

УДК 577.112.85 + 616-097

О.Ю. Галкін, Н.П. Метальнікова, Ю.П. Горго

ОПТИМІЗАЦІЯ ТА ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ КОН'ЮГАТИВ БЛОК-БЛОК ТА БЛОК-ГАПТЕН ДЛЯ ВИСОКОЧУТЛИВИХ МЕТОДІВ ІМУНОАНАЛІЗУ

Відомо чимало методів кон'югації антитіл з ферментами, які дозволяють одержувати кон'югати з високою антигензв'язувальною та ферментативною активністю. Для отримання імуоферментних кон'югатів використовуються різноманітні функціональні групи молекул антитіл та ферментів: аміно-, сульфгідрильні та альдегідні групи. Покращення показників діагностичних наборів може реалізовуватися через вдосконалення імуоферментних кон'югатів та методів їх синтезу і очистки.

Інтенсифікація та оптимізація синтезу білкових кон'югатів можлива за рахунок підвищення впливу макрокінетичної складової реакції кон'югації. Апаратурно-інструментальною реалізацією даного принципу є заміна адсорбента, що використовується під час кон'югації, на інертний фільтрувальний матеріал, крізь який циркулює реакційна суміш. Було визначено оптимальні умови синтезу кон'югатів та доведено можливість синтезу останніх протягом значно меншого (10 хв) проміжку часу у порівнянні із традиційними методами. Температура значно менше впливає на швидкість реакції кон'югації у випадку оптимізованого методу, коли більший вплив на її хід мають макрокінетичні фактори. Показано, що кон'югати білків та антитіл із біотином, а також пероксидазні кон'югати, отримані за оптимізованою методикою є більш активними, що дозволяє використовувати їх для створення високочутливих методів імуноаналізу.

Ключові слова: кон'югати білків, антитіла, ферменти, біотин, макрокінетичні фактори, імуноаналіз

Постановка проблеми. Більшість сучасних імуоферментних тест-систем побудована за трьома схемами імуоферментного аналізу [1]. Найчастіше використовують непрямий та «сендвіч» варіанти, а також конкурентний імуоферментний аналіз (ІФА). Незалежно від принципу, який покладено в основу діагностичного набору, до його складу обов'язково входить кон'югат – мічені ферментом антигени або антитіла. Очевидно, що при створенні імуоферментних тест-систем важливим етапом є одержання імуоферментного кон'югату.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Якість імуоферментних тест-систем залежать, головним чином, від двох їх компонентів – імуосорбенту та імуоферментного кон'югату. Тому один з шляхів покращення показників діагностичних наборів – вдосконалення імуоферментних кон'югатів. Серед іншого на якість кон'югату безпосередньо впливає метод його одержання. Реагенти, що використовуються для кон'югації, мають щонайменше впливати на активність антитіл та ферменту. Важливим також є контроль наявності незв'язаних молекул імуоглобулінів у синтезованому кон'югаті, адже незв'язаний фермент у складі кон'югату може спричиняти небажане підвищення фонових сигналів [2-3]. Важливим є й співвідношення між ферментом та антитілами у кон'югаті. У різних тест-системах використовують кон'югати із різним молярними співвідношенням антитіло (антиген) : фермент (ліганд) [1, 4]. Для створення високочутливих методів імуноаналізу, коли постає задача виявлення малих або надмалих (наприклад, менше 1×10^{-9} г білка) концентрацій речовини, що детектується, зростає актуальність контрольованого отримання кон'югатів із якомога більшою молярною часткою ферменту (ліганду).

Мета статті. Розробка методологічного підходу для швидкого отримання імуоферментних кон'югатів із високою молярною концентрацією ферменту (ліганду) для підвищення чутливості імуоферментного аналізу.

Методика

Біотинування білків. Традиційний метод. Біотинування бичачого сироваткового альбуміну (БСА) проводили за J. Goding [5] із власними модифікаціями. До 2,7 мл розчину БСА у концентрації 1 мг/мл (розчинений у 0,1 М карбонат-бікарбонатному буфері, рН 8,6), додавали 0,3 мл диметилсульфоксид з 0,3 мг N-гідроксисукцинімідного ефіру біотинамідогексанової кислоти (Sigma, США). Після чотирьох годин інкубації в темноті при кімнатній температурі. Для зупинки реакції додавали 1 М розчин хлориду амонію (20 мкл на 1 мг білка) і діалізували проти фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБ), що містить 0,1% азиду натрію, з метою видалення ефіру біотину, що не зв'язався; зберігали при 4 °С. Біотинілювання моноклональних антитіл (МКАТ) проводили за такою самою схемою, за винятком того, що молярне співвідношення антитіло : біотинілюючий агент складало 1:20.

Оптимізований метод. До 2,7 мл розчину БСА у концентрації 1 мг/мл (розчинений у 0,1 М карбонат-бікарбонатному буфері, КБК, рН 8,6), додавали 0,3 мл диметилсульфоксид з 0,3 мг N-гідроксисукцинімідного ефіру амінокапроїдбіотину (якщо окремо не зазначено іншу кількість). Розчин прокачували у полімерних трубках у замкненій системі за допомогою перистальтичного насоса (швидкість 5 мл/хв.) пропускаючи через нейлоновий фільтр-насадку із порами 0,45 мкм упродовж 10 хв. Для зупинки реакції додавали 1 М розчин хлориду амонію (20 мкл на 1 мг білка) і діалізували проти ФСБ, що містить 0,1% азиду натрію, з метою видалення ефіру біотину, що не зв'язався; зберігали при 4 °С. Біотинілювання антитіл проводили із урахуванням молярного співвідношення, що описано вище.

Синтез пероксидазних кон'югатів. У даній роботі використовували методологічний підхід, що базується на періодатному окисненні пероксидази хрому (ПХ).

Традиційний метод. Кон'югування МКАТ до IgE людини з ПХ проводили у ваговому співвідношенні антитіл до ферменту 2:1 методом періодатного окиснення за P. Tijssen [6] з модифікаціями. Пероксидазу хрому (Sigma, США) розчиняли в 0,1 М КББ (рН 8,3) до концентрації 15 мг/мл та додавали рівний об'єм водного розчину періодату натрію з концентрацією 14 мМ. Для окиснення ПХ суміш інкубували 2 год при кімнатній температурі. Отриманий розчин окисленої ПХ змішували з розчином антитіл, попередньо віддіалізованих проти 0,1 М КББ (рН 9,2). Суміш переносили в хроматографічну колонку й додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25, інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Розчин кон'югату елюювали з колонки і додавали 1/20 об'ємної частини водного розчину NaBH₄ (5 мг/мл). Для зупинки реакції суміш залишали на 30 хв при кімнатній температурі, додавали ще 3/20 частини розчину NaBH₄, інкубували 60 хв. Отриманий розчин пероксидазного кон'югату МКАТ діалізом переводили в 0,02 М ФСБ, що містить 0,15 М NaCl. Для синтезу кон'югату біотин-ПХ використовували аналогічну схему із ваговим співвідношенням біотин : ПХ рівним 1:1.

Оптимізований метод. Активацію ПХ періодатом натрію проводили так само як і у попередньому випадку. Отриманий розчин окисленої ПХ змішували з розчином антитіл, попередньо віддіалізованих проти 0,1 М КББ (рН 9,2). Суміш циклічно пропускали крізь фільтр 0,45 мкм упродовж 10 хв. при кімнатній температурі. Розчин кон'югату елюювали з колонки і додавали 1/20 об'ємної частини водного розчину NaBH₄ (5 мг/мл). Для зупинки реакції суміш охолоджували до 4 °С, додавали ще 3/20 частини розчину NaBH₄, інкубували 60 хв. при кімнатній температурі. Отриманий розчин пероксидазного кон'югату МКАТ діалізом переводили в 0,02 М ФСБ, що містить 0,15 М NaCl. Для отримання кон'югату біотин-ПХ використовували таку саме схему, проте вагоме співвідношення біотин : ПХ становило 1:1.

Оцінка кількості вільних аміногруп. Кількість вільних аміногруп в білкових кон'югатах була оцінена за допомогою 2, 4, 6-тринітробензолсульфонової кислоти (ТНБСК) (Sigma-Aldrich, США) з використанням БСА як контролю [7]. До 1 мл розчину білка додавали 4 % NaHCO_3 (контроль) та 0,1 % ТНБСК (дослід), перемішували та інкубували протягом 2 год при 40°C. До контрольного та досліджуваного зразків додавали 1 мл 10 % додецилсульфату натрію та 0,5 мл 1 N HCl. Поглинання розчину фіксували при 335 нм. Кількість аміногруп розраховували по різниці ОГ розчину БСА і його кон'югату (молекула БСА має 60 аміногруп).

Процедура непрямого ІФА. Сорбцію IgE проводили у 0,05 М КББ (рН 9,6) протягом ночі при 4 °С в концентрації від 1 до 500 МО на лунку. Для відмивання використовували фосфатно-сольовий буфер з додаванням 0,05% твін-20 (ФСБТ), рН 7,2-7,4. До планшету вносили робоче розведення (1:80000) кон'югату анти-IgE МКАТ із біотином, інкубували 1 год при 37 °С і потім відмивали. Для виявлення зв'язаних антитіл використовували синтезований нами кон'югат авідину з ПХ, який інкубували 1 год при кімнатній температурі. Планшет тричі відмивали ФСБТ і один раз деіонізованою водою. Як субстрат використовували 0,003 % розчин перекису водню в 0,15 М цитратному буфері, рН 5,0, а як хромоген – 3,3',5,5'-тетраметилбензидину. Реакцію зупиняли 2 М сірчаною кислотою. Після зупинення реакції вимірювали оптичну густину (ОГ) при довжині хвилі 450/620 нм. У альтернативному варіанті непрямого ІФА для виявлення зв'язаних антитіл використовували кон'югат козячих антитіл до імуноглобулінів миші з ПХ (Sigma, США).

Процедура «сендвіч»-варіанту ІФА. МКАТ специфічні до IgE людини сорбували в 0,02 М КББ в концентрації 2 мкг/мл на 96-лункові полістеролові планшети для ІФА. Планшет інкубували протягом 12 год при 4 °С, потім тричі відмивали ФСБТ та витримували у розчині БСА (10 мг/мл в ФСБ) 1 год при 37 °С. Після чотирьохкратної відмивки ФСБТ лунки планшету заповнювали 100 мкл реакційного буферу (0,05 М трис-HCl буфер, рН 8,0, 0,15 М NaCl, 5 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,2 % Tween-20), що містить різні розведення пероксидазного кон'югату МКАТ до IgE людини. Далі у лунки вносили по 20 мкл контрольного стандартизованого зразку IgE із концентрацією 50 IU/mL (WHO, 2nd IRP, 75/502). Планшети інкубувалися 2 год при 37 °С та відмивалися 4 рази. Подальшу процедуру проводили як і для непрямого ІФА.

Результати та їх обговорення

Теоретичне обґрунтування можливості інтенсифікації та оптимізації процесу синтезу імуноферментного кон'югату. Передумовами для розробки методологічного підходу для швидкого отримання імуноферментних кон'югатів із високою молярною концентрацією ферменту (ліганду) були наступні теоретичні уявлення та експериментальні данні.

Перш за все зупинимось на кінетичних особливостях синтезу імуноферментних кон'югатів. Стадія взаємодії антитіла (антигену) та ферменту (ліганду) зазвичай проходить у розчині із використанням певного інертного адсорбенту, який, фактично, виконує роль неспецифічного каталізатора [8]. Як відомо фактори, що впливають на швидкість реакцій, діляться на дві групи: суто кінетичні (мікрокінетичні), що визначають швидкість взаємодії на молекулярному рівні, і макрокінетичні, що визначають вплив на швидкість взаємодії умов транспорту реагентів до зони реакцій (наявність перемішування, геометричних розмірів реактора тощо) [9]. Наведемо декілька залежностей концентрації синтезованої речовини (у нашому випадку – кон'югату) від макрокінетичних параметрів. Нехай рівняння хімічної кінетики відповідає реакції першого порядку

$$dC/dt = -k_{ef}C, \quad (1)$$

де C – концентрація реагенту, k_{ef} – ефективна константа швидкості. Назовні частинки адсорбенту концентрація вихідної речовини рівна C_0 , а по мірі проникнення у пору вона зменшується за рахунок реакції. За стаціонарних умов рівняння залежності концентрації реагенту C від розміру пори x поєднує рівняння дифузії та рівняння хімічної кінетики та має вигляд [19]

$$C = C_0 \exp[-(k_{ef}/D)^{0.5} x], \quad (2)$$

де D – коефіцієнт дифузії.

Інша модель – гетерогенна реакція, що протікає на гладкій поверхні, та лімітується транспортом реагуючої речовини до цієї поверхні [9]. Швидкість реакції W на поверхні визначається концентрацією реагенту у поверхні C_n та для реакції першого порядку описується рівнянням

$$W = k_{ef} C_n = [k\beta/(k + \beta)] C_n, \quad (3)$$

де k – константа швидкості (кінетична складова), β – коефіцієнт масопереносу (дифузна складова).

Навіть такі елементарні математичні закономірності макрокінетики хімічної реакції доводять суттєвий вплив процесів масопереносу для інтенсифікації хімічної реакції. Очевидно, що підвищення швидкості синтезу імуноферментного кон'югату можливе за рахунок збільшення дифузної складової (наприклад, шляхом перемішування реакційної суміші).

Важливим є й той аспект, що при збільшенні впливу макрокінетичних факторів на хід реакції кон'югації передбачається за можливе збільшувати співвідношення фермент (ліганд) : антитіла (антиген) без використання надлишкової кількості першого. Під час процедури кон'югації, яка для різних методик триває 3-5 годин, може спостерігатися втрата активності синтезованих кон'югатів (за рахунок інактивації частини ферментів та/або антитіл), що може бути обумовлено як хімічними (наприклад, залишки реактиву, що використовується для активації одного чи обох реагентів), так і фізико-хімічними факторами (температура, іонна сила та рН розчину тощо) [1, 4, 10]. Таким чином, зменшення загального часу кон'югації є вигідним не тільки з організаційної точки зору, але й з точки зору збереження біологічної активності біомолекул, що входять до складу синтезованого кон'югату. Вище наведений аналіз спонукав нас до підвищення масообмінних процесів під час реакції кон'югації. Апаратурно-інструментальним рішенням у даному випадку стала заміна адсорбента на інертний фільтрувальний матеріал, крізь який циркулює реакційна суміш.

Відпрацювання умов оптимізованої методики при отриманні кон'югатів БСА-біотин. На першому етапі роботи проводили порівняльні дослідження кон'югації білка та низькомолекулярного гаптену. Як білок використовували БСА, а як гаптен – біотин. Останній, як відомо, має високу спорідненість до авідину (стрептавідину) та широко використовується у високочутливих методах імуноаналізу, оскільки із його використанням з'являється можливість ампліфікувати сигнал. З метою відпрацювання базових умов модифікованої методики слід було встановити оптимальний час інкубації, співвідношення білок : біотин, а також встановити ступінь впливу температури на хід синтезу кон'югату. Результати експериментів оцінювали за двома критеріями: рівнем сигналу у ІФА та зміною кількості вільних аміногруп. Останній показник давав змогу оцінити кількість приєднаних молекул біотину в отриманих кон'югатах, оскільки молекула біотину приєднується до білкової молекули саме через аміногрупу останньої.

Оптимальний час кон'югації визначали при масовому співвідношенні БСА : біотин-вмісний реагент (БР) рівному 9:1 (2,7 мг БСА та 0,3 мг N-гідроксисукцинімідного ефіру амінокапроїдбіотину). Результати даного експерименту представлені на рис. 1. Оптична густина у ІФА для кон'югатів, синтез яких тривав

більше 10 хв збільшувалася незначним чином: від 1,905 оптичних одиниць для тривалості синтезу 10 хв, до 2,050 оптичних одиниць для тривалості 20 хв. Очікувано зворотна закономірність спостерігалася по відношенню до кількості вільних аміногруп на молекулі БСА: з часом їх кількість зменшувалася (значення 51, 36, 35 та 29 відповідають 5, 10, 15 та 20 хв інкубації реагентів. Зазначимо, що зменшення кількості вільних аміногруп, починаючи з 10 хв реакції відбувається дещо більш інтенсивно у порівнянні із збільшенням оптичної густини у ІФА для синтезованих кон'югатів. Таку обставину можна пояснити тим, що подальше збільшення кількості біотинових залишків не призводить до суттєвого збільшення сигналу у ІФА через обмеження самого аналізу (у т.ч. через стеричні обмеження), що у свою чергу, свідчить про недоцільність більшого «насичення» кон'югату молекулами біотину, ніж те, що спостерігається після 10 хв інкубації реакційної суміші. Подальші дослідження проводили виходячи із оптимального часу реакції 10 хв.

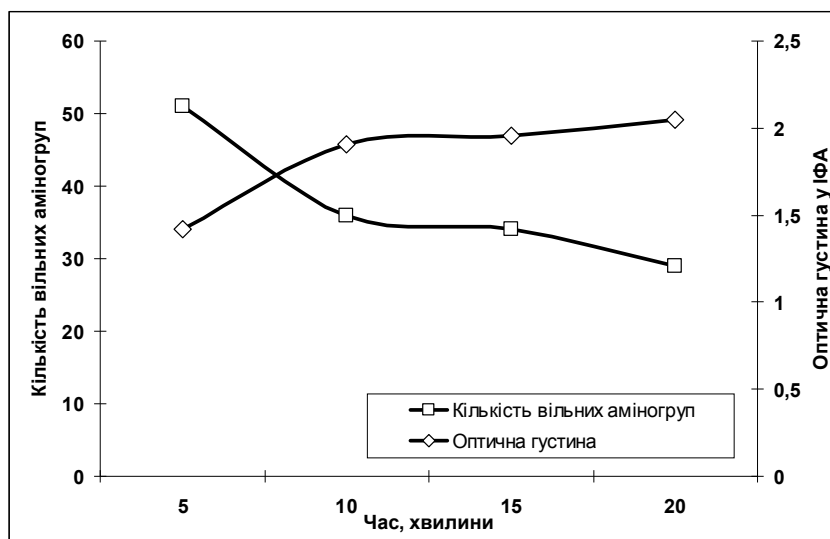


Рис. 1. Визначення оптимального часу реакції кон'югації БСА та біотину: представлені середні значення кількості вільних аміногруп у кон'югаті та ОГ у ІФА за результатами тестування у 4-х повторах, $P < 0,05$

На наступному етапі роботи проводили визначення впливу співвідношення білок : біотинвмісний реагент на такі показники синтезованого кон'югату як інтенсивність у ІФА та кількість молекул біотину у кон'югаті. У експерименті використовували такі концентрації БСА та БР, що відповідають їх молярному співвідношенню 1:5,5, 1:11, 1:16,5 та 1:22. Результати відповідних експериментів (табл. 1) показали, що для кожного молярного співвідношення БСА : БР інтенсивність сигналу кон'югату, отриманого оптимізованим методом, є у 1,68-2,20 рази більшою у порівнянні із аналогічними показниками у випадку традиційного методу. При цьому кількість молекул біотину у синтезованих кон'югатах для однакових співвідношень БСА : БР для оптимізованого методу становила у 1,2-1,38 рази більше.

Нами було також досліджено вплив температури на хід синтезу кон'югату за різними методиками (табл. 2). Було встановлено, що при зниженні температури від 25 °C до 4 °C спостерігається зниження сигналу у ІФА для кон'югатів, що отримані за різними методиками: у випадку традиційного методу ОГ у ІФА зменшується у 4,74 рази, а для оптимізованого методу лише у 1,94 рази. Аналогічні результати було отримано й при розрахунку кількості молекул біотину у отриманих кон'югатах. Таким чином, температура по різному впливає на хід реакції синтезу кон'югату для різних методик. За умов оптимізованого методу, коли значно більшу роль відіграють

макрокінетичні фактори швидкості реакції, зниження температури не так критично впливає на якість отримуваних кон'югатів.

Таблиця 1

Вплив співвідношення білок : біотинвімісний реагент на характеристики кон'югату

Масове співвідношення білок : БР	Мольне співвідношення білок : БР	Сигнал у ІФА, оптичні одиниці		Кількість молекул біотину у кон'югаті	
		Традиційний метод	Оптимізований метод	Традиційний метод	Оптимізований метод
27:1 (0,1 мг БР)	1:5,5	0,554±0,022	1,202±0,011	8±1,0	11±1,0
13,5:1 (0,2 мг БР)	1:11	0,802±0,028	1,554±0,014	15±1,5	18±1,5
9:1 (0,3 мг БР)	1:16,5	0,984±0,021	1,905±0,021	20±1,5	24±1,0
6,75:1 (0,4 мг БР)	1:22	1,255±0,020	2,111±0,028	26±1,5	32±1,0

Примітка: представлені середні значення кількості вільних аміногруп у кон'югаті та ОГ у ІФА за результатами тестування у 4-х повторях, $P < 0,05$.

Таблиця 2

Вплив температури синтезу кон'югатів на їх характеристики

Температура	Сигнал у ІФА, оптичні одиниці		Кількість молекул біотину у кон'югаті	
	Традиційний метод	Оптимізований метод	Традиційний метод	Оптимізований метод
4 °С	0,321±0,018	1,521±0,029	4±0,5	12±1,0
25 °С	0,984±0,021	1,905±0,021	20±1,5	24±1,0

Примітка: представлені середні значення кількості вільних аміногруп у кон'югаті та ОГ у ІФА за результатами тестування у 4-х повторях, $P < 0,05$.

Отримання кон'югатів біотин-антитіло. Для оцінки прийнятності розробленої оптимізованої методики для біотинілювання антитіл проводили синтез кон'югату біотину та моноклональних антитіл до IgE людини, клон 165C12 (ізотип IgG1, константа афінності $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) [11]. На попередніх етапах дослідження було встановлено оптимальне молярне співвідношення МКАТ : біотинілюючий агент, яке складало 1:20. Оцінку отримуваних кон'югатів проводили у непрямому ІФА та додатково порівнювали із результатами непрямого ІФА із використанням пероксидазного кон'югату козячих антитіл до імуноглобулінів миші (рис. 2). Всі три графіки мають принципово схожий вид, проте слід звернути увагу на дві особливості: кон'югат, отриманий за оптимізованим методом характеризується у 1,2-1,4 рази більш інтенсивним сигналом, а також забезпечує рівень сигналу статистично вище фоновому вже для концентрації 1 МО/лунку (на відміну від інших).

Отримання пероксидазних кон'югатів антитіл. Розроблена оптимізована методика синтезу кон'югату була використана й для отримання пероксидазного кон'югату моноклональних антитіл до IgE людини, клон 165C12. Оцінку отриманих за альтернативними методиками кон'югатів проводили у «сендвіч» варіанті ІФА із використанням стандартного зразку IgE людини із концентрацією 50 МО/мл. Результати дослідження представлені на рис. 3 та свідчать про більш високу питому активність кон'югату, що отриманий за оптимізованим методом.

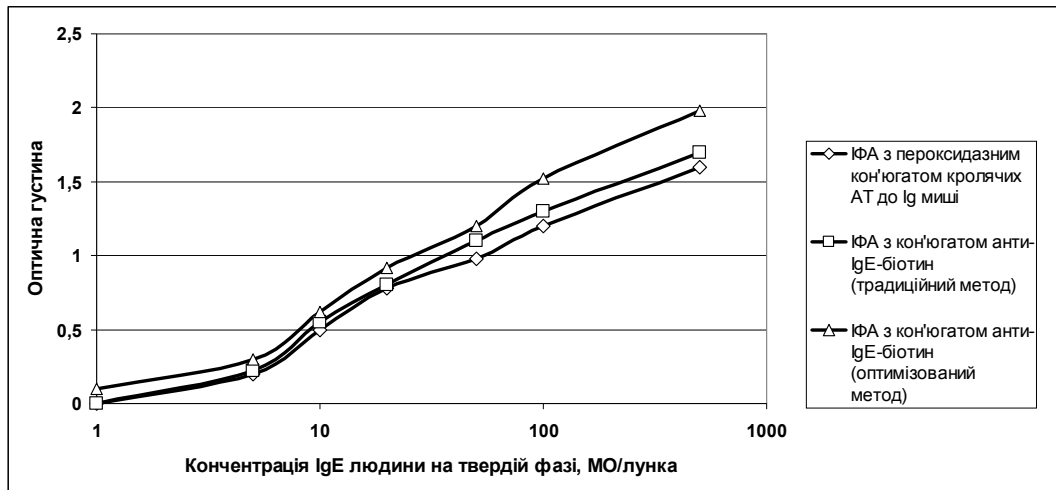


Рис. 2. Порівняльна оцінка кон'югатів біотин-антитіло у непрямому ІФА: представлені середні значення ОГ у ІФА за результатами тестування у 4-х повторях, $P < 0,05$

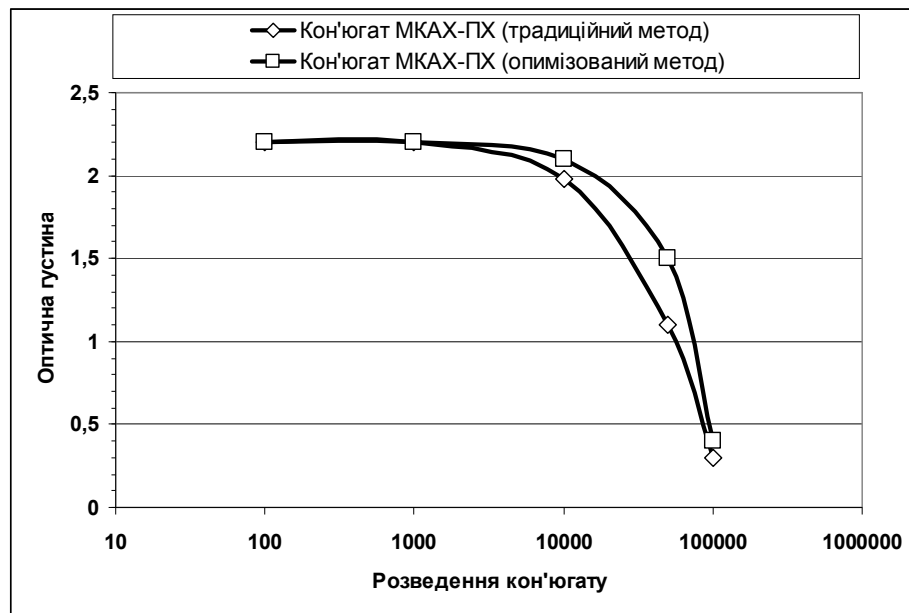


Рис. 3. Порівняльна характеристика пероксидазних кон'югатів антитіл: представлені середні значення ОГ у ІФА за результатами тестування у 4-х повторях, $P < 0,05$

Висновки

Теоретично обґрунтовано можливість інтенсифікації та оптимізації синтезу білкових кон'югатів за рахунок підвищення впливу макрокінетичної складової реакції кон'югації. Експериментально визначено оптимальні умови синтезу кон'югатів та доведено можливість синтезу останніх протягом значно меншого (10 хв) проміжку часу у порівнянні із традиційними методами. Доведено, що температура значно менше впливає на швидкість реакції кон'югації у випадку оптимізованого методу, коли більший вплив на її хід мають макрокінетичні фактори. Показано, що кон'югати білків та антитіл із біотином, а також пероксидазні кон'югати, отримані за оптимізованою методикою є більш активними, що дозволяє використовувати їх для створення високочутливих методів імуноаналізу. Отримані результати дозволяють вдосконалювати розробку та виробництво імуноферментних наборів, призначених для детекції та визначення маркерів інфекційних захворювань, екопатогенів тощо.

Література

1. Galkin O.Yu. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2010. – Т.5, №4 – С. 54-60.
2. Saegerman C., De Waele L., Gilson D. et al. Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis // Veterinary Microbiology. – 2004. – Vol. 100, 1-2. – P. 91-105.
3. Lombardi Vincent C., Schooley David A. A method for selective conjugation of an analyte to enzymes without unwanted enzyme-enzyme cross-linking // Analytical Biochemistry. – 2004. – Vol. 331, 1. – P.40-45.
4. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. – San Diego: Academic Press, 2000. – 760 p.
5. Goding J. Monoclonal antibodies. Principles and practice. – San Diego: Academic press, 1996. – 492 p.
6. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays // Lab. Techniques in Biochem. and Molecular Biology. – 1985. – 15. – 674 p.
7. Habeeb A.F.S.A. Determination of free amino groups in protein by trinitrobenzene sulfonic acid // Anal. Biochem. – 1966. – Vol. 14. – P. 328-336
8. Яблонский Г.С., Быков В.И., Горбань А.Н. Кинетические модели каталитических реакций. – Новосибирск: Наука, 1983. – 254 с.
9. Берлин А.А. Макрокинетика // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №3. – С. 48-54.
10. Николаенко И.В., Галкин А.Ю., Раевская Г.Е. и др. Получение моноклональных антител к Fc-фрагменту IgG человека и применение иммуоферментных конъюгатов на их основе // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – №11. – С. 8-11.
11. Галкін О.Ю., Савченко А.А., Нікітіна К.І. та ін. Одержання та дослідження властивостей нових моноклональних антитіл до IgE людини // Український біохімічний журнал. – Т. 85, № 5. – 2013. – С.81-85.

Аннотація. Галкин А.Ю., Метальникова Н.П., Горго Ю.П. Оптимизация и интенсификация синтеза конъюгатов белок-белок и белок-гаптен для высокочувствительных методов иммуноанализа. Известно множество методов конъюгации антител с ферментами, которые позволяют получать конъюгаты с высокой антигенсвязывающей и ферментативной активностью. Для получения иммуоферментных конъюгатов используются разнообразные функциональные группы молекул антител и ферментов: amino-, сульфгидрильные и альдегидные группы. Улучшение показателей диагностических наборов может реализовываться путем совершенствования иммуоферментных конъюгатов и метода их синтеза и очистки.

Интенсификация и оптимизация синтеза белковых конъюгатов возможна за счет повышения влияния макрокинетической составляющей реакции конъюгации. Аппаратурно-инструментальной реализацией данного принципа служит замена адсорбента, используемого при конъюгации, на инертный фильтрующий материал, сквозь который циркулирует реакционная смесь. Были определены оптимальные условия синтеза конъюгатов и доказана возможность синтеза последних в течение значительно меньшего (10 мин) промежутка времени по сравнению с традиционными методами. Температура значительно меньше влияет на скорость реакции конъюгации в случае оптимизированного метода, когда большее влияние на ее ход имеют макрокинетические факторы. Показано, что конъюгаты белков и антител с биотином, а также пероксидазного конъюгаты, полученные по оптимизированной методике, являются более активными, что позволяет использовать их для создания высокочувствительных методов иммуноанализа.

Ключевые слова: конъюгаты белков, антитела, ферменты, биотин, макрокинетические факторы, иммуноанализ

Summary. Galkin O.Yu., Metalnikova N.P., Gorgo Yu.P. Optimization and intensification of synthesis protein-protein and protein-hapten conjugates for highly sensitive immunoassays. It is known a lot of methods of conjugation of antibodies with enzymes that can produce conjugates with high antigen-binding and enzymatic activity. A variety of functional groups of enzyme and antibody molecules is used for immunoenzymatic conjugates synthesis (for example, amino, sulfhydryl, and aldehyde groups). Enhancement of diagnostic kits can be realized by improving of immunoenzymatic conjugates, and methods for its synthesis and purification.

Intensification and optimization of the protein conjugates synthesis is possible by increasing the influence of macrokinetic component of the conjugation reaction. Hardware and tool implementation of this principle is the replacement of the adsorbent which is used in conjugation with an inert filter material and circulation the reaction mixture through filter material. The optimal conditions for the synthesis of the conjugates have been determinate. It has been proved the possibility of the protein conjugates synthesis for a significantly smaller (10 min) period of time compared to traditional methods. Temperature is significantly less effect on the reaction rate of conjugation in the case of the optimized method, when macrokinetic factors influence on its course more intensively. It has been shown that proteins and antibody conjugates with biotin and peroxidase conjugates prepared by an optimized method are more active, and they can be used to develop highly sensitive immunoassays.

Keywords: *protein conjugates, antibodies, enzymes, biotin, macrokinetic factors immunoassay.*

**Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут»**

Одержано редакцією 26.06.2014
Прийнято до публікації 07.12.2014