



УДК 579.862.1'114.083.331

© 1994 И. С. Павлова, Ю. В. Лукин, В. А. Коваленко,
Д. Н. Авдеев, В. А. Кульшин, В. П. Зубов

НЕИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ НА ОСНОВЕ
ОКРАШЕННЫХ ПОЛИАКРОЛЕИНОВЫХ ЛАТЕКСОВ.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА
Streptococcus pyogenes

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
РАН, Москва

Ключевые слова: полиакролеиновые латексы, иммунофильтрация, латексная агглютинация, дот-иммуноанализ, ИФА, *Streptococcus pyogenes*.

На основе окрашенных полиакролеиновых латексов разработаны неинструментальные методы иммуноанализа группоспецифического полисахарида *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А), включающие дот-анализ в режиме фильтрации и реакцию агглютинации латекса в планшете (РАЛП). Сравнение латексных тестов с сэндвич-ИФА показало, что наиболее чувствительным методом является РАЛП, который позволяет выявлять до 0,05 нг А—ПС/мл за 1,5 ч. Чувствительность сэндвич-ИФА оказалась в 10 раз ниже по сравнению с РАЛП при большей продолжительности и трудоемкости анализа. Чувствительность иммунофильтрации составляет 50 нг/мл при продолжительности анализа 3—5 мин. Показано отсутствие перекрестных реакций латексных конъюгатов с лизатами клеток стрептококков групп В, С и G. Предложенные методы просты в постановке, не требуют сложного лабораторного оборудования и доступны широкому кругу исследователей.

В последнее время наряду с дальнейшим совершенствованием традиционного иммуноанализа (ИФА, РИА) ведется интенсивный поиск новых иммуноаналитических методов, основанных на неинструментальном способе детекции анализируемых объектов. Активное развитие неинструментальных методов анализа связано с необходимостью проведения экспресс-тестов в малооборудованных лабораториях, кабинете врача, в домашних и полевых условиях. К таким методам относятся, в частности, реакция агглютинации, а также дот-иммуноанализ, в котором помимо ферментных маркеров недавно начали использовать также различные корпускулярные метки, такие, как коллоидное золото [1, 2], коллоид-

Сокращения: АТ — антигено; БСА — бычий сывороточный альбумин; КОЕ — колониеобразующая единица; ПАЛ — полиакролеиновый латекс; ПХ — пероксидаза хрена; ПС — полисахарид, А-, В-, С-, G-ПС — группоспецифические полисахариды поверхностной стенки стрептококков групп А, В, С и G; РАЛП — реакция агглютинации латекса в планшетах; РИА — радиоиммунный анализ; ФСР — фосфатно-солевой раствор, pH 7,4; ФСРГ — ФСР, содержащий 0,05% Tween 20.

ные красители [3, 4], латексы [5]. Для разработки неинструментальных тест-систем значительный интерес представляют окрашенные полимерные латексы, которые могут быть использованы не только как носители в агглютинационных тестах, но также в качестве маркера в дот-иммуноанализе. Иммуноанализ на основе цветных латексов позволяет существенно сократить и упростить процедуру тестирования, не требуя сложного лабораторного оборудования и специально обученного персонала.

Цель данной работы — разработка и сравнительная характеристика методов дот-иммуноанализа и реакции агглютинации на основе окрашенных полиакролеиновых латексов на примере тестирования группоспецифического полисахарида *S. pyogenes* (стрептококк группы А), а также сравнение их со стандартным сэндвич-вариантом ИФА.

При разработке иммуноаналитических методов определения А—ПС были использованы поликлональные антитела, выделенные из сыворотки крови ослы, иммунизированного разрушенными клетками *S. pyogenes*. Для повышения чувствительности тест-систем антитела были подвергнуты аффинной очистке на колонке с иммобилизованным очищенным А—ПС. Содержание анти-А—ПС-антител (далее — АТ) в иммунной сыворотке составляло 0,8—1,5 мг/мл. По активности ослиные поликлональные антитела не отличались от аффинно очищенных поликлональных кроличьих антител. Сравнение проводили либо с антителами фирмы Wellcome, либо с антителами, выделенными из сывороток кроликов, иммунизированных разрушенными клетками *S. pyogenes* (сыворотки получены в лаборатории стрептококковых инфекций I ММИ им. И. М. Сеченова). Аффинно очищенные поликлональные ослиные антитела были в дальнейшем использованы в качестве нижних антител в сэндвич-варианте ИФА, а также для конъюгирования с ферментной (пероксидаза хрена) и неферментной корпускулярной меткой (ПАЛ).

Для синтеза ферментных конъюгатов была выбрана щелочная изоформа пероксидазы хрена. Полученные конъюгаты использовали без дальнейшего фракционирования, поскольку предварительные эксперименты показали, что дополнительная хроматография на сефакриле S 300 не приводит к увеличению их активности. Активность конъюгатов, полученных на основе ослиных и кроличьих аффинно очищенных антител, были очень близки. Сравнение активности различных антител, а также их конъюгатов с пероксидазой хрена проводили при определении очищенного А—ПС в сэндвич-варианте ИФА в планшетах.

Для разработки неинструментальных тестов нами были использованы мелкие и крупные окрашенные полиакролеиновые латексы (ПАЛ) с диаметром частиц 0,35 и 2,0 мкм соответственно. Первоначально ПАЛ сенсibilизировали путем ковалентного связывания антител с поверхностными альдегидными группами с образованием оснований Шиффа. Такие конъюгаты обладали высокой активностью в реакции с А—ПС, однако часто давали неспецифические реакции с лизатами клеток стрептококков В, С и G. Для устранения этого недостатка использовали непрямой метод иммунизации антител. В этом случае ПАЛ предварительно модифицировали полимерным белковым спейсером, активировали ганином, а затем инкубировали с антителами. Для модификации использовали БСА, овальбумин и казеин, однако только последний позволил полностью устранить неспецифические взаимодействия конъюгатов с тестируемыми лизатами.

Далее в предварительных опытах определяли оптимальную сенсibilизирующую дозу (нагрузку) антител. Активность полученных конъюгатов тестировали либо с помощью иммунофльтрации при прямом нанесении на мембрану антигена (для мелких ПАЛ), либо с помощью РАЛП (для крупных ПАЛ). Как оказалось, с увеличением нагрузки активность конъюгатов плавно возрастала. В то же время зависимость активности конъюгатов от нагрузки антител несколько различалась для мелких и крупных ПАЛ. Так, для мелких ПАЛ при нагрузке антител, превышающей 20 мкг АТ/мг ПАЛ, дальнейшего увеличения чувствительности анализа (0,1 нг А — ПС/дот) не наблюдалось. В случае крупных ПАЛ

Таблица 1

Сравнение чувствительности различных вариантов дот-иммуноанализа при тестировании очищенных ПС (I) и лизатов клеток (II) с помощью латексного и ферментного конъюгатов *

Группа стрептококков	Чувствительность			
	I (нг/мл)		II (КОЕ/мл)	
	АТ—ПАЛ	АТ—ПХ	АТ—ПАЛ	АТ—ПХ
A	50/10	50/5	$10^6/10^6$	$10^6/10^6$
B	—	—	—	—
C	—	—	—	—
G	—	—	—	—

* Косой чертой разделены данные, полученные в фильтрационном и статическом режиме; прочерк означает отрицательную реакцию при концентрации ПС < 5 мкг/мл (I) и клеток < 10^7 КОЕ/мл (II).

Таблица 2

Сравнение чувствительности РАЛП и ИФА при тестировании очищенных полисахаридов (I) и лизатов клеток стрептококков (II) *

Группа стрептококков	Чувствительность			
	I (нг/мл)		II (КОЕ/мл)	
	РАЛП	ИФА	РАЛП	ИФА
A	0,05	0,5	10^4	$5 \cdot 10^5$
B	—	—	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7$
C	—	—	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7$
G	—	—	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7$

* Прочерк означает отрицательную реакцию при концентрации полисахаридов менее 100 нг/мл.

при нагрузке более 10 мкг АТ/мг наблюдалась частичная флокуляция частиц при постановке РАЛП.

При разработке дот-иммуноанализа в качестве носителя была выбрана нитроцеллюлозная мембрана с диаметром пор 1,2 мкм, а в качестве маркера — ПАЛ красного цвета с диаметром частиц 0,35 мкм, что обеспечивало быструю фильтрацию латексных конъюгатов через мембрану. Латексные конъюгаты (0,35 мкм) с нагрузкой 20 мкг АТ/мг ПАЛ были использованы для тестирования очищенных полисахаридов и лизатов клеток стрептококков различных групп с помощью сэндвич-варианта дот-иммуноанализа в статическом и фильтрационном режиме. В этом случае на поверхности мембраны были сорбированы аффинно очищенные антитела против А—ПС. Далее фильтры инкубировали в растворе антигена, а затем в суспензии конъюгата АТ—ПАЛ (статический режим) или помещали в микрофильтрационную ячейку и последовательно пропускали через мембрану те же реагенты (фильтрационный режим). Аналогичный анализ проводили также с ферментным конъюгатом АТ—ПХ.

Как следует из табл. 1, при тестировании очищенных полисахаридов чувствительность иммунофильтрационного анализа с помощью латексного и ферментного конъюгатов примерно одинаковая. Значение концентрации 50 нг/мл при-

близительно соответствует 0,1 нг А—ПС на дот, что согласуется с данными по прямому определению сорбированного антигена. При проведении анализа в статическом режиме чувствительность возрастает в 5—10 раз, что, вероятно, связано с увеличением времени взаимодействия антител и антигена. При тестировании лизатов клеток стрептококков чувствительность различных вариантов дот-иммуноанализа оказалась практически одинаковой. Очевидно, при 10-кратном разведении анализируемых лизатов более тонкие различия в чувствительности исследуемых методов не выявляются. Отрицательная реакция, наблюдаемая при тестировании гетерологичных антигенов (очищенные полисахариды и лизаты клеток стрептококков групп В, С и G), свидетельствует о специфичности латексного дот-иммуноанализа.

В качестве альтернативного неинструментального метода определения группоспецифического полисахарида *S. pyogenes* была выбрана реакция агглютинации латекса в планшетах (РАЛП), которая является одним из высокочувствительных методов неинструментальной диагностики [6, 7]. В отличие от дот-иммуноанализа в этом методе предпочтительно использовать крупные латексные микросферы (с диаметром более 1,5 мкм), поскольку продолжительность анализа в этом случае лимитируется скоростью седиментации латекса в лунке планшеты.

Чувствительность и специфичность РАЛП определяли при тестировании очищенных полисахаридов и лизатов клеток стрептококков различных групп, используя для анализа конъюгаты с нагрузкой 10 мкг АТ/мг ПАЛ. Параллельно те же антигены тестировали в сэндвич-варианте ИФА.

Как следует из табл. 2, РАЛП имеет в 10 раз более высокую чувствительность (0,05 нг А—ПС/мл) по сравнению с ИФА. Такая значительная разница в чувствительности этих методов связана, вероятно, с особенностями структуры тестируемого полисахарида, состоящего из повторяющихся разветвленных звеньев и поэтому легко образующего пространственную «сетку» агглютинировавших частиц. При определении очищенных полисахаридов стрептококков различных групп перекрестных реакций не наблюдали. Незначительную перекрестную реакцию, наблюдаемую при тестировании лизированных клеток стрептококков групп В, С и G с высокой концентрацией (более $5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл), можно объяснить, по-видимому, тем, что при гидролизе полисахаридов клеточной стенки с помощью комплекса ферментов из *S. levoris* в образцах появляются фрагменты пептидогликана, содержащие N-ацетилглюкозамин, который является иммунодоминантой группоспецифического А—ПС [8].

Как показано в данной работе, использование полимерных латексных носителей — маркеров открывает широкие возможности для оптимизации твердофазных неинструментальных методов иммуноанализа. Полимерные латексы могут быть легко синтезированы в широком диапазоне размеров частиц с различными функциональными группами и физико-химическими свойствами. Возможность введения в латексные частицы красителей и других контрастирующих агентов создает дополнительные преимущества в использовании латексов в визуальных методах анализа.

Нами в качестве носителя были использованы окрашенные ПАЛ с различным диаметром частиц, который можно легко регулировать на стадии синтеза введением SDS в количестве 0—4%. К преимуществам ПАЛ относятся яркая окраска, а также высокая плотность полимера ($1,3 \text{ г/см}^3$), что обеспечивает быструю седиментацию частиц с диаметром 1,5—2,0 мкм и позволяет значительно сократить продолжительность РАЛП (до 1,0—1,5 ч). Для сравнения: продолжительность РАЛП при использовании полистирольных латексов составляет 18 ч [7]. Кроме того, ПАЛ содержат реакционноспособные альдегидные группы, удобные как для прямой ковалентной иммобилизации белков, так и для поверхностной модификации частиц с целью введения других функциональных групп или спейсеров. В данном случае латексные конъюгаты, полученные путем непрямого сенсibilизации через белковый спейсер, обладали большей специфичностью по сравнению

Сравнение различных методов латексного иммуноанализа и ИФА в определении А—ПС

Метод	Чувствительность, нг/мл		Время анализа, мин	
	АТ—ПАЛ	АТ—ПХ	АТ—ПАЛ	АТ—ПХ
Имунофилтрация	50	50	3	5
Дот-имуноанализ	10	5	75	90
ИФА	—	0,5	—	150
РАЛП	0,05	—	90	—

с конъюгатами, полученными прямой ковалентной иммобилизацией антител на ПАЛ, и поэтому были в дальнейшем использованы для разработки дот- и агглютинационных тестов.

Как видно из табл. 3, наиболее чувствительным методом определения А—ПС является РАЛП (0,05 нг/мл), наименее — иммунофилтрация (50 нг/мл). Значительная разница в чувствительности (3 порядка) этих двух методов несколько компенсируется существенно меньшим временем проведения иммунофилтрации (3 мин) по сравнению с РАЛП (1,5 ч). Именно эти факторы (чувствительность и продолжительность анализа) и являются определяющими при выборе конкретного метода в зависимости от задач исследования и условий, в которых должен проводиться анализ. Использование в методе иммунофилтрации ферментной метки не приводит к изменению чувствительности анализа, что, вероятно, связано с тем, что лимитирующей стадией данного метода оказывается взаимодействие антиген—антитело, ограниченное временем филтрации.

Проведение дот-имуноанализа в статическом режиме приводит к определенному возрастанию чувствительности (в 5—10 раз), однако при этом увеличивается продолжительность (до 1,5 ч) и усложняется процедура анализа. Ранее в работе [3] такая же чувствительность (10 нг/мл) была получена в сэндвич-варианте дот-имуноанализа видоспецифических иммуноглобулинов при использовании в качестве метки коллоидных текстильных красителей. По-видимому, при использовании коллоидных маркеров чувствительность дот-имуноанализа лимитируется относительно низкой емкостью твердой фазы и/или ограниченной зоной взаимодействия иммобилизованных антител с антигеном.

По сравнению с дот-имуноанализом ИФА обладает более высокой чувствительностью (0,5 нг/мл А—ПС), однако продолжительность тестирования составляет около 2,5 ч, а для интерпретации результатов необходимо использование специального оборудования. При сокращении времени инкубации с антигеном и конъюгатом АТ—ПХ до 30 мин чувствительность ИФА уменьшается до 5 нг/мл.

Наиболее чувствительным методом оказалась РАЛП, при этом процедура анализа осуществляется всего в одну стадию путем смешивания анализируемой пробы и суспензии конъюгата. Этот метод оказался единственным из рассмотренных нами, чувствительность которого достаточно высока для первичной диагностики стрептококковых инфекций, требующей определения около 10^4 КОЕ/мл [8].

Сравнительная характеристика различных цветных коллоидных носителей, использовавшихся ранее [1—5] в неинструментальных методах анализа, позволяет выявить определенные преимущества ПАЛ по сравнению с другими маркерами. Так, конъюгаты на основе коллоидного золота [1, 2], хотя и хорошо охарактеризованы, имеют фиксированный размер и достаточно дороги. Использование в качестве метки люминесцентных коллоидных частиц [4] ограничивает область их применения кругом научно-исследовательских лабораторий, так как для визуализации сигнала требуется по крайней мере УФ-лампа. Возможность получения активных конъюгатов на основе дисперсных текстильных красителей [3], по свой-

ствам наиболее напоминающих ПАЛ, зависит от удачного обнаружения подходящей партии красителя. Так, из 12 исследованных красителей авторам удалось обнаружить только 2, обеспечивающих достаточную чувствительность анализа. В отличие от перечисленных выше носителей конъюгаты на основе ПАЛ легко стандартизуемы, обладают высокой иммунохимической активностью и незначительным уровнем неспецифического связывания и в зависимости от размера частиц могут быть использованы в качестве носителя и/или маркера в инструментальных методах иммуноанализа.

Экспериментальная часть

Микробиологические культуры. В работе были использованы культуры *S. pyogenes* (стрептококк группы А типа 29М (M⁺, штамм Д23, № 62/59)), *S. agalacticae* (стрептококк группы В (V9 № 8/66)), *S. zooepidemicus* (стрептококк группы С (Chester № 41/59, Пражская коллекция)) и *S. lenpus* (стрептококк группы G (Valente № 22/58) (Пражская коллекция)) средней логарифмической фазы роста, выращенные на бульоне Тодда-Хьютта (Difco, США). После выращивания клетки отмывали ФСР. Лизис клеток стрептококка проводили комплексом ферментов, выделенных из культуральной жидкости *Streptomyces levoris* [8]. Для этого клетки стрептококка разводили ФСР до плотности $5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, добавляли комплекс ферментов до концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали в течение 1 ч при 37° С. Процесс лизиса останавливали температурной инактивацией фермента путем 3-минутного кипячения на водяной бане.

Дезинтеграцию клеток стрептококка проводили на экструзионном X-прессе. Разрушенные клетки суспендировали в охлажденном физиологическом растворе и фракцию клеточных стенок отделяли от неразрушенных клеток дифференциальным центрифугированием при 500g 10 мин, а затем при 10 000g 30 мин. Выделенные клеточные стенки тщательно отмывали от цитоплазмы физиологическим раствором и суспендировали в формамиде (6 мл формамида на 1 г осадка влажных клеточных стенок). Суспензию нагревали 1 ч при 170° С, периодически перемешивая. Нерастворившийся остаток клеточных стенок удаляли центрифугированием при 14 000 об/мин, а супернатант осаждали 5—10 объемами подкисленного этанола (20 г ацетата натрия на 1 л спирта). Полученный супернатант концентрировали упариванием на роторном испарителе и полисахарид осаждали 5-кратным объемом ацетона. Осадок растворяли в воде, подкисляли 2 н. HCl до pH 3,0—3,2, выпавший осадок отделяли центрифугированием, супернатант концентрировали на роторном испарителе и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50, уравновешенным 1% AcOH. Материал, элюировавшийся в объеме, равном свободному объему колонки, концентрировали на роторном испарителе и лиофилизовали. Выход полисахарида 0,5—1,0% в пересчете на осадок влажных клеток. Строение полисахарида А было подтверждено данными ¹³C-ЯМР-спектроскопии. Молскулярная масса, по данным ВЭЖХ на колонке TSK G2000SW (Тою Soda, Япония), соответствовала 7—10 кДа.

Полисахарид А подвергали контролируемому окислению периодатом натрия и конъюгировали с гидразидным производным БСА методом восстановительного аминирования согласно [9]. Гидразидное производное БСА было получено активацией белка водорастворимым карбодиимидом (1-этил-3-(диметиламинопропил)карбодиимид, Sigma, США) в 1 М растворе хлоргидрата гидразина с pH 5,5. Полученный конъюгат БСА—А—ПС был отделен от непрореагировавшего полисахарида исчерпывающей диалфильтрацией на мембране PM-30, обессолен и лиофилизован. Содержание углеводов в синтезированном конъюгате, оцененное методом [10], составляло 20%.

Конъюгат БСА—А—ПС был иммобилизован на сфазозе 4В, активированной BrCN согласно методу [11]. Содержание лиганда (по белку) составляло 2—4 мг/мл аффинного сорбента.

Антитела против А—ПС получали из свежей или лиофилизированной сыворотки осла, иммунизированного разрушенными клетками *S. pyogenes* (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи РАМН). Для этого сначала выделяли суммарную иммуноглобулиновую фракцию путем высаливания 40% водным раствором сульфата аммония. После центрифугирования полученный осадок промывали 2—3 раза 40% раствором сульфата аммония в ФСР, растворяли в ФСР и диализовали против того же раствора. Аффинно очищенные антитела получали хроматографированием суммарной иммуноглобулиновой фракции на сефарозе 4В с иммобилизованным А—ПС. После рециркуляции (ночь при 4° С) и отмывки несвязавшихся белков ФСР антитела элюировали 0,1 М глицин-НСl, рН 2,4, а затем диализовали против ФСР. Далее аффинные А—ПС-антитела подвергали гель-фильтрации на сефакриле S-300 для удаления агрегированных форм. Фракции, содержащие мономерные IgG, помещали в диализную трубку и концентрировали путем инкубации в 25% растворе полиэтиленгликоля-35 000 в ФСР, диализовали против ФСР и хранили при 4° С.

Конъюгаты антител против А—ПС с пероксидазой хрена (АТ—ПХ) были получены по методу [12] с некоторыми модификациями. Для конъюгации использовали аффинно очищенные антитела (4—6 мг/мл), диализованные против 0,1 М бикарбонатного буфера, рН 9,6. Окисление пероксидазы (8 мг/мл; Центр «Агротехника», Львов) проводили в воде при концентрации периодата натрия 20 мМ в течение 20 мин при 20° С. Конъюгацию антител и окисленной формы пероксидазы осуществляли в 0,1 М NaHCO₃, рН 9,6, при 20° С в течение 3 ч, молярное соотношение АТ—ПХ составляло 1,2 : 1,0. Конъюгаты, восстановленные боргидридом натрия (0,4 мг/мл), использовали без последующего фракционирования.

Для постановки ИФА использовали планшеты Dynatech MicroELISA (Dynatech, ФРГ). Планшеты сенсibilизировали аффинно очищенными А—ПС-антителами (2 мкг/мл) в 0,1 М NaHCO₃, рН 9,6, ночь при 4° С, отмывали 3 раза ФСРТ и блокировали ФСРТ, содержащим 2 мг/мл БСА, 30 мин при 37° С. Этот же буфер использовали для разведения антигенов (очищенные полисахариды или лизаты клеток) и конъюгата АТ—ПХ. Далее готовили серию 2-кратных (очищенные полисахариды) или 10-кратных (клеточные лизаты) разведений антигена и инкубировали 1 ч при 37° С. Отмывали 5 раз ФСРТ и инкубировали с конъюгатом АТ—ПХ (1 мкг/мл) также 1 ч при 37° С. После 5-кратной промывки ФСРТ добавляли 50 мМ NaAc, рН 5,0, содержащий 0,5 мг/мл *орто*-фенилендиамина, инкубировали в темноте в течение 5—15 мин и останавливали реакцию добавлением 1,7 н. H₂SO₄.

ПАЛ получали полимеризацией 4% (вс.) акролеина (Fluka, ФРГ) в водно-щелочной среде при рН 10,5 в присутствии водорастворимого красителя (родамин Ж или кристаллический фиолетовый (Serva, ФРГ)) в концентрации 0,01—0,02% и SDS 0—4% [13]. Полученные микросферы выдерживали 3 ч при 60° С в присутствии 4% персульфата аммония, отмывали от примесей микрофильтрацией и ресуспендировали в ФСР. Средний диаметр частиц ПАЛ измеряли с помощью автоматического анализатора субмикронных частиц Coulter N4-MD (Coultronics, Франция).

Сенсibilизацию ПАЛ проводили по методу [6] с некоторыми модификациями. К 1% ПАЛ в ФСР добавляли БСА, овальбумин или казеин (Serva, ФРГ) до концентрации 5 мг/мл и инкубировали 1 ч при 37° С (при постоянном перемешивании для крупных ПАЛ). Модифицированные таким образом ПАЛ дважды отмывали ФСР, рН 6,5, 1 раз водой и суспендировали в воде (до 5%). Далее смешивали равные объемы 5% модифицированного ПАЛ и водного раствора танина (0,5 мг/мл; Sigma, США), инкубировали 30 мин при 37° С и отмывали 1 раз водой и 2 раза ФСР, рН 6,5. Затем к 5 мг активированного ПАЛ добавляли от 5 до 200 мкг аффинно очищенных антител, объем доводили до 1 мл ФСР, рН 6,5, и инкубировали 1 ч при 37° С. Суспензию ПАЛ отмывали 2 раза ФСР, рН 6,5, суспендировали в 500 мкл того же буфера, содержащего 0,5 мг/мл

овальбумина, и инкубировали 1 ч при 37° С. Конъюгаты АТ—ПАЛ хранили при 4° С.

Для проведения *dot-иммуноанализа* использовали нитроцеллюлозные фильтры AE95 (S&S, ФРГ) с диаметром пор 1,2 мкм. Все процедуры проводили при 20° С. При тестировании ПСХ в сэндвич-варианте на поверхность фильтров наносили по 2 мкл аффинно очищенных антител против А—ПС (50 мкг/мл). Фильтры высушивали на воздухе и блокировали 30 мин ФСРТ, содержащим 1,0 мг/мл овальбумина. При проведении анализа в статическом режиме фильтры с сорбированными антителами инкубировали 30 мин в растворе антигена (очищенные полисахариды или лизаты клеток) и после 3-кратной промывки ФСРТ инкубировали либо в растворе АТ—ПХ (2 мкг/мл), либо в суспензии АТ—ПАЛ (0,1%) также в течение 30 мин, после чего фильтры снова промывали ФСРТ. Для разведения антигенов и конъюгатов (АТ—ПАЛ и АТ—ПХ) использовали ФСРТ, содержащий овальбумин (1,0 мг/мл). При проведении анализа в режиме фильтрации использовали микрофильтрационную ячейку (V. Tech, USA), представляющую собой цилиндрический корпус с находящимся внутри адсорбентом и держателем для мембраны, расположенным в верхней части устройства. Конструкция устройства обеспечивает быструю фильтрацию реагентов через мембрану за счет впитывания жидкости в адсорбент. Анализ заключался в последовательной фильтрации раствора полисахарида, ФСРТ, конъюгата АТ—ПХ (5 мкг/мл) или АТ—ПАЛ (0,1%) и ФСРТ через мембрану с нанесенными антителами. Время фильтрации составляло около 1 мин. Ферментативную реакцию в случае конъюгатов с пероксидазой проводили в 50 мМ имидазоле, рН 7,5, содержащем 0,02% H_2O_2 , 2 мг/мл хлор-нафтола с добавлением диаминофенилендиамин (0,2 мг/мл) и бисульфита натрия (0,1 мг/мл) для повышения чувствительности реакции согласно [14]. Продолжительность инкубации с раствором субстрата составляла около 30 с (иммуофильтрация) или 3—5 мин (статический режим). Результат учитывали визуально. При положительной реакции в области нанесения антител появлялось ярко-красное (ПАЛ) или синее (ПХ) пятно, при отрицательной пятна отсутствовали.

Для сравнения активности латексных конъюгатов с различной нагрузкой использовали фильтры с нанесенным БСА—А—ПС. В качестве антигена использовали конъюгат А—ПС с БСА, поскольку, как было обнаружено в предварительных опытах, очищенные полисахариды плохо связываются с нитроцеллюлозой. После блокирования фильтры сразу инкубировали с суспензией сенсibilизированных ПАЛ (0,1%) либо в статическом, либо в фильтрационном режиме. Каждый анализ проводили трижды.

Для постановки РАЛП использовали 96-луночные планшеты для микротитрования Titertek (Flow Lab., США) с U-образным дном. В лунки разливали по 25 мкл ФСР, содержащего 1,0 мг/мл овальбумина, далее готовили серию 2-кратных (очищенные полисахариды) или 10-кратных (клеточные лизаты) разведений антигена, добавляли равный объем конъюгата АТ—ПАЛ, встряхивали вручную и оставляли до образования четкой агглютинационной картины (около 1,5 ч). Результат оценивали визуально. Отрицательной реакция считается в том случае, когда частицы латексного конъюгата оседают на дне лунки в виде компактной «пуговки». При положительной реакции латексные частицы после осаждения должны покрывать не менее 1/3 поверхности лунки в виде «зонтика». Отрицательный контроль ставили с ФСР в присутствии 1,0 мг/мл овальбумина. Каждый анализ проводили трижды.

Авторы благодарят канд. мед. наук Н. И. Брико и сотрудников лаборатории стрептококковых инфекций I Моск. мед. института им. И. М. Сеченова за предоставление лизатов клеток стрептококков различных групп, а также И. В. Амбросова за помощь в получении аффинно очищенных антител.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hsu Y.//Anal. Biochem. 1984. V. 142. № 1. P. 221—225.
2. Moeremans M., Daneels G., VanDijck A., Langanger G., DeMey J.//J. Immunol. Meth. 1984. V. 74. № 2. P. 353—360.
3. Snowden K., Hommel M.//J. Immunol. Meth. 1991. V. 140. № 1. P. 57—65.
4. Beverloo H. B., van Schadewijk A., Zijlmans H., Tanke H.//Anal. Biochem. 1992. V. 203. № 2. P. 326—334.
5. Jaeger N. C. J., Monbaliu M. J., Norpe M. J. M., Konings F. J.//Eur. Patent Application. 1987. 0 227 173.
6. Ерохин Е. П., Тартаковский И. С., Радченко О. В., Лукин Ю. В., Авдеев Д. Н., Мисуренко Н. К., Зубов В. П., Прозоровский С. В.//Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. 1991. Т. 11. № 1. С. 41—43.
7. Quash G., Roch A. M., Niveleau A., Grange J., Keolouangkhhot T., Huppert J.//J. Immunol. Meth. 1978. V. 22. № 1. P. 165—174.
8. Чернякова А. М., Шихман А. Р., Шамакова З. Ф., Брико Н. И.//Лаб. дело. 1988. Т. 4. № 1. С. 18—22.
9. Gray G. R.//Arch. Biochem. and Biophys. 1974. V. 163. № 2. P. 426—428.
10. Dubois M., Giles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.//Anal. Chem. 1956. V. 28. № 2. P. 350—356.
11. Axen R., Porath J., Ernback S.//Nature. 1967. V. 214. № 1764. P. 1302—1304.
12. Tijssen P., Kurstak E.//Anal. Biochem. 1984. V. 136. № 2. P. 451—457.
13. Лукин Ю. В., Бахарев В. Н., Заиченко А. С., Воронов С. А., Зубов В. П., Грицкова И. А., Праведников А. Н.//Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 1. С. 159—161.
14. Kobayashi R., Tashima Y.//Anal. Biochem. 1989. V. 183. № 1. P. 9—12.

Поступила в редакцию
29.VII.1993

*I. S. Pavlova, Yu. V. Lukin, V. A. Kovalenko,
D. N. Avdeev, V. A. Kulshin, V. P. Zubov*

NON-INSTRUMENTAL IMMUNOASSAY BASED ON COLOURED POLYACROLEIN LATEX: APPLICATION TO GROUP-SPECIFIC POLYSACCHARIDE OF *Streptococcus pyogenes*

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Non-instrumental immunoassays based on immunofiltration and microtiter particle agglutination (MPA) techniques have been developed using coloured polyacrolein latex. These methods have been applied to the quantification of the group-specific polysaccharide (PS) of *S. pyogenes* (group A streptococcus) and compared with standard ELISA tests. The most efficient method was MPA; as little as 0.05 ng A—PS/ml could be detected in 1.5 h. In comparison with ELISA test, the sensitivity of MPA was 10 times higher and the procedure was much simpler. The sensitivity of immunofiltration assay using both enzyme and latex conjugates was shown to be the same (50 ng/ml A—PS) and the duration of the assay 3—5 min. No cross-reactions of latex conjugates with non A streptococcus cell lysates have been observed. The developed methods are rapid, robust, easy to perform, don't need any sophisticated equipment and specially trained staff.