

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1989

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1989

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ 35

БЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

12. Kaufmann R. H. et al. // Amer. J. Med. — 1978. — Vol. 65. — P. 607—613.
13. Laurell G.-B. // Analyt. Biochem. — 1966. — Vol. 15. — P. 45—52.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. L., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
15. Napoli V. M. // Amer. J. clin. Path. — 1985. — Vol. 84, N 2. — P. 173—179.
16. Qdegard O. R., Lie M., Abildgaard V. // Thrombos. Res. — 1975. — Vol. 6. — P. 287—294.
17. Schipper H. G. et al. // Ibid. — 1981. — Vol. 21, N 1—2. — P. 73—80.
18. Tanaka M., Kato K. // Ibid. — Vol. 22, N 1—2. — P. 67—74.
19. Wilson M. B., Nakana P. K. // Immuno-fluorescence and Related Staining Techniques / Eds. W. Knapp et al. — Amsterdam, 1978. — P. 215—225.

Поступила 23.10.88

IMMUNOENZYMATIC ASSAY FOR ESTIMATION OF ANTITHROMBIN III

O. A. Markova, V. V. Kalashnikov, V. B. Khvatov

N. V. Sklifosovsky Institute of Urgent Medicine, Moscow

Immunoenzymatic assay is developed for estimation of antithrombin III (AT-III). Sensitivity of the assay was 7.8 ng of AT-III per 1 ml. The test system developed corresponded to the requirements for serological assays. Estimation of AT-III in blood plasma of healthy persons and in patients with various diseases showed that the assay may be recommended for clinical practice.

УДК 612.124:577.112.825].083.33

Е. И. Зарайский, С. В. Назимова, Г. А. Олефиренко, Э. М. Пчелкина,
Д. Д. Петрунин, Ю. С. Татаринов, Б. Б. Фукс

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЦЕНТА-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АЛЬФА₁-МИКРОГЛОБУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДОНОРОВ

НИИ морфологии человека АМН СССР, Москва, II ММИ им. Н. И. Пирогова

Плацента-специфический альфа₁-микроглобулин (ПАМГ-1) был впервые идентифицирован как органоспецифический белок плаценты человека, секретируемый в амниотическую жидкость [1]. ПАМГ-1 был выделен в чистом виде, дана характеристика его физико-химических свойств [2]. Впоследствии он обнаружен в фолликулярной жидкости и желтом теле [7], семенных пузырьках и семенной плазме [8], ткани эндометрия [5] и менструальной жидкости [6]. Иммунохимически сходный плацентарный белок позднее был описан под названием «плацентарный протеин-12» (ПП-12) [3].

В связи с низким содержанием ПАМГ-1 в сыворотке крови для его определения и количественного анализа требуются высокочувствительные методы. Для этих целей был разработан радиоиммунологический метод определения ПП-12 [9]. Однако для применения этого метода в широкой клинической практике требуются специальные радиоиммунологические наборы и соответствующим образом оборудованные лаборатории.

Целью настоящей работы явилась разработка высокочувствительного ме-

тода иммуноферментного анализа для количественного определения ПАМГ-1 в сыворотке крови здоровых мужчин и женщин (доноров).

Методика

Образцы сывороток крови, полученные от здоровых мужчин и женщин, были заморожены и хранились при —20 °С в полиэтиленовых пробирках. ПАМГ-1 выделяли из амниотической жидкости во II триместре беременности по описанному ранее методу [2]. Для получения антисыворотки очищенными препаратами ПАМГ-1 иммунизировали кроликов (1 мг/кг внутримышечно с полным адъювантом Фрейнда трижды с недельным интервалом). Через 4 нед проводили реиммунизацию без адъюванта, после которой на 7, 9 и 11-е сутки брали кровь из краевой вены уха. Полученную антисыворотку истощали сухой плазмой крови доноров.

Выделение антител. Очищенный ПАМГ-1 сорбировали на колонке с цианбромированной сефарозой (тип 6МВ; «Pharmacia», Швеция), подготовленной по инструкции, прилагаемой к сефарозе. Препарат ПАМГ-1 из расчета 10 мг на 1 г сухой сефарозы диализовали против 0,1 М NaHCO₃, содержащего 0,5 М NaCl, смешивали с гелем сефарозы и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч на магнитной мешалке. Несвязавшийся белок отмывали избытком 0,1 М NaHCO₃. Затем гель трижды промывали поочередно 0,1 М ацетатным буфером, содержащим 0,5 М NaCl (рН 4,0), и 0,1 М боратным буфером, содержащим 0,5 М NaCl (рН 8,0). Колонку урав-

повышали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7,4.

Кроличью антисыворотку смешивали с полученным антигенным сорбентом и инкубировали при комнатной температуре 1 ч при постоянном перемешивании. Отмывку сорбента от несвязавшихся компонентов сыворотки, проверку полноты отмывки и все дальнейшие процедуры проводили под контролем «Uvicord» (LKB, Швеция).

Антитела элюировали глицин-солянокислым буфером (pH 2,4). Снятые с колонки антитела немедленно нейтрализовали 1 М NaHCO_3 до pH 7,2, диализовали против дистиллированной воды при 4 °C в течение ночи и лиофилизировали. Аффинность и нативность антител проверяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Полученные антитела против ПАМГ-1 конъюгировали с пероксидазой хрена по методу [4].

Твердофазный иммуноферментный анализ. Поливинилхлоридные 96-луночные планшеты («Costar», США) сенсibilизировали раствором ПАМГ-1 в карбонат-бикарбонатном буфере (0,05 М, pH 9,6) по 100 мкл в лунку. Инкубировали (при 37 °C) 1 ч, трижды промывали водопроводной водой (инкубацию и отмывание повторяли после нанесения каждого последующего слоя). Затем последовательно наносили 1 % раствор желатина, антитела в серийных разведениях, раствор бараньих антител против иммуноглобулинов кролика, меченных пероксидазой хрена, на разводящем буфере (РБ) следующего состава: 0,1 % раствор желатина, 0,05 % раствор тинна-20 на ФСБ. После заключительной отмывки планшеты инкубировали с 0,04 % *o*-фенилендиамина на 0,05 М цитратном буфере (pH 4,7) с добавлением 0,03 % перекиси водорода. После 20-минутной инкубации реакцию останавливали 50 % серной кислотой. Результаты учитывали на «Multiscan Titertek» («Flow», Англия).

Непрямой ингибиционный иммуноферментный метод. Раствор ПАМГ-1 (10 нг/мл) в карбонат-бикарбонатном буфере (0,05 М, pH 9,5) вносили в 96-луночные поливинилхлоридные планшеты («Costar») по 100 мкл в лунку и инкубировали при 37 °C в течение 2 ч, после чего планшеты отмывали водопроводной водой. Процедуру отмывки повторяли после каждой последующей инкубации. Неспецифическую сорбцию на поливинилхлориде устраняли 1 % раствором желатина на ФСБ (pH 7,4) при 37 °C в течение 1 ч.

Затем в лунки вносили по 100 мкл раствора антигена или тестируемой сыворотки в серийных разведениях и антитела против ПАМГ-1 в разведении 1:3000 в РБ. Смесь инкубировали при 37 °C в течение 2 ч и в лунку вносили по 100 мкл конъюгата бараньих антител против иммуноглобулинов кролика в разведении 1:1000 на РБ. После инкубации при 37 °C в течение 1 ч в планшеты вносили 0,4 % раствор *o*-фенилендиамина («Sigma», США) в цитрат-фосфатном буфере (0,05 М, pH 4,7) с добавлением 0,1 % перекиси водорода. Через 20 мин реакцию останавливали 50 % серной кислотой (по 50 мкл на лунку). Учет результатов осуществляли на «Multiscan Titertek».

Иммуноферментный сандвич-метод. Антитела против ПАМГ-1 в концентрации 15 мкг/мл вносили в лунки, инкубировали и отмывали так же, как в непрямом ингибиционном методе. Затем в планшеты вносили по 100 мкл ан-

тигена или тестируемой сыворотки в серийных разведениях, инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и затем добавляли 100 мкл конъюгата кроличьих антител против ПАМГ-1 с пероксидазой хрена в разведении 1:2000, инкубировали при 37 °C в течение 1 ч, окрашивали и результаты реакции учитывали, как описано выше.

Результаты и обсуждение

С 1 г антигенного сорбента получали 10 мг антител за одну элюцию. Результаты иммуноферментного анализа приведены на рис. 1. В лунки было внесено 100 нг/мл ПАМГ-1. Учитывая вид кривой и отсутствие связывания антител с другими белками плаценты (трофобластический β_1 -глобулин, α_2 -микроглобулин фертильности и др.), можно заключить, что антитела аффинны и нативны.

Предел чувствительности разработанного иммуноферментного определения ПАМГ-1 составил в непрямом ингибиционном методе 1 нг/мл (рис. 2), а в сандвич-методе — 0,2 нг/мл (рис. 3), что на порядок выше, чем в радиоиммунологическом методе. Это имеет большое значение для определения ПАМГ-1 в концентрациях менее 20 нг/мл, так как, по нашим данным, исследуемую сыворотку необходимо разводить не менее чем в 20 раз.

Было протестировано 24 образца сывороток крови доноров-мужчин и 31

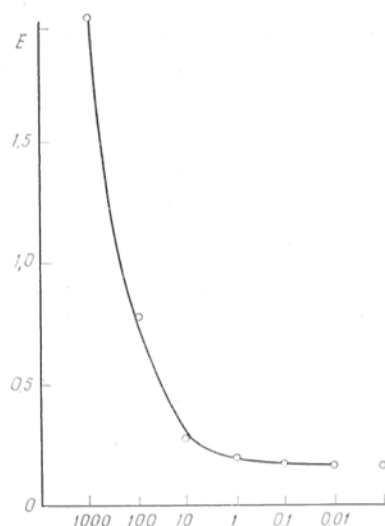


Рис. 1. Связывание ПАМГ-1 серийными разведениями антител против него.

По оси абсцисс — концентрация антител против ПАМГ-1 (в мкг/л); по оси ординат — связывание (в ед. экстинкции).

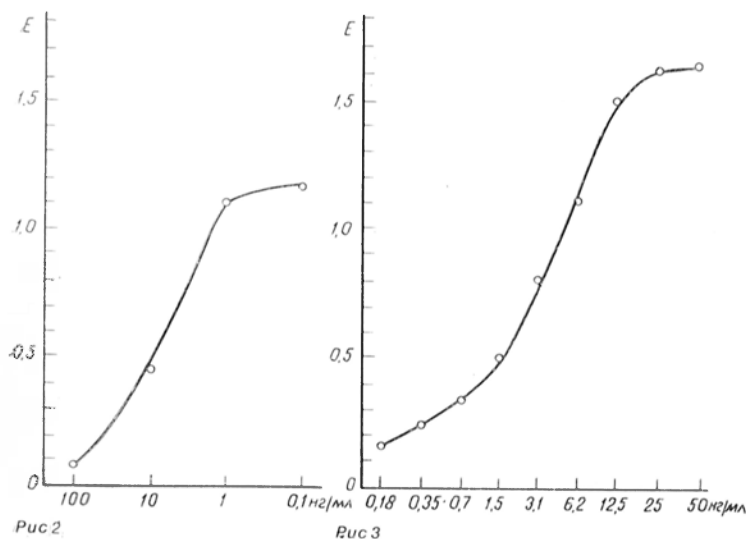


Рис. 2. Связывание антител против ПЛАМГ-1 серийными разведениями антигена в непрямом ингибиционном методе.

Рис. 3. Связывание серийных разведений ПЛАМГ-1 антителами против него в иммуноферментном сэндвич-методе.

Здесь и на рис. 3: по оси абсцисс — концентрация ПЛАМГ-1 (в мкг/л), по оси ординат — связывание (в ед. экстинкции).

образец сывороток крови доноров-женщин, каждую сыворотку исследовали трижды. Содержание белка практически у всех доноров-мужчин находилось в пределах 7—30 нг/мл ($21,2 \pm 1,2$ нг/мл) и только в 1 из 24 случаев концентрация ПЛАМГ-1 незначительно превысила этот уровень (33,5 нг/мл). У здоровых небеременных женщин индивидуальные различия в концентрации ПЛАМГ-1 в сыворотке крови выражены в большей степени. Чуть больше половины обследованных женщин (17 из 31) имели содержание ПЛАМГ-1, как и у мужчин, до 30 нг/мл. У 14 женщин содержание белка было выше 30 нг/мл (от 30 до 41,5 нг/мл). Учитывая то обстоятельство, что ПЛАМГ-1 обнаружен в эндометрии и децидуальной оболочке [5], где его концентрация зависит от фазы менструального цикла, можно предположить, что значительные колебания уровня этого белка в сыворотке крови женщин также связаны с менструальным циклом и отражают изменения, происходящие в эндометрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петрунин Д. Д., Грязнова И. М., Петрунина Ю. А. и др. // Акуш. и гин. — 1977. — № 1. — С. 64—65.
2. Петрунин Д. Д., Козляева Г. А., Татарин

- нов Ю. С., Шевченко О. Г. // Бюл. экпер. биол. — 1980. — № 5. — С. 558—560.
3. Bohn H., Kraus W. // Arch. Gynak. — 1980. — Bd 299. — S. 279—286.
4. Nakane P. K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. — 1974. — Vol. 228. — P. 1084—1091.
5. Rutanen E.-M. et al. // Brit. J. Obstet. Gynec. — 1984. — Vol. 91. — P. 377—381.
6. Rutanen E.-M. et al. // Ibid. — P. 1025—1030.
7. Seppala M., Wahlstrom T. et al. // J. clin. Endocr. — 1984. — Vol. 58. — P. 505—510.
8. Seppala M., Koakimies A. Y. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1985. — Vol. 442. — P. 212—226.
9. Szabo D., Than F., Bognar L. // IRCS Med. Sci. — 1981. — Vol. 9. — P. 626.

Поступила 24.06.88

IMMUNOENZYME ASSAY OF PLACENTA SPECIFIC α_1 -MICROGLOBULIN IN DONOR BLOOD SERUM

E. I. Zaraysky, S. V. Nazimova, G. A. Olefirenko, Z. M. Pchelkina, D. D. Petrunin, Yu. S. Tatarinov, B. B. Fux

Institute of Human Morphology, Academy of Medical Sciences of the USSR, II Medical School, Moscow

An immunoenzyme assay is developed for quantitative estimation of placenta specific α_1 -microglobulin in biological fluids. The assay is more sensitive as compared with immunodiffusion and radioimmunoassays used previously. Concentration of α_1 -microglobulin in blood serum of men-donors was found to be 7-30 ng/ml and of women — 0-50 ng/ml.