

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНЬЮГАТОВ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА И МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Шевяков А.Г.

научный руководитель канд. биол. наук Ветчинин С.С.

ФГБОУ ВПО Пушкинский государственный естественно-научный институт

Иммуноферментный анализ (ИФА) остается одним из самых распространенных видов диагностики не смотря на активное развитие и внедрение таких молекулярно-диагностических методов, как ПЦР, ПЦР в реальном времени, геномное секвенирование и проч. Это объясняется простотой метода, нетребовательностью к уровню подготовки лабораторного персонала и доступностью необходимого оборудования и реактивов. В то время как стоимость ПЦР-аппаратов довольно высока и для работы требуется высококвалифицированный персонал.

Однако, методики ИФА также не стоят на месте, испытываются и внедряются в практику различные модификации. К ним можно отнести использование магнитных частиц и коллоидного золота как аналитической поверхности и специфического маркера соответственно.

Магнитные частицы уже довольно давно используются в диагностике. Модифицированная поверхность частиц позволяет присоединять к ним специфические моноклональные антитела (МкАт), что в совокупности с их парамагнитными свойствами дает неоспоримое преимущество в сравнении с конвенциональной методикой. Суммарная поверхность магнитных частиц, модифицированных МкАт, может на порядки превышать рабочую поверхность лунки стандартного планшета для ИФА (около 2 см²). Увеличенная поверхность позволяет обнаруживать меньшие количества антигена, так как увеличивается вероятность встречи МкАт и антигена, и уменьшать время инкубации. За счет уменьшения времени инкубации появляется возможность обработать больший объем анализируемого раствора за одно и то же время, что так же увеличивает чувствительность.

Использование коллоидного золота в ИФА началось относительно недавно. Ключевыми преимуществами коллоидного золота (КЗ) являются развитая поверхность и простота модификации поверхности лигандами. Связывание белковых молекул КЗ до конца не изучено, самыми распространенными гипотезами является связывание через серосодержащие группировки аминокислот (цистеин) и за счет электростатического взаимодействия с положительно заряженным ядром золотой частицы. Для связывания определяют так называемое «золотое число», это количество белка, необходимое для стабилизации коллоида. Устойчивость полученного конъюгата проверяют в 0,1 М растворе хлорида натрия. Модификация поверхности КЗ поликлональными антителами (ПкАт) и пероксидазой хрена (ПХ), приводит к образованию конъюгата (КЗ-К*). Полученный конъюгат несет на себе больше молекул ПХ, чем конъюгат ПкАт с ПХ полученный традиционными методами. В результате это свойство обеспечивает увеличение чувствительности, за счет более интенсивного сигнала в расчете на одну молекулу Ag, а также сокращает время проведения анализа, совмещая две стадии инкубирования в одной.

В своей работе мы изучили возможность использования магнитных частиц и коллоидного золота в иммуноферментном анализе по определению белкового антигена *p60*, продуцируемого патогенной для человека бактерией *Listeria monocytogenes*. Для этого использовали магнитные частицы с иммобилизованным на поверхности белком G, с которым связывали МкАт к *p60*. Частицы коллоидного золота размером 20 нм модифицировали кроличьими ПкАт к *p60* и ПХ ($R_z=3,06$). В тесте на агглютинацию подобрана оптимальная концентрация иммуноглобулинов и ПХ, обеспечивающая устойчивость коллоида.

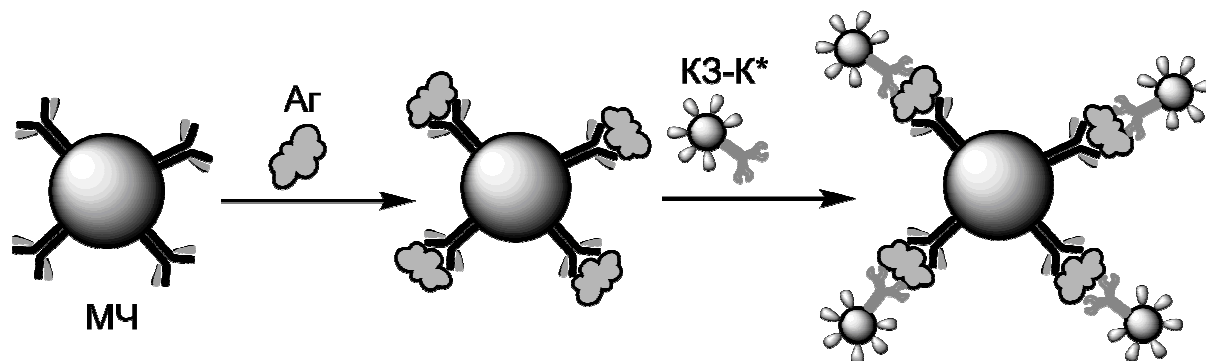


Рис. 1. Схема ИФА на магнитных частицах (МЧ) с конъюгатом коллоидного золота (КЗ-К*)

В результате исследования было установлено, что ИФА с использованием магнитных частиц и коллоидного золота занимает три часа, в то время как стандартная методика — 16 часов, включая сенсibilизацию планшета МкАт в течение 12 часов и процедуру ИФА в течение четырех часов. После оптимизации концентрации антител и размера частиц КЗ возможно дальнейшее сокращение времени. Кроме того, было показано увеличение чувствительности ИФА в пересчете на количество ПкАт более чем в два раза.

В настоящее время проводится работа по дальнейшему увеличению чувствительности ИФА за счет подбора оптимального размера частиц КЗ, концентрации ПкАт и пероксидазы хрена. Совершенствование этого методического подхода создает перспективу получения высокочувствительных диагностических систем на основе ИФА.