

## ОДНОВРЕМЕННЫЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ДВУХ МИШЕНЕЙ В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТКИ ЧЕЛОВЕКА

Кудрявцев А. Н.

Научный руководитель: д-р биол. наук Франк Л.А.

*Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук*

Возможность проведения одновременного иммуноанализа нескольких анализов позволяет существенным образом сократить время проведения анализа, а также снизить его стоимость. Этот подход становится особенно ценным в случаях, когда для диагностик требуется информация о количестве одновременно двух или более соединений, например: двух гормонов, свободной и белок-связанной формы антигена или одновременное обнаружение мишени и внутреннего стандарта к ней.

Задачей нашего исследования было создание биолюминесцентного иммуноанализа для одновременного определения двух мишеней в одном биологическом образце. В качестве меток для анализа мы использовали два мутантных варианта  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого фотопротейна обелина с измененными спектрами биолюминесценции и различными кинетическими характеристиками биолюминесцентной реакции: Y138F («зеленый мутант»,  $\lambda_{\text{max}}=493$  нм, с замедленной кинетикой спада биолюминесцентного сигнала) и H22E;W92F («фиолетовый мутант»,  $\lambda_{\text{max}}=388$  нм, с быстрой кинетикой). Разделение сигналов от репортеров производили с помощью соответствующих широкополосных фотофильтров и во времени (рис.1). Ранее было показано, что обелин является весьма перспективным репортером: он обеспечивает чувствительность анализа, сравнимую с изотопным, стабилен и нетоксичен; реакция отличается простотой (для запуска биолюминесцентного сигнала требуется только внесение в раствор ионов кальция) и высокой скоростью; наблюдается практически неограниченный линейный диапазон зависимости величины биолюминесцентного сигнала от концентрации белка.

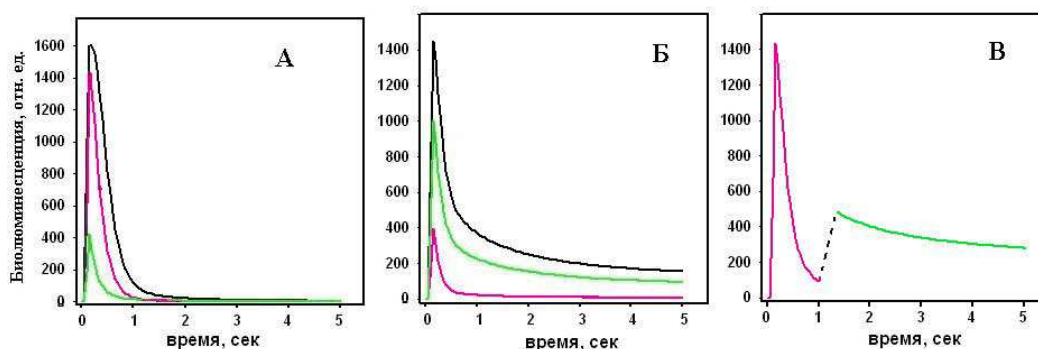


Рис. 1 А – сигнал фиолетового репортера (черная линия – без фильтра, фиолетовая – через фотофильтр № I (ФС6), зеленая – через фотофильтр № II (ЖС16)); Б – сигнал зеленого репортера (черная линия – без фильтра, фиолетовая – через фотофильтр № I, зеленая – через фотофильтр № II.); В – сигнал от смеси меток с последовательной регистрацией через фотофильтры: 0-1 сек через фотофильтр № I, 1-1,5 сек – время смены фотофильтров, 1,5-5 сек через фотофильтр № II.

Предложенный способ был разработан и применён для одновременного определения двух гонадотропных гормонов – фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) (схема анализа представлена на рис 2 слева), а также двух форм пролактина – тотального и IgG-связанного (макропролактина). Иммуноанализ перечисленных мишеней осуществляли в высокопроизводительно микропланшетном формате.

Для количественного определения гонадотропных гормонов клинических сыворотках нами были построены калибровочные кривые с использованием стандартных

сывороток (специально приготовленные растворы, содержащие смесь данных гормонов известной концентрации, ООО ДИАС, Красноярск). Пользуясь этими кривыми определили содержание ЛГ и ФСГ более чем в сотне клинических сывороток. Полученные значения хорошо коррелировали с результатами традиционного радиоиммуноанализа (RIA) со значениями  $R^2=0.94$  для фолликулостимулирующего  $R^2=0.91$  для лютеинизирующего гормонов (рис 2, справа).

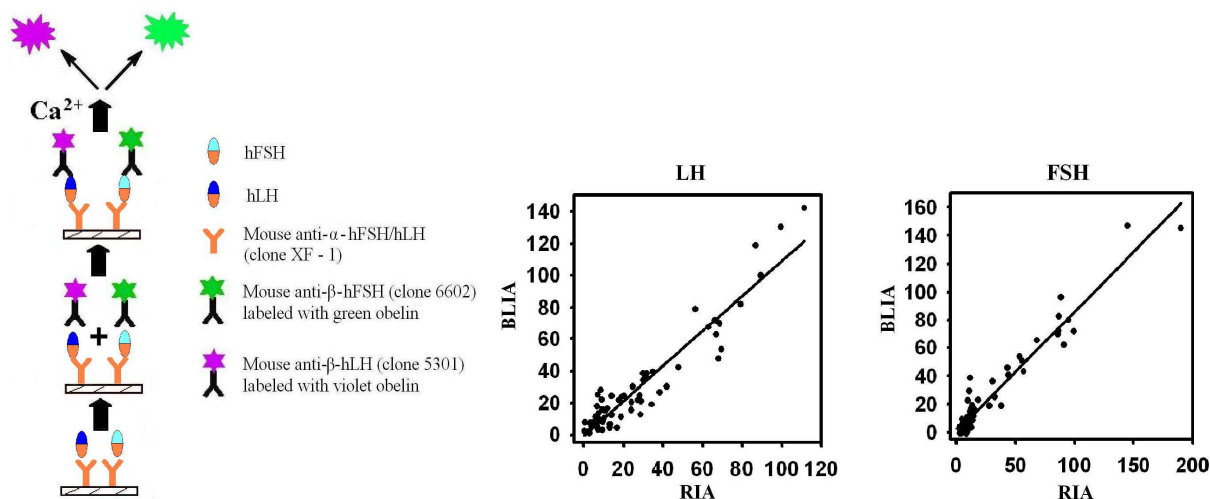


Рис. 2. Слева: схема биолюминесцентного анализа двух гонадотропных гормонов. Справа: корреляция результатов анализа лютеинизирующего (LH) и фолликулостимулирующего (FSH) гормонов биолюминесцентным иммуноанализом (BLIA) и радио иммуноанализом (RIA) (N=107).

Известно, что в крови человека пролактин циркулирует как в свободном, так и в иммуноглобулин-связанном состоянии. При этом биологической активностью обладает только свободная форма. Большинство существующих на сегодняшний день лабораторных тест-систем способны определять лишь общее количество пролактина, и напрямую не выявляют его свободную и макроформу. Между тем определение содержания макропролактина (биологически не активного) необходимо для правильной

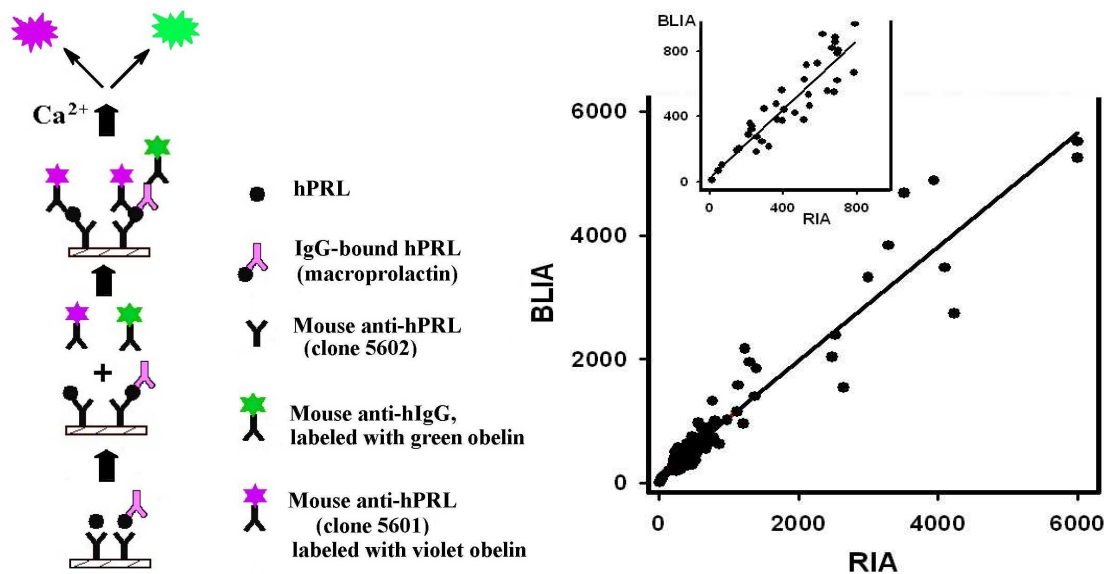


Рис. 3. Слева: схема биолюминесцентного анализа двух форм пролактина. Справа: корреляция результатов анализа тотального пролактина биолюминесцентным иммуноанализом (BLIA) и радио иммуноанализом (RIA) (N=115). На врезке- результаты анализа в сыворотках с низким значение тотального пролактина.

диагностики и лечения больных с гиперпролактинемией. На основе предложенного нами способа одновременного выявления двух мишеней с использованием двух биолюминесцентных репортеров мы разработали метод определения тотального и IgG-связанного пролактина (схема анализа представлена на рис. 3, слева).

Антитела, аффинные к пролактину конъюгировали с фиолетовым биолюминесцентным репортёром и сигнал полученной метки отражал количество тотального пролактина. Антитела, аффинные к Fc-фрагменту иммуноглобулина человека (IgG) конъюгировали с зелёным биолюминесцентным репортёром и сигнал полученной метки отражал количество макропролактина. Для количественного определения тотального пролактина использовали калибровочную кривую, построенную с использованием стандартных сывороток (ООО ДИАС, Красноярск). Для выявления макропролактина зелёной меткой построили калибровочную кривую с использованием стандартных растворов IgG человека, которую использовали в качестве калибровочной кривой для определения иммуноглобулина, связанного с пролактином – т.е. макропролактина. Результаты анализа макропролактина определенные предложенным способом хорошо коррелировали с таковыми, полученными традиционным методом RIA (более 90% совпадений, N= 115). «Золотым стандартом» в определении форм пролактина в сыворотке является гельфильтрация – метод, пригодный для использования в научной практике, но ввиду своей трудоемкости и длительности, неприемлемый для клинической лаборатории. Для сравнения несколько сывороток пациентов с повышенным значением тотального пролактина были исследованы с помощью гельфильтрации и разработанным нами способом. Результаты трёх различных методов определения макропролактина представлены в таблице 1. Наблюдается хорошая корреляция полученных значений, что означает перспективность предложенного биолюминесцентного подхода, как высокочувствительного и экспрессного по сравнению с традиционными методами.

Таблица 1 – Содержание тотального и макропролактина в сыворотках пациента определенного различными методами.

№	РИА		БЛИА		Гельфильтрация
	Тотальный пролактин (мЕд/л)	Макропролактин %	Тотальный пролактин (мЕд/л)	Макропролактин %	Макропролактин %
1	4375	67	4450	72	86
2	1047	82.7	1084	96	92.6
3	3650	86.3	3323	79	88
4	4500	27	4300	0	0
5	4157	42	3756	32	-
6	210	89	316	53	-
7	199	83	169	95	-
8	582	81	494	66	-
9	259	84	276	98	-
10	2722	25	2348	3	-

На основе наших разработок были созданы и успешно прошли испытания в условиях клинической лаборатории прототипы наборов реагентов для одновременного биолюминесцентного иммуноанализа двух мишеней в сыворотке человека: «Биолюм-Прл, мПрл» и «Биолюм- ЛГ, ФСГ ».