоактивно меченные лиганды имеют ограниченный срок хранения и представляют радиационную опасность. Это обстоятельство стимулировало поиск других иммунологических методов, не уступающих по своим характеристикам РИА, но не требующих реактивов, содержащих радиоактивные изотопы. Так, в последние годы интенсивное развитие получил иммуноферментный анализ (ИФА) [2, 3]. Данный метод предусматривает использование ферментов для мечения антител или определяемых антигенов и обладает высокой чувствительностью, сравнимой с чувствитель-

Сокращения: ИФА — иммуноферментный анализ, ИФМА — иммунофлуориметрический анализ, РВ-ФИА — флуороиммунный анализ с разделением по времени, РИА — радиоиммунный анализ, ТНТС — тетраметилпродаминизотиоцианат, ФИА — флуороиммунный анализ, FITC — флуоресцеинизотиоцианат,  $\lambda_{ex}$  и  $\lambda_{em}$  — длина волны возбуждающего излучения и эмиссии.

постью РИА. Однако на результаты ИФА белков может повлиять присутствие в биопробе эндогенных ферментов, а также ингибиторов фермента-метки [4]. В качестве нерадиоактивных меток кроме ферментов могут использоваться металлы, вещества, способные люминесцировать, флуоресцентные красители [5].

Аналитическое применение меченых флуоресцентными красителями антител известно с 1941 г. [6], однако иммуофлуоресценция рассматривалась главным образом как метод качественного анализа в иммуногистохимии [7]. Лишь в последнее десятилетие [8] количественный флуориммунный анализ (ФИА) стал использоваться в практике медико-биологических исследований. Статистический анализ данных о публикации работ по РИА, ИФА и ФИА показывает, что ФИА в настоящее время находится на начальной стадии своего развития. Так, с 1975 по 1984 г. опубликовано 8140 работ, в названиях которых содержится термин «РИА»; 2099 по ИФА в твердой фазе и лишь 89 работ по ФИА [9]. Возможно, что причинами этого являются недостаточный выбор приборов для флуоресцентных исследований и ограниченный ассортимент флуоресцентных красителей, удовлетворяющих требованиям ФИА, что сказывается на чувствительности метода, которая, как показано в табл. 1, в ряде случаев ниже, чем в РИА или ИФА. Вместе с тем в настоящее время в области ФИА наметился определенный прогресс, связанный с разработкой специальных приборов и новых методических подходов, а также с синтезом новых флуоресцентных меток [10–14].

Цель настоящего обзора состоит в оценке современного состояния и тенденций развития ФИА, анализе факторов, определяющих чувствительность и селективность метода на примере ФИА белков как наиболее важного класса биополимеров.

### Получение и очистка антител

Необходимым компонентом для осуществления ФИА являются антитела, специфичные в отношении определяемого антигена. Получение антител к белкам представляет хорошо разработанную область иммунологии. В настоящее время применяются как поликлональные антитела из сывороток иммунных животных, так и моноклональные антитела, получаемые с помощью гибридомной технологии. В литературе имеются подробные сведения об использовании обоих методов [38–40]. При получении поликлональных антител для усиления иммунного ответа используют различные приемы, предусматривающие увеличение иммуногенности белков, модификацию схем иммунизации, подбор животных и т. д. [41, 42]. ФИА, как и другие виды иммуноанализа, выдвигает определенные требования к препаратам антител, которые должны быть высокоспецифичными, высокоаффинными, иметь высокий титр. В ФИА используются чистые антитела, для выделения которых применяется высаливание иммуноглобулинов с помощью концентрированных растворов нейтральных солей, гель-хроматография, электрофорез, аффинная хроматография [39]. Очищенные иммуноглобулины далее соединяют с флуоресцентной меткой и, если необходимо, получают фракцию меченого белка с заданным отношением краситель : белок путем ионообменной хроматографии [43].

Моноклональные антитела, обладая уникальной специфичностью, имеют преимущества перед поликлональными антителами при иммуноанализе белковых молекул, несущих несколько антигенных детерминант [10]. Применение моноклональных антител в ФИА позволяет существенно улучшить характеристики метода [14, 44].

### Флуоресцентные метки

Наряду с антителами важным фактором, определяющим эффективность ФИА, является флуоресцентный краситель, используемый для мечення белков. Известно, что биологические образцы, в которых проводится анализ белков, например сыворотка крови, обладают собственной флуо-

Чувствительность иммунологических методов анализа с применением меченых лигандов \*

Определяемое вещество	Единица измерения	Метод определения		
		РИА	ИФА	ФИА
Альбумин	мг/л	0,03 [15]	0,9 [16]	0,1 [17]–1,0 [13]
$\alpha$ -Фетопротеин	мкг/л	1,0 [18]	3,0 [19]	25,0 [12]
Иммуноглобулин G	»	20,0 [20]	50,0 [2]–3,0 [21]	500,0 [22], 40,0 [13], 10,0 [23]
Ферритин	»	0,5 [24]	0,25 [25]	2,0 [26]
Инсулин	моль/л	$10^{-10}$ [27, 28]	$5 \cdot 10^{-7}$ [28]	$1,7 \cdot 10^{-13}$ [29]
Тиреотронин	МЕ/л	0,08 [30]	0,05 [31]	0,05 [32]
Хорионадотропин	МЕ/л	12,0 [33]	–	0,5 [34]
Кортизол	мкг/л	5,0 [35]	10,0 [36]	20,0 [37]

\* В квадратных скобках дан номер источника информации в списке литературы; МЕ — международные единицы.

ресценцией [45]. Источниками флуоресценции являются NADH ( $\lambda_{ex}$  330–360 нм,  $\lambda_{em}$  430–470 нм) и комплексы билирубина с белками ( $\lambda_{em}$  525 нм). Для флуоресценции биопроб характерны относительно небольшое смещение Стокса (<100 нм) и малая длительность ( $\sim 10^{-9}$  с).

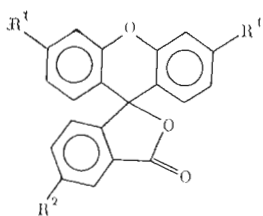
Таким образом, основным путем повышения чувствительности ФИА является введение в белки соединений, флуоресценция которых характеризуется высоким квантовым выходом, значительным (>100 нм) смещением Стокса и большой длительностью (фосфоресценция) с максимумом эмиссии ( $\lambda_{em}$ ) в длинноволновой области спектра. Использование красителей с указанными свойствами позволит свести к минимуму влияние на чувствительность ФИА собственной флуоресценции образца и рассеяния света.

Спектральные характеристики ряда соединений, применяемых в качестве флуоресцентных меток, представлены в табл. 2. В ФИА белков наиболее часто используются ксантеновые красители, в частности изотиоцианаты флуоресцеина (FITC, Ia), родаминов (Ib, Iг), эозина (IV) [10–14, 43, 45–50]. Одним из достоинств данных красителей является высокий квантовый выход флуоресценции, максимум  $\lambda_{em}$  которой лежит в видимой области спектра, однако существенным недостатком ксантеновых красителей следует считать незначительное смещение Стокса. В настоящее время кроме изотиоцианатов в ФИА белков применяются и другие активированные формы ксантеновых красителей: дихлортриазинил-аминофлуоресцеин (Iб), сульфонилхлориды сульфородаминов (II, III). Их растворимость и устойчивость в условиях реакции конъюгации с белком выше, чем у FITC [17, 48, 49].

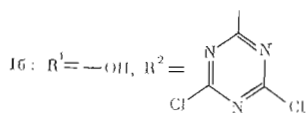
Новые возможности ФИА открывает применение в качестве флуоресцентных меток веществ, флуоресценция которых характеризуется значительным ( $\sim 100$  нм) смещением Стокса. К ним в первую очередь относятся красители  $\alpha$ -бензоципронового ряда (кумарины). Несмотря на то что  $\lambda_{em}$  кумаринов по сравнению с ксантенами сдвинута в коротковолновую область, в ФИА белков нашли применение некоторые из них, в частности 4-метилумбеллиферон (Va), интенсивно флуоресцирующий в щелочных растворах [52]. Как видно из табл. 2, спектральные характеристики этого красителя не являются оптимальными. В данной области спектра ( $\lambda_{ex}$  380 нм,  $\lambda_{em}$  450 нм) еще достаточно высок уровень собственной флуоресценции биологического материала [45]. В настоящее время синтезированы новые красители кумаринового ряда — цианокумарины [53], спектральные характеристики которых удовлетворяют требованиям ФИА белков. Так, 3-(2-бензотиазолил)-4-циано-7-гидрокси- $\alpha$ -бензопиран (Vб) имеет флуоресценцию с  $\lambda_{ex}$  505 нм,  $\lambda_{em}$  595 нм [53]. Значительное сме-

Свойства флуоресцентных меток для ФИА

Группа соединений	Наименование	$\lambda_{exc}$	$\lambda_{em}$	Молярный коэффициент поглощения, $\epsilon$ ( $M^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot 10^{-4}$ )	Квантовый выход, $Q$	Номер структурной формулы	Номер источника информации
Красящие вещества	FITC	492	520	7.0	0.85	Ia	6, 14, 43, 46, 47
	Дихлортриазиниламинофлуоресцин	492	520	—	—	Ib	48
	Изотиоцианат родамина В	530	585	1.2	0.70	Iв	14, 43, 47, 49
	Тетраметилродаминоизотиоцианат (TRITC)	550	580	5.0	—	Iг	14, 50
	Сульфонилаксид сульфородамина В	530—554	595	—	—	II	14, 49
	Сульфонилаксид сульфородамина 101 (Texas Red)	595	615	—	—	III	17
	Эозинизотиоцианат	520	580	—	—	IV	47, 51
	4-Метилдумбеллаксиферин	380	450	2.0	—	Va	52
	3(2-Безотиазол)л-4-циано-7-гидрокси- $\alpha$ -бензоширон	505	595	—	—	Vб	53
	Акридины (2-метокси-6,9-дихлорацридин)	420	505	0.93	0.41	VI	54
Прочие флуоресцентные маркеры белков	7-Амино-4-трифторметил-хинолон-2	385	500	—	—	VII	55
	Анилинафталинсульфонатовая кислота	385	471	—	0.80	VIII	14
	4-Ацетамидо-4'-изотиоцианатэтилбен-2,2'-дисульфид	314—375	406—420	—	—	IX	47, 56
	Дансалаксид (5-метиламино-1-нафталинсульфонил-хлорид)	340	520—535	0.34	0.30	X	14, 47
	Элюксифер желтый VS	430	540	—	—	XI	57
	2-Метокси-2,4-дифенил-3(2H)-фуранол	390	480	0.64	0.10	XII	14, 58
	Производные перилена	450	545	—	—	XIII	59
	N-(3-пирен)-малевид	340	392	—	—	XIV	14, 60
	Флуорескалин (4-фенил-сиро[фуран-2(3H), 1-фталат]-3,3'-дион)	394	475	0.63	0.10	XV	14, 58, 61
	Природные флуорохромы	Порфирины (4-[10, 15, 20-трис(4-сульфофенил)-2,11H, 23]пирролин-5-ил]-бензойная кислота)	414	670	36.4	—	XVI
Хлорофиллы (хлороантранид бактериохлорофиллыда b)		450	680	4.42	—	XVII	63
Фикобилипротеины (фикоэритробилин)		495—650	576—660	240.0	0.3—0.9	XVIII	64
Германий+резарсон (2,2',4'-триокси-3-арсоно-5-хлоразобензол)		490	610	—	—	XIX	65, 66
Цинк или кадмий+8-(n-тозиламино)-хинолин		270	525	—	—	XX	65
Селен+3,3'-диаминобензидин		435	580	—	—	XXI	65, 66
Европий+тенонтрифторацетон		340	613	—	—	XXIIa	67
Европий+ $\alpha$ -нафтолтрифторацетон		340	613	—	—	XXIIб	29
Тербий+n-бензоидиазо-EDTA		300	550	15.0	0.06	XXIII	44, 68
Неодим+n-аминобензолтрифторацетон		800	900—1350	—	—	XXIV	14

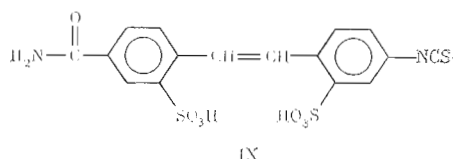
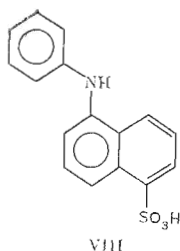
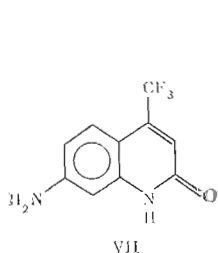
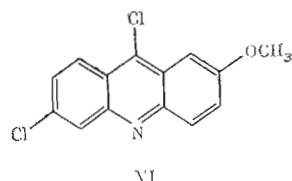
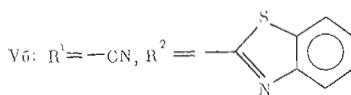
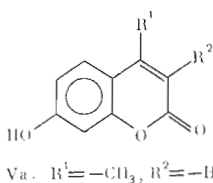
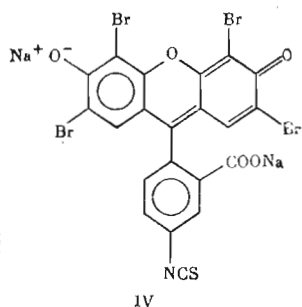
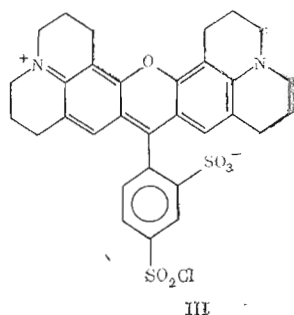
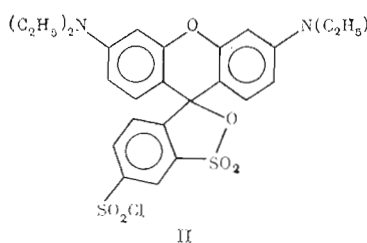


Ia:  $R^1 = -OH, R^2 = -NCS$



Ic:  $R^1 = -N(C_2H_5)_2, R^2 = -NCS$

Id:  $R^1 = -N(CH_3)_2, R^2 = -NCS$

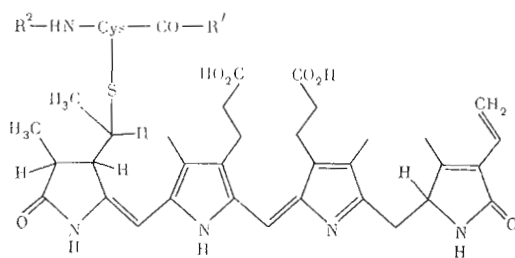
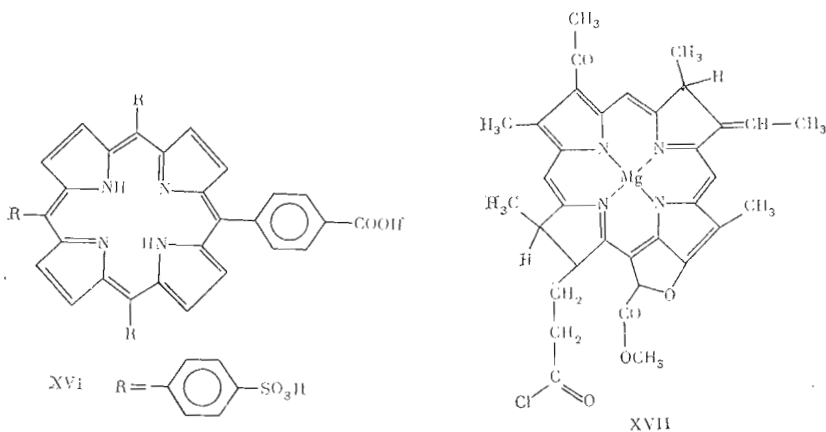
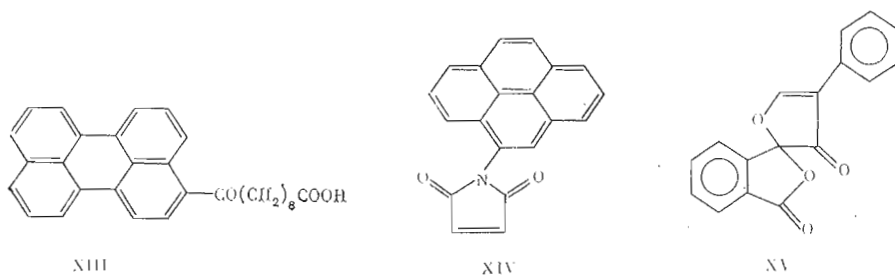
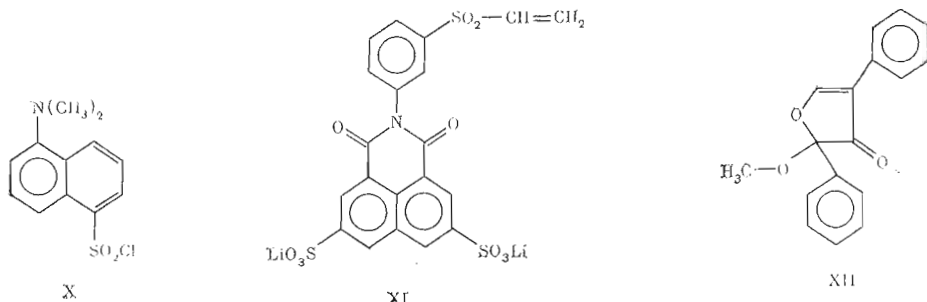


ещение Стокса и сдвинутый в длинноволновую область максимум эмиссии позволяет считать цианокумарины перспективными флуоресцентными метками для ФИА белков.

Близкие по структуре кумаринам аминокинолоны-2, например (VII), при использовании в качестве флуоресцентных меток также могут обеспечить высокую чувствительность ФИА, поскольку их спектральные характеристики близки к оптимальным (смещение Стокса более 100 нм). Однако в качестве маркеров белков они пока не применялись [55].

Многие флуоресцентные красители с удовлетворительными спектральными характеристиками, способные выступать в качестве маркеров белков, такие, как анилинафталинсульфовая кислота (VIII), 4-ацетамидо-4'-изотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфокислота (IX), дансилхлорид (X), 2-метокси-2,4-дифенил-3(2H)-фуранол (XII), флуорескамин (XV), N-пиренмаленид (XIV), производные акридина (VI), перилена (XIII), промышленный краситель Люцифер желтый VS (XI) [14, 54, 56-61] и некоторые другие [47] не нашли в ФИА широкого применения, поскольку интенсивность их флуоресценции ниже, чем ксаптеновых и кумариновых красителей [14, 58].

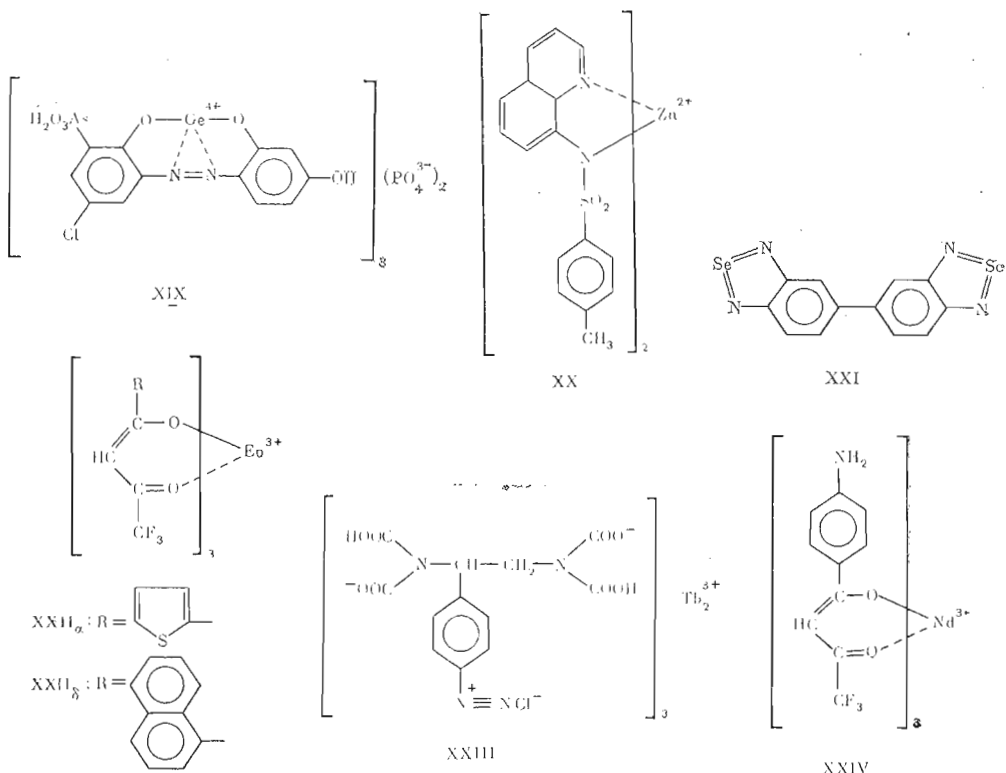
Флуоресценция веществ биологического происхождения — порфиринов (XVI), хлорофиллов (XVII) и фикобилипротенов (XVIII) — характеризуется высоким квантовым выходом, максимумом  $\lambda_{em}$  в длинноволновой области, значительным (до 250 нм) смещением Стокса [62-64]. Эти



XVIII R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>-поливинилы с M<sub>r</sub> 250000

свойства дают основание рассматривать такие природные флуорохромы в качестве перспективных меток в ФИА [69, 70].

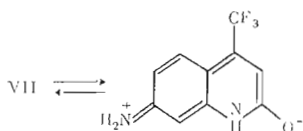
Для некоторых металлоорганических комплексов (табл. 2) также характерна флуоресценция с большим смещением Стокса, причем максимум  $\lambda_{em}$  находится в длинноволновой области [65]. В ФИА белков нашли применение комплексы редкоземельных металлов (европий, тербий, неодим), обладающие длительной флуоресценцией (фосфоресценцией). Они привлекли внимание исследователей, разрабатывающих ФИА с разделением по времени возбуждающего и эмиссионного излучений (РВ-ФИА). Поскольку флуоресценция комплексов редкоземельных металлов по длительности на 4 порядка превосходит флуоресценцию компонентов сыво-



ротки крови, существует реальная возможность увеличения чувствительности ФИА за счет измерения флуоресценции метки после выключения возбуждающего излучения и затухания собственной флуоресценции биологического образца. Применение в качестве меток европия и тербия в комплексе с дикетонами (XXIIa, б), *p*-бензодиазо-ЕДТА (XXIII) и другими органическими лигандами в сочетании с импульсным режимом работы источника возбуждающего излучения позволило достичь чувствительности РВ-ФИА белка порядка  $3 \cdot 10^{-10}$  моль/л ( $10^{-11}$  моль альбумина в пробе) [23].

В настоящее время фирма LKB — Wallac (Швеция) выпускает наборы реактивов для РВ-ФИА различных белков и низкомолекулярных соединений [34]. Высокая чувствительность и воспроизводимость, присущие данному методу, объясняются, в частности, применением особых органических лигандов и детергента, усиливающих флуоресценцию европия в  $10^6$  раз, а также тем, что интенсивность флуоресценции метки измеряется спустя 100 мкс после импульса возбуждающего излучения, когда флуоресценция компонентов биопробы практически отсутствует [44, 67, 68].

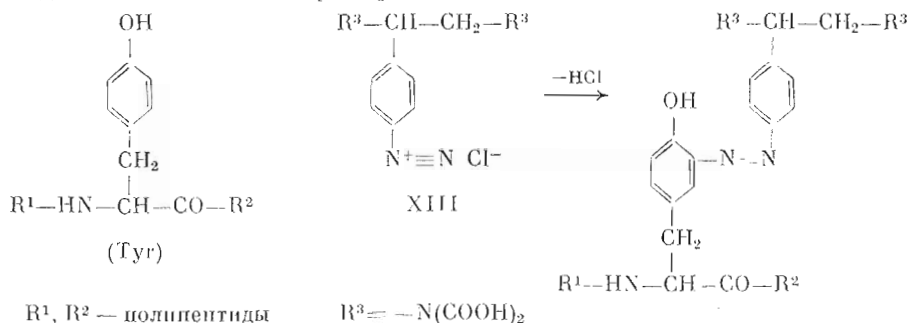
Таким образом, в настоящее время имеется достаточно широкий выбор флуорохромов (табл. 2), максимумы эмиссии которых находятся в видимой области спектра ( $\lambda_{em}$  400—800 нм). Кроме того, известные закономерности связи химического строения красителей и их оптических свойств позволяют осуществлять синтез флуорохромов с заданными спектральными характеристиками [66]. Так, например, было показано [53, 55], что введение в положение 7 молекулы  $\alpha$ -бензопирона-2 или хинолона-2 электронодонорных заместителей ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ) увеличивает интенсивность флуоресценции, так как способствует образованию хиноидных структур (Va, VII):



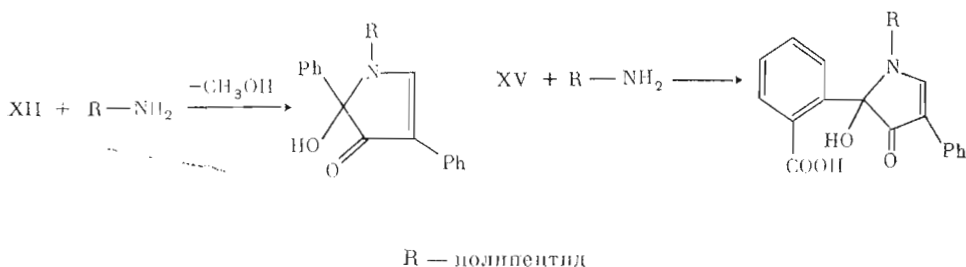
Введение электроноакцепторных групп ( $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CN}$ ) в положение 4 данных соединений приводит к значительному смещению  $\lambda_{em}$  (Vб), (VII) в длинноволновую область (батохромный эффект). Ограничение вращения электронодонорных групп ( $-\text{NH}_2$ ) в молекуле флуорохрома также обуславливает батохромный эффект (ср. (II) и (III), табл. 2).

При выборе красителя для ФИА паряду со спектральными характеристиками следует учесть такой параметр, как растворимость флуорохрома в воде, и предусмотреть наличие функциональных групп, необходимых для конъюгации с белком. Так, 9-(3-периленионил)-нонаповая кислота (XIII) в воде практически нерастворима [59] и, несмотря на удовлетворительные спектральные характеристики, очевидно, не может эффективно использоваться как маркер белков в ФИА. Увеличению растворимости в воде способствует введение в молекулу флуорохромов таких групп, как  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ . Лучшие результаты получены при использовании красителей, содержащих сульфогруппы: (II), (III), (VIII) – (XI), (XVI).

Конъюгация флуорохрома с белками осуществляется, как правило, путем ковалентного связывания и, реже, за счет ионного взаимодействия отрицательно заряженной метки (например, (VIII)), с аминогруппами белка [7]. Помимо N-концевых аминогрупп и аминогрупп лизина ковалентную связь с молекулой флуорохрома могут образовывать и другие функциональные группы, содержащиеся в молекуле белка:  $-\text{SH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ . Последняя, в частности, используется для конъюгации диазосоединений, например (XXIII), с белками:



Некоторые флуорохромы ((XII), (XV)) образуют ярко флуоресцирующие производные лишь после конъюгации с белками по N-концевым аминогруппам [71]

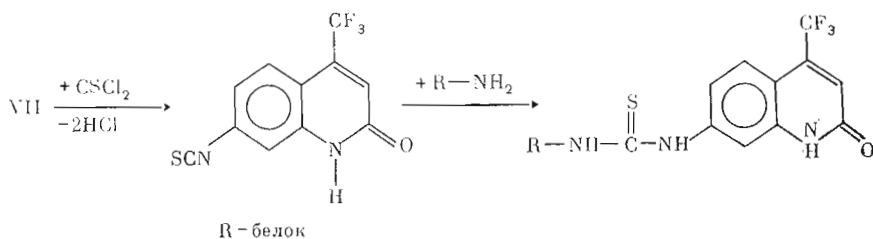


Большинство используемых в ФИА маркеров белков содержат функциональные группы, способные ковалентно соединяться с аминогруппами лизина в белке, образуя карбамидные или сульфамидные связи [7]. Установлено, что в мягких условиях, ограничивающих потерю активности аптител (рН ~9), в реакцию с аминогруппами белков (в меньшей степени с  $-\text{SH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) наиболее активно вступают изотиоцианаты (1а, в, г), (IV), (IX), сульфонилхлориды (II), (III), (X), а также соединение (1б), которые в настоящее время и являются наиболее распространенными реагентами для конъюгации флуорохромов с белками [45–47].

Очевидно, что многие флуоресцентные красители с удовлетворительными спектральными характеристиками, в частности производные амино-



хишолон-2 [72], содержащие ароматические аминогруппы и в обычных условиях не связывающиеся с белком, могут быть переведены в активную форму (изотиоцианат) посредством обработки тиофосгеном, например:



«Активация» флуорохромов, содержащих карбокси- и сульфогруппы (перевод в хлорангидриды), может осуществляться хлористым тионилем или POCl<sub>3</sub> [17, 49, 62, 63].

### Разновидности ФИА

Все варианты ФИА делят на две категории: ФИА в растворе и твердой фазе [10, 14]. ФИА в растворе позволяет определять анализируемое вещество непосредственно в биопробе. ФИА в твердой фазе предусматривает два этапа анализа: разделение связанных с определяемым веществом и свободных антител (например, с помощью иммуносорбента), измерение флуоресценции связанной или свободной фракции меченого лиганда. Отдельную группу представляют модификации РВ-ФИА, принципиальное отличие которых состоит в том, что измерение флуоресценции метки осуществляют после прекращения импульса возбуждающего излучения [23, 34, 67, 68].

ФИА в растворе — наиболее быстрый и простой метод. Флуоресцентная метка при проведении ФИА в растворе в отличие от ФИА в твердой фазе является активным элементом аналитической системы. Это означает, что интенсивность или поляризация эмиссионного излучения красителя-метки изменяется в результате взаимодействия антитела и определяемого антигена. Изменение флуоресценции метки при этом пропорционально количеству антигена в пробе. Недостатками ФИА в растворе можно считать узкий диапазон концентраций определяемого антигена и сравнительно невысокую чувствительность.

Среди многих модификаций ФИА в растворе для определения белков наиболее перспективен ФИА с переносом энергии [10, 11]. Данный метод предусматривает использование специально подобранной пары красителей, один из которых конъюгирует с антителом, другой — с антигеном. При взаимодействии меченого антигена с меченым антителом молекулы красителей сближаются и приобретают способность обмениваться энергией. Находясь в возбужденном состоянии, краситель, флуоресцирующий в коротковолновой области, может передавать свою энергию красителю, флуоресцирующему в более длинноволновой области (рис. 1). При этом первый краситель (донор энергии) не флуоресцирует, тогда как интенсивность флуоресценции второго красителя («тушителя») возрастает [50]. В качестве такой пары красителей впервые было предложено использовать FITC и TRITC (Ir) (рис. 1). Поскольку  $\lambda_{em}$  FITC и  $\lambda_{ex}$  TRITC достаточно близки (табл. 2), FITC выступает как донор энергии, а TRITC — как ее акцептор. Эффективность переноса энергии достигает максимума при связывании антигена, меченого FITC, с антителом, меченым TRITC. Присутствие в исследуемой пробе антигена, аналогичного меченому антигену, в определенной мере препятствует связыванию последнего мечеными антителами (рис. 1) и, следовательно, переносу энергии от FITC к TRITC. Таким образом, количество анализируемого антигена в пробе можно определить по степени «тушения» флуоресценции FITC или по интенсивности флуоресценции TRITC при облучении пробы

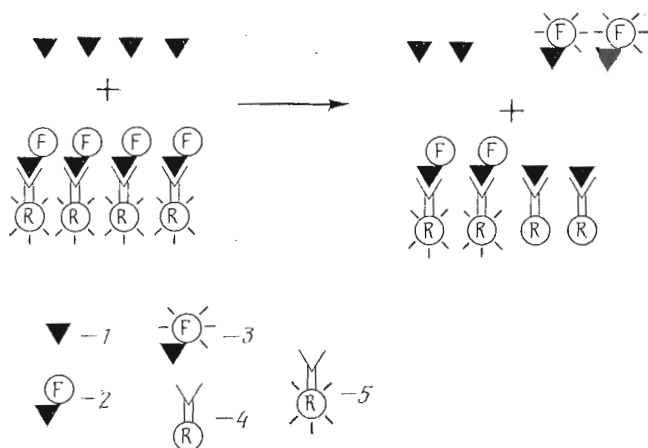


Рис. 1. Схема ФИА в растворе с переносом энергии красителя («тушением» флуоресценции). 1 — антиген; 2 — антиген, меченый FITC (FITC не флуоресцирует); 3 — антиген, меченый FITC (FITC флуоресцирует); 4 — антитело, меченое TRITC (TRITC не флуоресцирует); 5 — антитело, меченое TRITC (TRITC флуоресцирует)

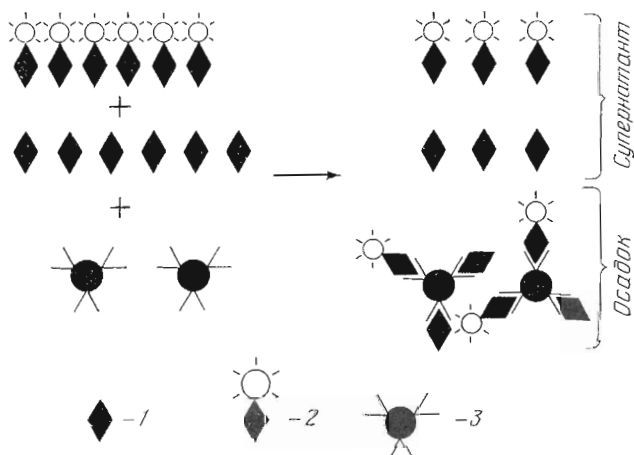


Рис. 2. Схема ФИА в твердой фазе. 1 — определяемый антиген; 2 — антиген, меченый флуоресцентным красителем; 3 — иммуносорбент

светом, длина волны которого соответствует  $\lambda_{ex}$  FITC. В отсутствие антигена в пробе «тушение» флуоресценции FITC достигает своего максимального значения (рис. 1). Чувствительность данного метода составляет 0,1 нМ ( $\sim 15$  мкг/л), а диапазон измерения для IgG человека — 0,1—1,5 нМ [73].

ФИА в твердой фазе (рис. 2) более трудоемкий, чем ФИА в растворе, но благодаря меньшей зависимости от фонового свечения биопроб, как правило, характеризуется более высокой чувствительностью. Разделение свободных и связанных с антигеном антител при постановке ФИА в твердой фазе осуществляют путем сорбции того или иного компонента аналитической системы на поверхности частиц целлюлозы, гранул полистирола или полиакриламидного геля [74—77]. В качестве иммуносорбента могут также использоваться полимерные пластинки, покрытые антителами, способными адсорбировать многие компоненты сыворотки [75, 78]. Такие пластинки выпускает фирма Whittaker M. A. Bioproducts (США).

В настоящее время быстро развивается так называемый иммунофлуориметрический анализ (ИФМА) белков, в основе которого лежит метод «сэндвича» (рис. 3). ИФМА дает возможность исследовать образцы с более широким диапазоном концентраций антигенов, чем другие разновидности ФИА. При этом концентрацию антигена оценивают либо по степени

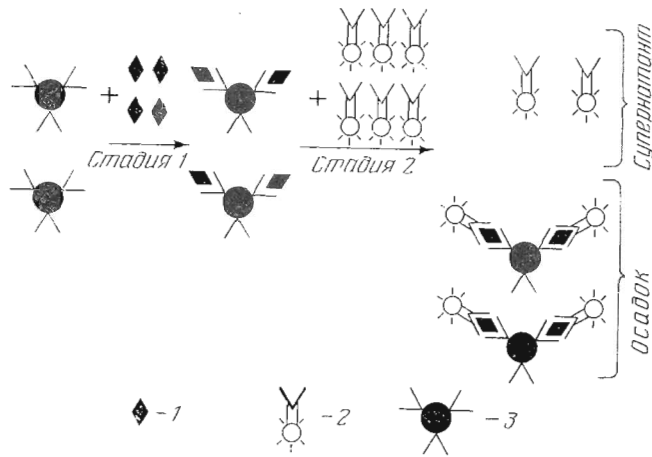


Рис. 3. Схема ИФМА белка. 1 — определяемый белок (антиген); 2 — антитело, меченное флуоресцентным красителем; 3 — иммуносорбент

снижения флуоресценции растворенных меченых антител после отделения иммуносорбента, либо по интенсивности флуоресценции зерен иммуносорбента, измеренной под микроскопом [77] или с помощью флуориметров [45, 76]. Чувствительность ФИА в твердой фазе достаточна для точного определения концентрации многих белковых компонентов сыворотки и составляет для IgG 40 мкг/л [13], IgA 0,6 мг/л, IgM 0,4 мг/л [76],  $\alpha$ -фетопротейна 25 мкг/л [12], С3- и С4-компонентов комплекса соответственно 125 и 150 мкг/л [75].

Дополнительное увеличение чувствительности ФИА в твердой фазе было достигнуто за счет разделения во времени возбуждающего и излучаемого света. Так, наборы для РВ-ФИА белков (LKB — Wallac) рассчитаны на определение антигенов при концентрации их до  $10^{-10}$  моль/л, что составляет, в частности, 10 мкг/л IgG [23], 1,2 мкг/л антигена вируса гепатита [79], 2,0 мкг/л ферритина [26] и 0,1 мкг/л низкомолекулярного ингибитора протеиназы [80].

### Приборы для ФИА

Развитие ФИА белков тесно связано и во многом зависит от разработки и совершенствования специальных регистрирующих приборов. Основные направления повышения технического уровня флуориметров, предназначенных для ФИА, заключаются в их компьютеризации с целью автоматизации и унификации всех выполняемых исследователем операций, упрощения конструкции прибора, сокращения времени анализа. Кроме того, могут учитываться методические особенности той разновидности ФИА, для которой предназначен флуориметр.

Отечественный спектрофлуориметр СФЛ является универсальным автоматическим прибором для люминесцентных исследований в химии, биологии, медицине. Широкий диапазон изменений возбуждающего и эмиссионного излучений, управление с помощью встроенной микроЭВМ «Электроника 60М», цифробуквенная и графическая регистрация результатов, очевидно, позволят эффективно использовать спектрофлуориметр СФЛ для проведения различных вариантов ФИА белков.

В настоящее время ряд зарубежных фирм приступил к производству автоматических флуориметров, специально приспособленных для ФИА. Так, приборы «Microfluor» (Dynatech, Швейцария) и близкий по конструкции «Fluoroskan» (Flow Laboratories, Англия) предназначены для регистрации флуоресценции в ячейках стандартных планшетов для иммунологических исследований. Особенностью оптической системы приборов данного типа является близкое к вертикальному направлению лучей возбуждающего и излучаемого пробой света, а также наличие светофильт-

ров ( $\lambda_{ex}$  380 нм,  $\lambda_{em}$  450 нм), необходимых при работе с реагентами, меченными соединением (Va). Чувствительность данных флуориметров достигает  $10^{-10}$  моль (Va)/л.

Флуориметр «Arcus-1230» (LKB — Wallac) разработан специально для РВ-ФИА. Оптико-электронная схема прибора позволяет производить измерение флуоресценции пробы спустя определенный промежуток времени (10—1000 мкс) после импульса возбуждающего излучения. Чувствительность прибора со светофильтрами ( $\lambda_{ex}$  340 нм,  $\lambda_{em}$  613 нм) составляет  $10^{-12}$  моль европия/л [34].

Фирмой Syva Company (США) разработан иммунохимический автомат «Advance», предназначенный для ФИА в растворе с использованием эффекта «тушения» флуоресценции [22]. Прибор осуществляет подготовку образцов к анализу и измерение флуоресценции. Он оснащен насосами для дозирования и смешивания иммунореагентов и термостатом для инкубации образцов при заданной температуре. Программа анализа вводится с помощью перфокарты, имеющейся в каждом наборе реактивов, поставляемых фирмой. В настоящее время Syva Company выпускает наборы для ФИА таких белков, как IgG, IgA, IgE, IgM, С-реактивный белок, трансферрин, ретинолсвязывающий белок, преальбумин, С3- и С4-компоненты комплемента, ферритин, однако чувствительность измерения сравнительно невелика и составляет 0,5—10 мг/л [22, 81].

Фирма Whittaker M. A. Bioproducts выпускает флуориметр «FIAХ-400», предназначенный для измерения флуоресценции меченых белков, сорбированных на твердой поверхности специальных пластинок [75], и может использоваться для ИФМА белков. Фирма производит наборы реактивов для ИФМА  $\alpha$ -аптитрипсина, гаптоглобина, трансферрина, С3-, С4-компонентов комплемента, иммуноглобулинов, а также антигенов некоторых вирусов.

### Перспективы развития ФИА

Представленный материал позволяет заключить, что ФИА по основным характеристикам лишь незначительно уступает таким широко распространенным методам, как РИА и ИФА. Наряду с этим ФИА выгодно отличается стабильностью реагентов, высокая скорость измерения флуоресценции, экономичность. О возрастающем интересе к ФИА как эффективном методе анализа белков свидетельствует разработка крупными зарубежными фирмами специализированных флуориметров и наборов реактивов. Постоянно увеличивается число публикаций, посвященных ФИА, растет объем патентной документации [14, 62, 63].

Перспективы развития ФИА связаны прежде всего с разработкой простых экспресс-методов анализа состава белков сыворотки при патологии, с расширением диапазона определяемых антигенов. Наряду с быстрым методом ФИА в растворе дальнейшее развитие, вероятно, получат более чувствительные методы ФИА в твердой фазе, в частности ИФМА, особенно перспективный для определения белков с большой молекулярной массой, а также РВ-ФИА. Совершенствование систем разделения связанного и свободного меченых лигандов может значительно сократить длительность ФИА в твердой фазе.

Повышению чувствительности ФИА белков, несомненно, будут способствовать как синтез новых флуоресцентных красителей и применение в качестве меток природных соединений (порфиринов, хлорофиллов, редкоземельных металлов), так и совершенствование оборудования, предназначенного для ФИА. Очевидно, что внедрение ФИА в практику работы клинических и экспериментальных лабораторий откроет новые возможности для исследования многих белков.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Чард Т. Радиоиммунологические методы. М.: Мир, 1981. 246 с.
2. Маржлов И. М., Пасхина М. И., Головкин В. И., Дзантиев Б. Б., Егоров А. М. // Лаб. дело. 1982. № 11. С. 669—671.

3. *Oellerich M.* // J. Clin. Chem. and Clin. Biochem. 1984. V. 22. № 12. P. 895-904.
4. *Harding N.* // Lab. Equipment Digest. 1981. V. 20. № 4. P. 89, 91, 93.
5. *Shall R. F., Tenoso H. J.* // Clin. Chem. 1981. V. 27. № 7. P. 1157-1164.
6. *Coons A. H., Creech H. J., Jones R. H.* // Proc. Soc. Exptl Biol. and Med. 1941. V. 47. № 1. P. 200-202.
7. *Кубица Ю. Ф.* Иммуофлуоресценция. М.: Медицина, 1967. 255 с.
8. *Aalberse R. C.* // Clin. chim. acta. 1973. V. 48. № 2. P. 109-111.
9. *Цыпленков И. В.* Адаптация к мышечной деятельности и гормоны. Л.: ЛНИИФК, 1986. С. 117-124.
10. *Ullman E. F.* // Tokai J. Exptl Clin. Med. 1979. V. 4. Suppl. P. 7-32.
11. *Ullman E. F., Bellet N. F., Brinkley J. M., Zuk R. F.* // Immunoassays: clinical laboratory techniques for the 1980 s. N. Y.: Alan R. Liss, 1980. P. 13-43.
12. *O'Donnell C. M., Suffin S. C.* // Anal. Chem. 1979. V. 51. № 1. P. 33A-40A.
13. *Soini E., Hemmilä I.* // Clin. Chem. 1979. V. 25. № 3. P. 353-361.
14. *Hemmilä I.* // Clin. Chem. 1985. V. 31. № 3. P. 359-370.
15. *Kida S., Muller-Eberhard U.* // Immunochemistry. 1975. V. 12. № 1. P. 97-99.
16. *Chesham J., Anderton S. W., Kingdon C. F. M.* // Clin. Chem. 1986. V. 32. № 4. P. 669-671.
17. *Tahboud Y. R., McGown J. B.* // Anal. chim. acta. 1986. V. 182. № 1. P. 185-192.
18. *Yamazaki H., Nishi S., Hirai H.* // Hokkaido Univ. Med. Libr. Ser. 1983. V. 15. P. 163-172.
19. *Maiolini R., Masseyeff R.* // J. Immunol. Meth. 1975. V. 8. № 3. P. 223-234.
20. *Jensenius J. C., Siersted H., Johnstone A. P.* // J. Immunol. Meth. 1983. V. 56. № 1. P. 19-39.
21. *Wakefield E., Shelton M., Hosking C.* // Clin. chim. acta. 1982. V. 123. № 3. P. 303-310.
22. *Cobb M.* // Automated fluorescence immunoassay: current technology and its application in the syva advance fluorescence immunoassay system. Proceedings/Eds Ullman E. F., Cobb M., Opheim K. E. Syva Company, 1983. P. 10-16.
23. *Kuo J. E., Milby K. H., Hainsberg W. D., Poole P. B., McGuffin V. L., Zare R. N.* // Clin. Chem. 1985. V. 31. № 1. P. 50-53.
24. *Halliday J. W., Gera K. L., Powell L. W.* // Clin. chim. acta. 1975. V. 58. № 3. P. 207-214.
25. *Konijn A. M., Levy R., Link G., Hershko C.* // J. Immunol. Meth. 1982. V. 54. № 3. P. 297-307.
26. *Ferritin Kit.* Prospect N1244-1000-01. Turku: LKB - Wallac Oy. 1986. 4 p.
27. Наборы реактивов для радиоиммунологического микроанализа. Каталог. Минск: Полюмя, 1985. 15 с.
28. *Литрохина Т. Г., Осипов А. П., Гаврилова Е. М., Сорокина Н. В., Егоров А. М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1983. Т. 19. № 1. С. 143-151.
29. *Soini E., Kojola H.* // Clin. Chem. 1983. V. 29. № 1. P. 65-68.
30. *Hopton M. R., Harrop J. S.* // Clin. Chem. 1986. V. 32. № 4. P. 694-693.
31. *Pekary A. E., Turner L. F., Hershman J. M.* // Clin. Chem. 1986. V. 32. № 3. P. 511-514.
32. *Lowson N., Mike N., Wilson R., Pandov H.* // Clin. Chem. 1986. V. 32. № 4. P. 684-686.
33. *Muralidhar K., Chaudhuri G., Lippes J., Bahl O. P.* // Z. Naturforsch. Sect. C. 1983. V. 38. H. 5/6. S. 451-457.
34. LKB News, Autumn. - Klippan: Tullbergs AB, 1984. P. 2-5.
35. *Nishida S., Matsumura S., Horino M., Oyama H., Tenka O.* // Kawasaki Med. J. 1976. V. 2. № 2. P. 81-89.
36. *Kominami G., Fujisaka I., Yamauchi A., Kono M.* // Clin. chim. acta. 1980. V. 103. № 3. P. 381-391.
37. *Kobayashi Y., Yahata M., Watanabe F., Miyai K.* // J. Steroid Biochem. 1982. V. 46. № 4. P. 521-524.
38. *Gorevic P. D., Prelli F. C., Frangione B.* // Meth. Enzymol. 1985. V. 116. Part II. P. 3-25.
39. *Кэлер Д.* // Иммунология. Методы исследований/Ред. Лефковитс И., Перлис Б. М.: Мир, 1983. С. 313-328.
40. *Miller J. N.* // Chem. Brit. 1981. V. 17. № 2. P. 62, 63, 66, 67.
41. *Ляшненко В. А., Воробьев А. А.* Молекулярные основы иммуногенности антигенов. М.: Медицина, 1982. 272 с.
42. *Петров Р. В., Хоитов Р. М., Манько В. М., Михайлова А. А.* Контроль и регуляция иммунного ответа. Л.: Медицина, 1981. 312 с.
43. *Шаганина К. Л.* // Иммунохимический анализ/Ред. Зильбер Л. А. М.: Медицина, 1968. С. 202-223.
44. Miles Laboratories Inc. Патент ЕПВ № 0088974. Приоритет США № 359610 от 18.03.82, опубл. 21.09.83, МКИ 3 G01 N 33/54.
45. *Dandliker W. B., Hsu M. L., Levin J., Rao B. R.* // Meth. Enzymol. 1981. V. 74. P. 3-28.
46. *Форни Л.* // Методы исследований в иммунологии/Ред. Лефковитс И., Перлис Б. М.: Мир, 1981. С. 164-180.
47. *Chen R. F., Scott C. H.* // Anal. Lett. 1985. V. A18. № 4. P. 393-421.
48. *Blakeslee D., Baines M.* // J. Immunol. Meth. 1976. V. 13. № 2. P. 305-320.
49. *Brandtzaeg P.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1975. V. 254. P. 35-54.
50. *Ullman E. F., Khanna P.* // Meth. Enzymol. 1981. V. 74. P. 28-60.
51. *Thakrar H., Miller J. N.* // Anal. Proc. 1982. V. 19. № 6. P. 329-330.

52. *Ngo T. T., Carrico R. J., Boguslaski R. C., Burd J. F.* // *J. Immunol. Meth.* 1981. V. 42. № 1. P. 93-103.
53. *Wolffbeis O. S., Koller E., Hochmuth P.* // *Bull. Chem. Soc. Jap.* 1985. V. 58. № 2. P. 731-734.
54. *Шибнев В. А., Финогенова М. И., Полегаев А. П., Марьяш Л. И.* // *Биооргани. химия.* 1984. Т. 10. № 7. С. 921-926.
55. *Rasnick D. W., Bissel E. R.* Патент США № 4505852, заявл. 29.11.82, № 445280, опубл. 19.03.1985, МКИ<sup>3</sup> С 07 С 103/52, НКИ 260/112. 5R.
56. *Rothbarth P. H., Olthhof J. G., Mul N. A. J.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1975. V. 254. P. 65.
57. *Bailey M. P., Rocks B. F., Riley C.* // *Ann. Clin. Biochem.* 1984. V. 21. P. 59-63.
58. *Handshin U. E., Ritschard W. J.* // *Anal. Biochem.* 1976. V. 71. P. 143-155.
59. *Моложковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.* // *Биооргани. химия.* 1982. Т. 8. № 9. С. 1256-1262.
60. *Liburdy R. P.* // *J. Immunol. Meth.* 1979. V. 28. № 3. P. 233-242.
61. *Miller J. N., Lim C. S., Bridges J. N.* // *Analyst.* 1980. V. 105. № 2. P. 91-92.
62. *Schmidt D., Steffen H.* Патент ЕПВ № 0127797, приоритет Швейцарии № 3045/83 от 03.06.83, опубл. 10.05.1984, МКИ<sup>3</sup> С 07 D 487/22.
63. *Hendrix J. L.* Патент ЕПВ № 0071991, приоритет США № 291793 от 10.08.81, опубл. 16.02.1983. МКИ<sup>3</sup> G 01 N 33/58, 21/64.
64. *Glazer A. N., Stryer L.* // *Trends Biochem. Sci.* 1984. V. 9. № 10. P. 423-427.
65. *Химические реактивы для люминесцентного анализа.* М.: Изд. ИРЕА, 1970. 39 с.
66. *Божесвольнов Е. А.* Люминесцентный анализ неорганических веществ. М.: Химия, 1966. 416 с.
67. *Dakubu S., Ekins R. P.* // *Anal. Biochem.* 1985. V. 144. № 1. P. 20-26.
68. *Bailey M. P., Rocks B. F., Riley C.* // *Analyst.* 1985. V. 110. № 6. P. 603-604.
69. *Hendrix J. L.* // *Clin. Chem.* 1983. V. 29. № 5. P. 1003.
70. *Kronick M. N.* // *J. Immunol. Meth.* 1986. V. 92. № 1. P. 1-13.
71. *Katsh S., Leaver F. W., Reynolds J. S., Katsh G. F.* // *J. Immunol. Meth.* 1974. V. 5. № 2. P. 179-187.
72. *Reynolds G. A., Drexhage K. H.* // *Optics Commun.* 1975. V. 13. № 3. P. 222-225.
73. *Ullman E. F., Schwarzberg M., Rubenstein E. K.* // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 14. P. 4172-4178.
74. *Hemmilä I., Soini E., Lövgren T.* // *Fresenius' Z. anal. Chem.* 1982. V. 311. № 4. P. 357.
75. *Burgett M. W., Fairfield S. J., Monthony J. F.* // *J. Immunol. Meth.* 1977. V. 16. № 3. P. 214-219.
76. *Blanchard G. C., Gardner R.* // *Clin. Chem.* 1978. V. 24. № 5. P. 808-814.
77. *Григорьян О. Н., Строев К. Г., Чибусова В. А.* // *Лаб. дело.* 1981. № 6. С. 355-357.
78. *Rehbinder D.* // *J. Clin. Chem. and Clin. Biochem.* 1981. V. 19. № 8. P. 555.
79. *Sittary H., Hemmilä I., Soini E., Lövgren T., Koistinen V.* // *Nature.* 1983. V. 301. № 5897. P. 258-260.
80. *Joronen I., Hopsu-Haru V. K., Manninen M., Rinne A., Järvinen M., Halonen P.* // *J. Immunol. Meth.* 1986. V. 86. № 2. P. 243-247.
81. *Calvin J., Burling K., Blow C., Barnes I., Price C. P.* // *J. Immunol. Meth.* 1986. V. 86. № 2. P. 249-256.

Поступила в редакцию  
23.IV.1986  
После доработки  
2.IV.1987

## FLUOROIMMUNOASSAY OF PROTEINS

TSYPLENKOV P. V., MOROZOV V. I., ROGOZKIN V. A.

*Department of Hormone Regulation, Scientific Research Institute  
of Physical Culture, Leningrad*

Review contains new data on protein fluoroimmunoassay (FIA), which combines advantages of RIA and EIA. Basic approaches to antibody production, principles of homogeneous and heterogeneous FIA as well as of time-resolved FIA properties of 28 fluorescent labels presenting various classes of organic compounds (of which most prospective are aminoquinolone, cyanocoumarines, chlorophylls, phycobiliproteins, metalloorganic compounds) are described. Some examples of FIA application for quantitative evaluation of proteins in biological samples, properties of some FIA kits, and specifications of 6 fluorimeters developed for FIA are given. The nearest perspectives of FIA development and application in medical and biological research are considered.