



УДК 577.175.444.083.3

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГАПТЕН-ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ КОНЬЮГАТОВ В ИММУНОАНАЛИЗЕ ТИРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

© 1996 г. Н. П. Данилова*, М. В. Мертц, Д. Р. Локшин, Р. Г. Васильев

Институт биотехнологии, 117246, Москва, Научный проезд, 8

Поступила в редакцию 21.03.95 г.

Изучено влияние гаптенной гетерологии на характеристики методов определения тироксина и триодтиронина, основанных на непрямом твердофазном ИФА с использованием моноклональных антител. Применение в анализе тироксина гетерологичного конъюгата триодтиронин – бычий сывороточный альбумин позволило повысить чувствительность анализа в 2 раза и снизить перекрестные реакции с триодтиронином с 1 до 0.5% по сравнению с гомологичным вариантом анализа. В противоположность этому использование гетерологии в иммуноанализе триодтиронина оказалась неэффективным. Показано, что специфичность и чувствительность иммуноанализа гаптен может модулироваться с помощью изменения химической структуры конъюгата гаптен-метка, что наиболее очевидно при работе с моноклональными антителами.

Ключевые слова: тироксин, иммуноанализ, гетерология гаптенная.

Для измерения концентрации тиреоидных гормонов обычно применяют иммуноаналитические методы, эффективность которых в огромной степени зависит от свойств используемых антител [1, 2].

Хорошо известно, что антитела к низкомолекулярным веществам (гаптенам) получают с помощью иммунизации животных конъюгатами гаптен-белок. Хотя моноклональные антитела отбирают по их способности связывать гаптен, нельзя забывать о том, что антигенсвязывающий центр антител обычно намного превышает размеры гаптена, так что кроме самой молекулы гаптена на нем могут разместиться и мостиковая структура, соединяющая гаптен с белком, и даже прилегающие к связи участки белка.

По-видимому, это свойство антител к гаптенам может отразиться на их поведении в иммуноанализе, в особенности когда в качестве метки для антител или антигенов, служащей для детекции результатов анализа, используются не радиоактивные атомы, а такие массивные структуры, как флуоресцеин, фермент или белок, часто намного превышающие гаптен по молекулярной массе.

В последнее время появилось несколько работ, где была предпринята попытка проанализировать связь между химической структурой комплекса гаптен-метка и реактивностью антител при изучении взаимодействия антитело-антиген или использовании антител в иммуноанализе [3, 4].

Сокращения: Т4 – тироксин, Т3 – триодтиронин, BSA – бычий сывороточный альбумин, ANS – 8-анилино-1-нафталинсульфокислота, ЗФР – забуференный физиологический раствор.

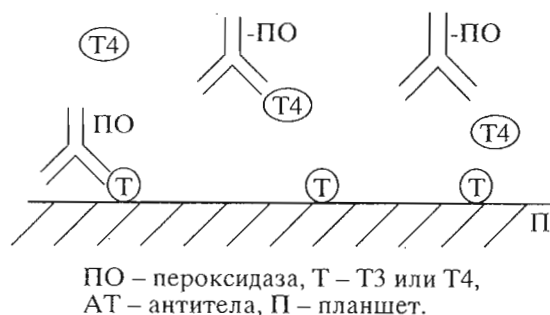
* Автор для переписки.

Было показано, что сочетания антитела с конъюгированным гаптенем, имеющим структуру, слегка отличающуюся от структуры иммуногена, может привести к ослаблению взаимодействия антитела с гаптенем и в результате чувствительность иммуноанализа гаптена может улучшиться. В работе [5] идентифицированы три типа структурной гаптенной гетерологии (по типу химической связи, месту связывания гаптена с белком и самому гаптену) и показано, что гетерология любого типа, использованная в иммуноанализе, может, сама по себе или в комбинации с гетерологией другого типа, привести к повышению чувствительности иммуноанализа гаптена. Этот принцип был использован при разработке нескольких схем иммуноанализов. Гаптенная гетерология позволила улучшить чувствительность люминесцентного иммуноанализа тироксина и триодтиронина [6] и метода определения свободного тироксина, базирующегося на биотин-стрептавидиновой системе [7]. Описано также повышение чувствительности определения теофиллина с гетерологичным конъюгатом кофеина [8]. Однако многие из этих исследователей указывают, что гаптенная гетерология по самому гаптену или по месту связывания гаптена с белком может приводить к снижению специфичности анализа.

В данной работе мы поставили своей целью дальнейшее изучение этих явлений на примере иммунометрического анализа тироксина и триодтиронина, основанном на принципе непрямого твердофазного ИФА в гомогенном и гетерогенном вариантах.

В используемой нами схеме иммуноанализа измерение основано на конкуренции гормона из

анализируемой пробы и гормона, иммобилизованного на твердой фазе в виде конъюгата с белком, за связывание с антителами, меченными пероксидазой:



В работе использовали моноклональные антитела 1В7 к тироксину [9]. При получении антител иммуногеном служил тироксин, конъюгированный с гемоцианином с помощью глутарового альдегида. Антитела были отобраны в ИФА, где в качестве антигена применяли конъюгат тироксина с BSA, в котором гаптен присоединяли к белку с помощью 1-этил-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Этот конъюгат гетерологичен иммуногену как по белку-носителю, так и по типу связи тироксина с белком, однако заслуживает внимания тот факт, что связывание гаптена с белком в обоих конъюгатах проходило по лизиновым остаткам белка. Антитела 1В7, отобранные нами, в этой системе обнаруживали аффинность с $K 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, перекрестные реакции с триодтиронином составляли 1%.

Моноклональные антитела Т9, специфичные к триодтирону, были получены в МГУ с использованием иммуногена Т3-гемоцианин, который содержал между молекулой триодтиронина и белком гемисукцинатный мостик и пептидную связь. Связывание проходило по лизиновым остаткам белка. Скрининг положительных клонов проводили иммуноанализом, основанным на поляризации флуоресценции. Трейсер был получен в результате взаимодействия триодтиронина с флуоресцеинизотиоцианатом [10]. Отобранные антитела Т9 имели аффинность с $K 1.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Никаких перекрестных реакций с тироксином в этом методе не было обнаружено.

В иммуноанализе использовали тот же конъюгат тироксина, который применяли при отборе антитироксиновых антител. Конъюгат Т3-BSA был получен тем же методом, т.е. отличался от Т4-BSA только по гаптenu.

При анализе кривых титрования антител 1В7 в твердофазном ИФА на иммобилизованных конъюгатах Т4-BSA и Т3-BSA обращает на себя внимание тот факт, что значение оптического поглощения, соответствующее выходу кривой титрования на плато (A^0), для кривой, соответствующей гетерологичному варианту анализа, только в 2 раза ниже, чем для кривой, которая соответствует го-

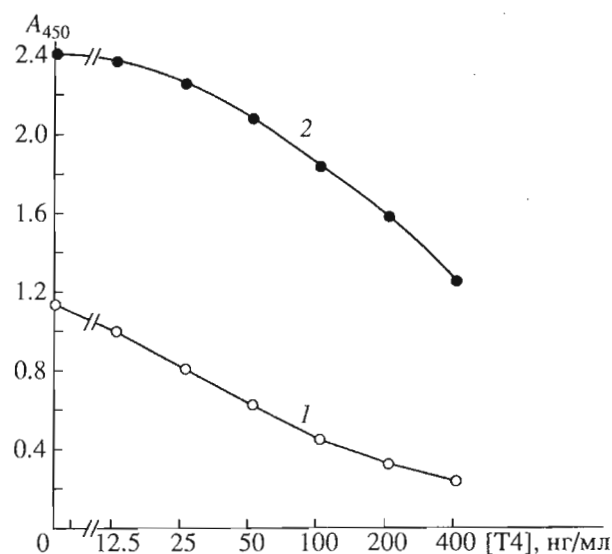


Рис. 1. Ингибирование тироксином связывания анти-тироксина антител 1В7 с конъюгатами Т3-BSA (1) и Т4-BSA (2).

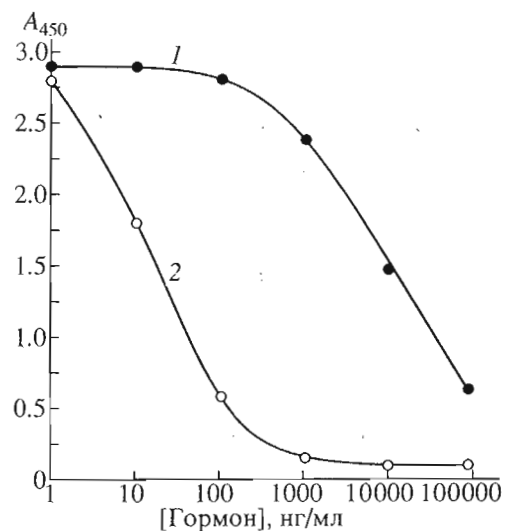


Рис. 2. Определение специфичности метода. Ингибирование триодтиронином (1) и тироксином (2) связывания антитироксиновых антител 1В7 с Т3-BSA.

мологичному варианту (рис. 1). Связывание с конъюгатом Т3-BSA, таким образом, значительно превышает связывание со свободным триодтиронином, которое ранее в реакции ингибирования составило 1%. Взаимодействие со свободными гаптенами изучали по их способности ингибировать связывание антител с иммобилизованными конъюгатами. Как видно из рис. 1, кривая, соответствующая гетерологичному варианту анализа, смещена к более низким концентрациям тироксина по сравнению с кривой, построенной по результатам гомологичного анализа, что свидетельствует о повышении чувствительности анализа.

Интересно, что специфичность анализа при этом даже возросла (рис. 2), перекрестные реакции

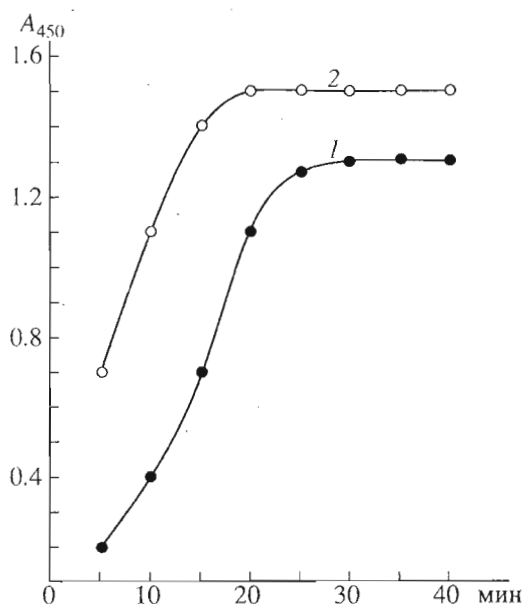


Рис. 3. Кинетика связывания антитироксиновых антител 1B7 с конъюгатами Т3-BSA (1) и Т4-BSA (2).

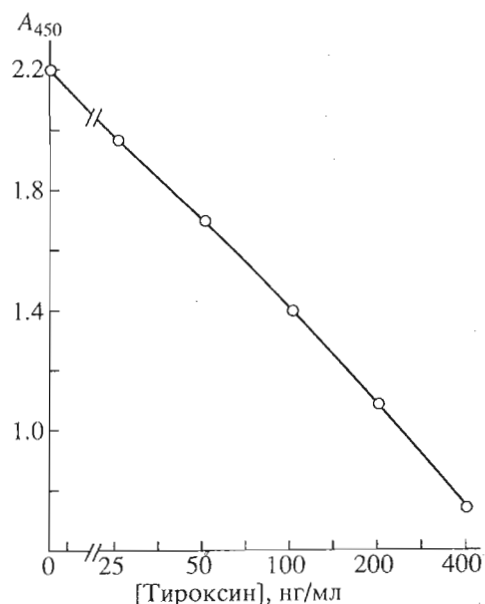


Рис. 4. Калибровочная кривая для определения тироксина в гетерологичном варианте анализа.

с триодтиронином в гомологичном методе составляли 1%, а в гетерологичном – 0.5% [11].

Кинетические параметры гомологичного и гетерологичного вариантов анализа оказались очень близки. Используя калибровочную пробу с нулевым содержанием тироксина, мы показали, что с конъюгатом Т4-BSA равновесие достигается через 25 мин инкубации, в то время как в гетерологичном варианте максимальное связывание достигалось к 35 мин инкубации (рис. 3).

Таким образом, использование гетерологии по гаптену позволило значительно улучшить характеристики анализа тироксина по сравнению с гомологичным вариантом как по чувствительности, так и по специфичности определения. Чувствительность анализа в гетерологичном варианте увеличилась в 2 раза, что позволило сократить объем пробы с 30 до 10 мкл; при этом минимально определяемая концентрация составляла 10 нг/мл.

Калибровочная кривая, полученная в гетерологичном анализе, линейна в логарифмических координатах в широком диапазоне концентраций: от 10 до 400 нг/мл (рис. 4). Объем исследуемой пробы при этом составил 10 мкл, длительность иммунологической реакции – 20 мин.

Далее мы попытались использовать принцип гетерологии по гаптену в иммуноанализе триодтиронина, но столкнулись с поведением антитриодтирониновых антител, совершенно отличным от поведения антител к тироксину.

Антитриодтирониновые антитела Т9 хорошо связывались с конъюгатом Т3-BSA (рис. 5) и ингибировались свободным триодтиронином. В отличие от результатов, полученных с этими анти-

телами в поляризационном иммуноанализе [10], свидетельствующих об отсутствии перекрестных реакций с тироксинам, в нашей системе перекрестные реакции составляли 3% (рис. 6), что может служить серьезной помехой при анализе триодтиронина. При инкубации же антител Т9 с иммобилизованным конъюгатом Т4-BSA оказалось, что эти антитела даже в очень высоких концентрациях не взаимодействуют с ним (рис. 5).

Сравнение результатов, полученных при использовании гетерологичных по гаптену конъюгатов в анализе обоих гормонов, наводит на мысль, что основной причиной столь различных результатов может быть тот факт, что моноклональные антитела к тироксину отбирались методом, очень близким к используемому в иммуноанализе. Возможно, поэтому общая конфигурация связывающего центра антител 1B7 благоприятствовала связыванию с конъюгатами как Т4-BSA, так и Т3-BSA. Белковая часть конъюгатов оказывала синергическое влияние на связывание.

В противоположность этому моноклональные антитела к триодтиронину были отобраны методом, основанным на взаимодействии с конъюгатом флуоресцеин-Т3, т.е. в системе [10], полностью отличающейся от той, которая была применена нами в анализе, где мы пытались использовать их способность связываться с конъюгатами Т3-BSA и Т4-BSA, сорбированными на твердую фазу. Хотя антитела и узнавали иммобилизованный триодтиронин, специфичность иммуноферментного анализа оказалась хуже, чем в методе, основанном на поляризации флуоресценции, в котором эти антитела отбирались. Применение гетерологии в данном случае не представляется возможным.

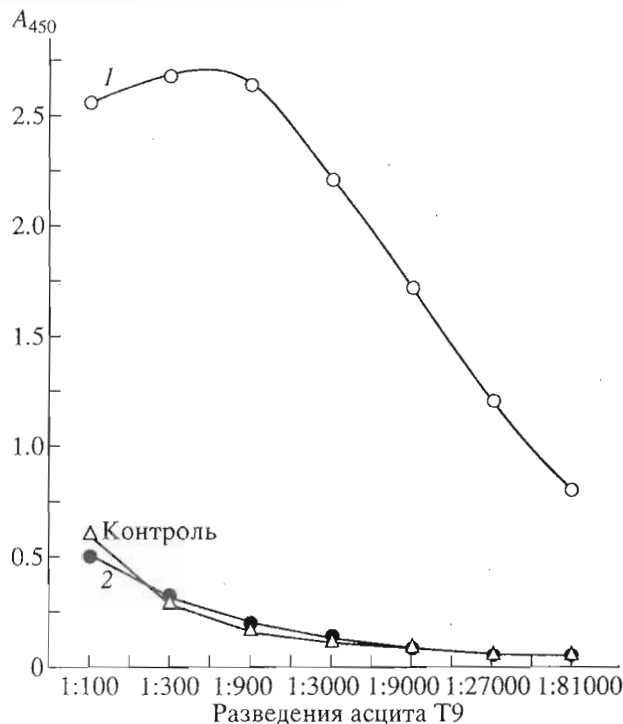


Рис. 5. Связывание антитриодтирониновых антител Т9 с иммобилизованными конъюгатами Т3-BSA (1) и Т4-BSA (2).

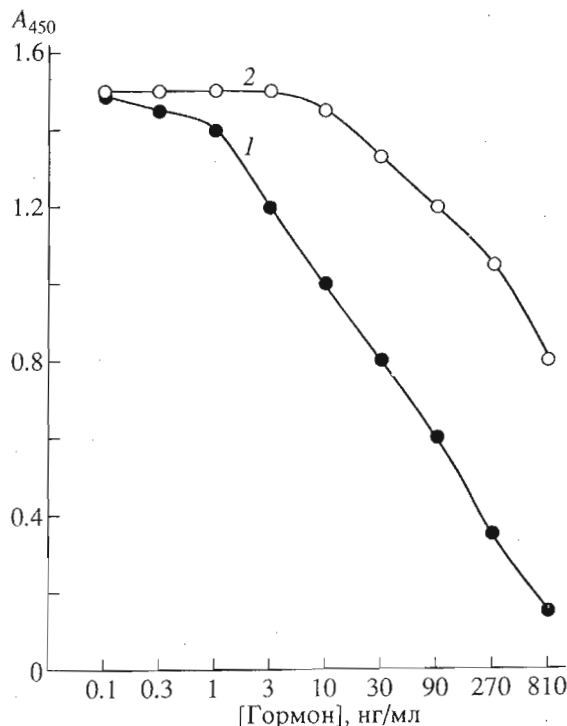


Рис. 6. Ингибирование триодтиронином (1) и тироксинном (2) связывания антитриодтирониновых антител Т9 с конъюгатом Т3-BSA.

Антитела Т9 оказались непригодны для иммунометрического анализа триодтиронина.

Таким образом, такие свойства моноклональных антител к гаптенам, как аффинность и специфичность, если они изучаются с использованием различных конъюгатов гаптен-метка, могут в значительной степени модулироваться, вплоть до того, что антитела, отобранные в одной системе, использующей определенные конъюгаты гаптен-метка и тип иммуноанализа, и обладающие в этой системе замечательными характеристиками, могут оказаться полностью непригодными для анализа в другой системе.

Чтобы легче предсказать иммунохимические свойства моноклональных антител к гаптенам, необходимо знать, какой иммунохимический метод был использован для их индукции и отбора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы тироксин, триодтиронин, гемоцианин из моллюска фиссуреллы, бычий сывороточный альбумин, моноклональные антитела 1В7 к тироксину, моноклональные антитела Т9 к триодтиронину, пероксидаза из хрена (Sigma, США), 8-анамино-1-нафталинсульфокислота (Sigma, США), 96-луночные полистироловые планшеты (Costar, Голландия), сефадекс G-25, азид натрия, твин-20.

Антитела. Получение гибридомы, продуцирующей моноклональные антитела 1В7 к тироксину, было описано нами ранее [9]. Гибридома Т9, продуцирующая моноклональные антитела к триодтиронину, была закуплена в МГУ.

Выделение антител. Гибридомные линии 1В7 и Т9 культивировали в виде асцитных опухолей в мышцах, асцитную жидкость отбирали и отделяли от клеток. К 1 мл асцита добавляли 1 мл насыщенного сульфата аммония и после 30 мин инкубации при 4°C смесь центрифугировали для отделения осадка. Осадок растворяли в 0.5 мл воды и диализовали против 0.01 М фосфатного буфера, рН 8.0. Затем раствор антител наносили на колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенной тем же буфером, и градиентно элюировали хлористым натрием (0 - 0.4 М). Антитела диализовали против забуференного физиологического раствора и хранили с добавлением 0.01% азида натрия при 4°C.

Конъюгат антител с пероксидазой. К раствору 1 мл пероксидазы из хрена в 0.1 мл воды добавляли раствор 1 мг периодата натрия в 25 мкл воды. Смесь инкубировали 1 ч в темноте при 20°C, пропускали через 1-см слой сефадекса G-25 и смешивали с раствором 3 мг антител в 0.1 М карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9.5. Через 3 ч добавляли 0.1 мг боргидрида натрия, инкубировали 20 мин и диализовали против ЗФР. Конъюгат хранили в ЗФР в концентрации 10 мг/мл с добавлением 0.01% азида натрия.

Получение конъюгатов гормонов с бычьим сывороточным альбумином и их сорбция на твердую фазу. Раствор 1 мг тироксина или трийодтиронина в смеси 0.5 мл DMSO и 0.5 мл воды смешивали с 1 мг BSA в 0.5 мл воды и добавляли к смеси при перемешивании 3 мг гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида. Реакционную смесь инкубировали 12 ч при 4°C и диализовали против ЗФР. Конъюгат Т4-BSA содержал 17 моль тироксина на 1 моль BSA (по данным спектрофотометрии), а конъюгат Т3-BSA – 15 моль Т3/моль BSA.

Для сорбции на полистироловые планшеты конъюгаты растворяли в 0.05 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9.5, в концентрации 0.5 мкг/мл, вносили по 100-мкл в лунки планшета для микротитрования и инкубировали 3 ч при 20°C. Планшеты промывали водой, инкубировали 1 ч с 0.1% раствором BSA в ЗФР, промывали водой и высушивали.

Стандартные растворы гормонов в сыворотке. Пул донорских сывороток объемом 100 мл инактивировали 30 мин при 56°C, центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин, затем пропускали через колонку (2 × 30 см) с активированным углем. Стандартные растворы в сыворотке готовили из раствора гормонов в DMSO с концентрацией 1 мг/мл.

Твердофазный иммунометрический анализ тироксина. В лунки планшета с сорбированным конъюгированным антигеном вносили по 10 мкл раствора тироксина или пробы сыворотки больного. Затем в лунки добавляли по 100 мкл антител к тироксину, меченных пероксидазой, в рабо-

чем разведении в растворе 0.03% ANS, 0.02 М веронал-мединалового буфера, pH 8.2, в ЗФР с 0.05% твин-20 и 0.2% BSA, инкубировали 20 мин при перемешивании при 20°C. Активность пероксидазы определяли с помощью тетраметилбензидина и субстратного буфера (субстратный набор реагентов фирмы H-Roche, Швейцария).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hay I.D., Bayer M.F., Kaplan M.M., Klee G.G., Larsen P.R., Spencer C.A. // Clin. Chem. 1991. V. 37. P. 2002 - 2008.
2. Thede-Reynolds K.R., Johnson G.F. // Clin. Chem. 1991. V. 37. P. 1044.
3. Danilova N.P. // J. Immunol. Meth. 1994. V. 173. P. 111 - 117.
4. Дзгоев А.Б., Еремин С.А., Карпов М.В., Данилова Н.П., Василев Р.Г., Егоров А.М. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 713 - 721.
5. Van Weemen B.K., Schuurs A.H. // Immunochemistry. 1975. V. 12. P. 667 - 670.
6. Piran U., Ruordan W.J., Silbert D.R. // J. Immunol. Meth. 1990. V. 133. P. 207 - 214.
7. Khosravi M.J., Papanastasiou-Diamandi A. // Clin. Chem. 1993. V. 39. P. 256 - 262.
8. Polito A., Chem. A. // US Patent 4855226, 1989.
9. Данилова Н.П., Крупина Н.В., Мерц М.В., Василев Р.Г. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 704 - 712.
10. Окунева Т.О. Получение и характеристика моноклональных антител к трийодтиронину и создание тест-системы на их основе. Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: МГУ, 1992.
11. Danilova N.P., Mertz M.V., Vasilov R.G. // Clin. Chem. 1994. V. 40. P. 1190.

Hapten-Heterologous Conjugates in Thyroid Hormone Immunoassay

N. P. Danilova,¹ M. V. Mertz, D. R. Lokshin, and R. G. Vasilov

Institute of Biotechnology, Nauchnyi proezd 8, Moscow, 117246 Russia

Abstract—The effect of hapten heterology on the characteristics of indirect ELISA methods for determination of thyroxine and triiodothyronine using monoclonal antibodies was studied. The use of the heterologous triiodothyronine-bovine serum albumin conjugate in immunoassays for thyroxine improved the sensitivity of these assays twofold and reduced the cross-reactivity with triiodothyronine from 1 to 0.5% as compared to the homologous variant. By contrast, the heterology in the immunoassays for triiodothyronine appeared inadequate. It was shown that the specificity and sensitivity of hapten immunoassays can be modulated by altering the chemical structure of the hapten-label conjugate, which is most evident in experiments with monoclonal antibodies.

Key words: thyroxine, triiodothyronine, immunoassay, hapten heterology.

¹ To whom correspondence should be addressed.