

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕНА *CANDIDA ALBICANS* С ПОМОЩЬЮ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО СЕНСОРА.

М.П. КУТЫРЕВА, Э.П. МЕДЯНЦЕВА, Е.В. ХАЛДЕЕВА, Н.И. ГЛУШКО*,
Г. К. БУДНИКОВ

Казанский Государственный университет, химический факультет,
кафедра аналитической химии

*Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, лаборатория по разработке
грибковых аллергенов.

420008 РТ, г. Казань, ул. Кремлевская 18 КГУ, Эл.почта: Elvina.Medyantseva@ksu.ru

Цель настоящей работы - разработка нового варианта иммуноферментного анализа с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора, включающего в биочувствительную часть фермент-холинэстеразу и антитела против *Candida albicans* в иммобилизованном виде, для диагностики заболеваний, вызванных *Candida albicans* (CA) грибами.

Разработанный способ определения основан на сочетании иммунохимических реакций с вольтамперометрической индикацией аналитического сигнала. В качестве детектирующего устройства использовали разработанный амперометрический иммуноферментный сенсор. Для определения использовали антитела против антигена СА в различных разведениях, иммобилизованные совместно с холинэстеразой. Разработанный способ иммобилизации позволяет получить биочувствительную часть сенсора, то есть пленку из нитроцеллюлозы с включенными в нее антителами и холинэстеразой, прочно удерживаемыми матрицей. В основе метода лежит сочетание реакции образования иммунного комплекса антитело-антиген с использованием иммуноферментного сенсора для его индикации. Динамический диапазон определяемых концентраций антигена зависит от степени разведения антител, используемых для получения биочувствительной части сенсора. Определены константы Скэтчарда, значения которых позволяют судить о прочности образующегося иммунного комплекса.

Данный способ определения не требует специальной подготовки образца, отличается селективностью, чувствительностью, простотой и экспрессностью, что дает возможность создать тест-систему для определения СА в крови.

Ключевые слова: антитело, антиген, холинэстераза, иммуноферментный анализ, иммуноферментный сенсор.

ВВЕДЕНИЕ. Одним из основных вопросов иммунохимии является изучение взаимодействия антител (Ат) с антигенами (Аг). Большинство иммунохимических тестов, в том числе и иммуноферментных, базируется на спектрофотометрических методах [1] или на методах, основанных на введении радиоактивной или флуоресцентной метки в один из компонентов биоспецифического взаимодействия. Различные варианты ИФА достаточно часто используются для диагностики заболеваний человека, животных и растений [2]. Однако эти методы зачастую довольно трудоемки, требуют специальных приемов исполнения и квалифицированного персонала [1-3]. Весьма перспективен метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием иммуноферментных биосенсоров [4,5].

Объект наших исследований - *Candida albicans* (CA), один из наиболее распространенных и обладающие наибольшей паразитарной активностью патогенные грибы семейства *Candida*. СА, содержится в организме как здоровых, так и больных

носителей, а так же на фруктах и молочнокислых продуктах. У человека поражение СА приводит к заболеванию кандидозом, вызывающим аллергические проявления, поражению кожных покровов, слизистых оболочек и пищеварительного тракта [6]. Установлено, что 70% индивидуумов являются носителями СА [7]. Однако диагностика инфекции СА встречает ряд затруднений, особенно при общем понижении иммунитета организма. Например, отсутствие положительного сигнала при анализе крови, или в изоляции СА в крови периферии, не всегда подтверждающей диагноз [8]. Предложены два пути определения поражения организма СА. Один из них - определение Ат против СА. Для этой цели использовали следующие методы: агглютинацию и преципитацию Ат, ряд серологических тестов [7], метод двойной иммунодиффузии и количественного иммунофлуоресцентного анализа [8]. Как альтернатива стандартным серологическим методам диагностики заражения грибковой инфекцией были предложены химические и иммунологические методы определения грибковых клеточных метаболитов Аг СА. Например, определение Аг СА в сыворотке человека методом газо-жидкостной хроматографии [9], энзимный иммуносорбентный анализ [10] и метод перекрестного энзимного иммуноэлектрофореза [11].

Многообразие тестов для определения инфекции СА показывает, что проблемы диагностики существуют, а используемые в настоящее время способы не всегда удовлетворяют практическим задачам. В связи с этим разработка новых методов определения Аг СА является актуальной задачей. Данное исследование посвящено дальнейшему совершенствованию приемов, используемых для диагностики заболеваний, вызываемых СА. В частности, в настоящее время все чаще обращаются к иммуноферментному анализу, осуществляемому с помощью различных биосенсоров, иммуносенсоров, иммуноферментных сенсоров [12-14]. Перспективность таких вариантов ИФА показана на примере алеутской болезни норки [15], вируса крапчатости гвоздики [5]. Такие сенсоры сочетают преимущества высокочувствительной электрохимической детекции аналитического сигнала со специфичностью действия как ферментов, так и иммунологической реакции.

Цель настоящей работы - разработка нового варианта иммуноферментного анализа с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора, включающего в биочувствительную часть холинэстеразу (ХЭ) и Ат против СА в иммобилизованном виде, для диагностики заболеваний, вызванных СА.

МЕТОДИКА. Экспериментальная работа выполнена на осциллополюрографе ПО-5122, модель 03 с ячейкой, термостатированной при $25,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ с помощью термостата ТС-50. Рабочим электродом служил иммуноферментный электрод, состоящий из стационарного ртутно-плёночного электрода с серебряной подложкой, иммобилизованной ХЭ (ИХЭ) и иммобилизованных Ат (ИАт). Электрод сравнения - насыщенный каломельный электрод. Растворенный кислород удаляли из исследуемого раствора током электролитически генерированного водорода, во время регистрации осцилловольтамперограммы газ пропускали над раствором. Применяли препарат бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (К.Ф 3.1.1.8), изготовленный Пермским НИИ вакцин и сывороток с активностью 110 АЕ/мг. В качестве субстрата ХЭ использовали перекристаллизованный бутирилпиохолин иодид (БТХИ), раствор которого готовили по точной навеске в боратном буферном растворе. Все измерения проводили в боратном буферном растворе с pH 9,05 и аммиачном буферном растворе с pH 10, приготовленных из препаратов марки "хч" и "чда". Для получения сенсорной части иммуноферментного датчика использовали нитрат целлюлозы типа коллоксилин со средним содержанием азота 11,5-12,0 %, органические растворители марки "хч" и 25% раствор глутарового альдегида фирмы "Reanal". Использовали раствор Co(II) в концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ М, приготовленный из препаратов марки "хч". Аг СА в твердом виде и Ат против СА в жидком виде предоставлены лабораторией по разработке грибковых аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Раствор Аг СА

готовили по точной навеске в бидистиллированной воде.

Для получения биочувствительной части иммуноферментного сенсора (ИФС) нитрат целлюлозы растворяли в смеси органических растворителей толуола (0,75 мл) и бутилацетата (1,2 мл), добавляли 0,018 гр. ХЭ, растворенной в 0,2 мл дистиллированной воды и 0,1 мл раствора Ат в различных разведениях (1:10, 1:20, 1:30). После перемешивания добавляли 0,06 мл глутарового альдегида и затем 2-3 капли гексана в качестве коагулянта. Из этой смеси на стеклянной поверхности чашки Петри $d=90$ мм получали пленку, которую высушивали в потоке воздуха. Готовые пленки хранили в холодильнике при $t=4^{\circ}\text{C}$. Для использования сенсорной части для иммуноанализа ее при комнатной температуре на 30 мин. помещали в водный раствор бычьего сывороточного альбумина для предотвращения неспецифического связывания и блокирования активных центров глутарового альдегида. В работе использовали пленку площадью $7,95 \pm 0,05 \text{ см}^2$.

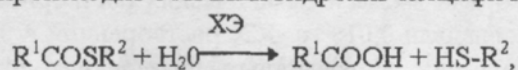
Электрохимическим детектором, входящим в состав ИФС, является стационарный ртутно-пленочный электрод с серебрянной подложкой, представляющий собой серебрянную проволоку ($d=0.5$ мм), впаянную или вставленную в стекло с помощью эпоксидного клея марки ЭДП. Торец электрода шлифовали до зеркальной поверхности и для получения амальгамы серебра опускали на 2 минуты в металлическую ртуть. Биочувствительная часть сенсора закрепляется на корпусе электрода с помощью прижимных колец. Такая конструкция ИФС позволяет легко сменить биочувствительную часть, потерявшую активность, на новую, а наличие запаса пленок с иммобилизованным ферментом и ИАт делает ИФС удобным в работе. Аналитическим сигналом служила высота катодного пика при потенциале -0.55 В .

Методика определения СА с использованием ИФС. В мерную колбу вместимостью 5 мл вводили 0.5 мл раствора БТХИ с концентрацией $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, от 0.05 до 0.5 мл раствора СА с концентрацией $1,6 \cdot 10^{-14}$ - $1,6 \cdot 10^{-6}$ моль/л, и доводили до метки боратым буферным раствором с pH 9,05. Раствор перемешивали и переносили в электрохимическую ячейку с насыщенным каломельным электродом и ИФС. После удаления кислорода в течение 15 минут регистрировали осцилловольтамперограмму в интервале потенциалов от $-0,1$ до $-0,9 \text{ В}$ ($v=1 \text{ В/с}$, непрерывный режим поляризации, треугольная развертка потенциала). Измеряли высоту катодного пика при потенциале $-0,55 \text{ В}$. Незвестные концентрации СА определяли по градуировочному графику зависимости тока пика от отрицательного значения логарифма концентрации СА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для определения одного из компонентов биоспецифического взаимодействия (в данном случае Ат СА) нами разработан ИФС в состав которого входят ИХЭ и ИАт против СА в различных разведениях. Установлено, что введение помимо ХЭ в состав биочувствительной части сенсора Ат против СА незначительно сказывается на каталитической активности ИХЭ. Величина удельной активности ИХЭ в отсутствие ИАт составляла $2,413 \pm 0,003 \text{ млМ/мин} \cdot \text{см}^2$, а в их присутствии $2,24 \pm 0,004 \text{ млМ/мин} \cdot \text{см}^2$. Прочность связывания Ат в пленке проверяют на каталитическим волнам водорода, которые наблюдаются в аммиачном буферном растворе (pH 9-10), содержащем соединения белковой природы, в присутствии солей Co(II) как на ртутном капельном [16], так и, как нами было установлено, на стационарном ртутно-пленочном электроде с серебрянной подложкой при потенциале $-1,4$ - $-1,5 \text{ В}$. Эта реакция чувствительна и позволяет определять до $1 \cdot 10^{-10}$ моль/л белка. Иммобилизованные Ат выдерживали при перемешивании в водном растворе в течении определенного времени. Затем добавляли раствор соли Co(II) и аммиачный буфер. Поскольку Ат прочно связаны с матрицей, и не отмываются, то каталитическая волна выделения водорода не наблюдалась.

Таким образом в основе предлагаемого варианта ИФА лежит сочетание реакции образования иммунного комплекса Ат-Аг на поверхности биочувствительной части сенсора с оценкой степени этого взаимодействия по величине аналитического сигнала, который получается с помощью биохимического сенсора на основе ИХЭ и ИАт.

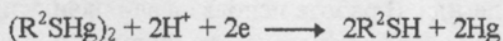
Природа формирования аналитического сигнала. При отсутствии в растворе СА в присутствии ИХЭ происходит обычный гидролиз специфических субстратов ХЭ



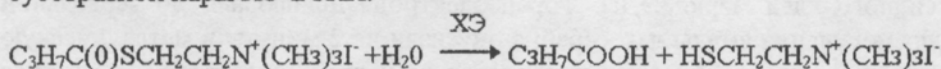
где R^1 : $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}_3\text{H}_7$, $-\text{C}_4\text{H}_9$

R^2 : $-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$

и идет восстановление. Продукт реакции гидролиза (тиол) может взаимодействовать с материалом электрода (ртутью) [17] и восстанавливаться при определенных условиях в доступной области потенциалов:



Наибольшая величина аналитического сигнала получается при использовании фермент-субстратной пары ХЭ-БТХИ.



Величина тока пика, являющаяся аналитическим сигналом, при потенциале $-0,55$ В зависит от многих факторов: концентрации субстрата, природы буферного раствора, pH раствора, активности ИХЭ [13], наличия в растворе эффекторов [18], начального потенциала поляризации. Были установлены условия, позволяющие получить аналитический сигнал максимальной величины и удобной для измерения формы при отсутствии в растворе активаторов или ингибиторов ХЭ (рис.1, кривая 1). Максимальный по величине аналитический сигнал наблюдается при pH 9,05 в боратном буферном растворе, концентрации субстрата $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, и начальном потенциале $-0,3$ В.

Введение в исследуемый раствор СА изменяет наблюдаемую картину: величина тока пика изменяется, причем уменьшение или увеличение пика связано с разведением Ат, используемых при изготовлении ИФС. В определенных интервалах концентраций наблюдается линейная зависимость между величиной тока пика и отрицательными значениями логарифма концентраций вводимого раствора СА. При введении в исследуемый раствор СА происходит связывание Ат со специфичными Ат, иммобилизованными в пленку из нитроцеллюлозы, с образованием иммунного комплекса Ат-Аг. Изменение высоты катодного пика при потенциале $-0,55$ В наблюдается только при добавлении в исследуемый раствор СА, то-есть именно образующийся иммунный комплекс Ат-Аг выполняет роль эффектора ИХЭ, не действуя на другие компоненты биоспецифического взаимодействия (рис. 1, кривые 2,3,4).

При разведении Ат 1:10 наблюдается ингибирующий эффект, то-есть высота тока в пике уменьшается (рис.1, кривая 2). Это связано, по нашему мнению, со стерическими препятствиями для подхода субстрата к активным центрам ИХЭ вследствие наличия в исследуемом растворе большого количества высокомолекулярных белковых молекул. При использовании разведения Ат, входящих в биочувствительную часть сенсора, 1:10, область рабочих концентраций для определения Ат СА составляет $\text{САт} = 1,6 \cdot 10^{-12} - 1,6 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

В свою очередь применение больших разведений Ат -1:20 и 1:30, используемых для введения в состав ИФС, позволяет наблюдать не ингибирующее, а активирующее действие иммунного комплекса на ИХЭ. Это проявляется в увеличении величины тока пика по сравнению с контрольным (холостым) результатом с отсутствием СА (рис. 1, кривые 3,4). Активирующий эффект связан, в первую очередь, с созданием более

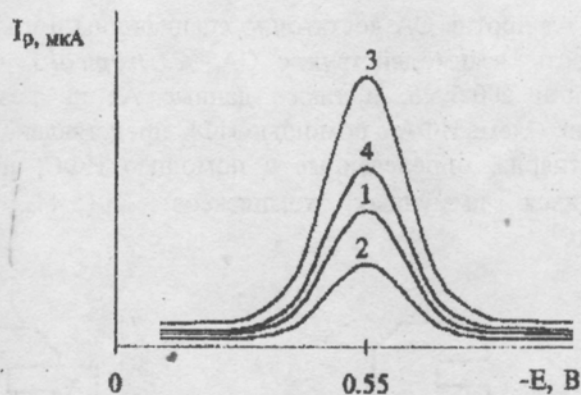


Рисунок 1.

Осцилловольтамперограммы растворов БТХИ с концентрацией $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л на фоне боратного буферного раствора (рН 9,05) в присутствии ИХЭ (1); в присутствии раствора СА, ИХЭ и ИАт в разведении (1:10) (2); СА, ИХЭ и ИАт в разведении (1:20) (3) и раствора СА, ИХЭ и ИАт в разведении (1:30) (4).

благоприятных условий для прохождения ферментативной реакции. В данном случае это связано с увеличением концентрации образующегося продукта ферментативной реакции R^2SH , который после взаимодействия с материалом электрода восстанавливается.

Таблица. Определение антигена *Candida albicans* с помощью ИФС с использованием иммобилизованных антител в различных разведениях ($n=5$, $p=0,95$)

Разведение антител	Концентрация антигена, моль/л		S _г
	введено	найдено	
1:10	$5 \cdot 10^{-8}$	$(5,1 \pm 0,1) 10^{-8}$	0,04
	$5 \cdot 10^{-9}$	$(4,9 \pm 0,3) 10^{-9}$	0,05
	$5 \cdot 10^{-11}$	$(5,2 \pm 0,5) 10^{-11}$	0,10
1:20	$5 \cdot 10^{-8}$	$(5,2 \pm 0,2) 10^{-8}$	0,03
	$5 \cdot 10^{-10}$	$(5,3 \pm 0,3) 10^{-10}$	0,05
	$5 \cdot 10^{-12}$	$(5,4 \pm 0,6) 10^{-12}$	0,08
	$5 \cdot 10^{-14}$	$(5,2 \pm 0,7) 10^{-14}$	0,09
1:30	$5 \cdot 10^{-8}$	$(4,8 \pm 0,2) 10^{-8}$	0,03
	$5 \cdot 10^{-9}$	$(5,2 \pm 0,4) 10^{-9}$	0,06
	$8 \cdot 10^{-10}$	$(7,9 \pm 0,7) 10^{-10}$	0,07

Увеличение концентрации продукта может быть обусловлено, с одной стороны, образованием более удобной для подхода субстрата и взаимодействия с активными центрами конформацией фермента. С другой стороны, Аг СА является кислой протеазой, а субстрат ХЭ имеет положительно заряженную катионную головку, поэтому нельзя в данных условиях исключить возможность электростатического взаимодействия молекул субстрата с компонентами биоспецифического взаимодействия. Все это может вызвать участие дополнительных молекул субстрата в ферментативном процессе, что и описывает активирующий эффект. Область рабочих концентраций для определения СА при разведениях Ат 1:20 - $C_{Аг} = 1,6 \cdot 10^{-15} - 1,6 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Следует отметить, что дальнейшее увеличение разведения Ат, например до 1:30, хотя и вызывает активирующий эффект, но в меньшей степени (рис. 1, кривая 4). Область рабочих концентраций в этом случае - $C_{Аг} = 5 \cdot 10^{-10} - 5 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Активирующий эффект позволил снизить нижнюю границу определяемых содержаний до $C_{Аг} = 1,6 \cdot 10^{-16}$ моль/л. Результаты определений представлены в таблице.

Установлено, что Ат против СА достаточно специфичны и проявляют, во-первых, групповую специфичность, взаимодействуя с СА, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* Us, *C. krusei* в соотношении 200:5:5:5, а также данные Ат не реагируют с другими грибковыми инфекциями. Схема ИФА с помощью ИФС представлена на рис. 2.

Константы Скетчарда, определенные с помощью ИФС, позволяют судить о прочности образующихся иммунных комплексов $K_1 = (5.44 \pm 0.20) 10^{12}$ моль⁻¹, $K_2 = (4.65 \pm 0.10) 10^{10}$ моль⁻¹.

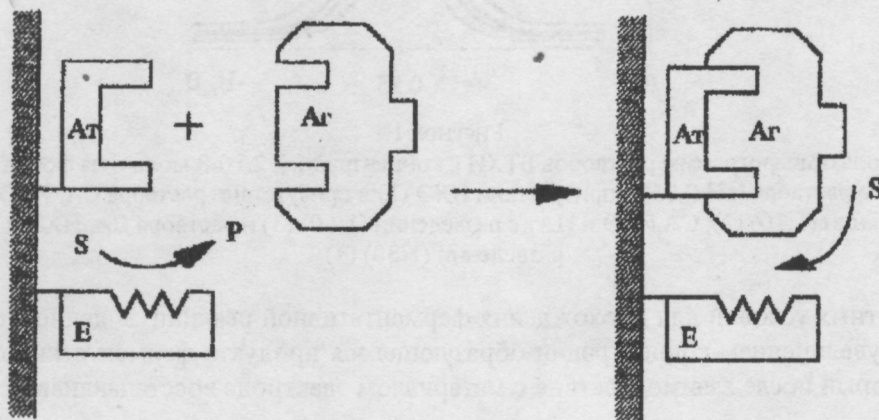


Рисунок 2.

Схема иммуноферментного анализа с помощью иммуноферментного сенсора

Данный вариант ИФА позволяет определять как высокие концентрации Аг СА, что говорит о систематическом глубоком поражении инфекцией СА, так и низкие значения концентраций, что указывает на поверхностный кандидоз, который обычно трудно определяется.

Предлагаемый вариант ИФА с помощью ИФС не требует специальной подготовки образца, отличается селективностью, чувствительностью, простотой и экспрессностью, что дает возможность создать тест-систему для определения СА с крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дзантиев Б.Б., Осипов А.П. (1987). Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. М.: ВИНТИ. 3. 56-116
2. Нго Т. Т., Ленгофф Г. (1988). Иммуноферментный анализ. М.: Мир. 444.
3. Инвицкий Д.М. (1987), 42,2. 204-218
4. Медянцева Э.П., Бабкина С.С., Будников Г.К., Федорова И.Л., Ибрагимова И.И. (1992) Ж. аналит. химии. 42,6. 1101-1106
5. Медянцева Э.П., Ли Фа-Шень., Федосеева О.В., Будников Г.К. (1993) Ж. прикл. Биохимии и микробиологии. 29, 4. 619-624.
6. Малая медицинская энциклопедия под ред. Василенко В.Х. М.: Советская энциклопедия. (1966). 4, 159-167.
7. Poulain D., Hopwood V., Vernest A. (1983) CRC Critical Reviews in Microbiology. 12,3. 223-267.
8. Estes G.B., Munoz M., Burdash N. M., Virella G.V. (1980) J. Immunol. Methods. 35. 105-113.

8. *Estes G.B., Munoz M., Burdash N. M., Virella G.V.*(1980) *J. Immunol. Methods.* **35**. 105-113.
9. *Kiehn T.E., Bernard E.M., Gold J.W.M., Armstrong D.*(1979), **206,2**. 577-580
10. *Warrwn R.C., Richardson M.D., Wnite L.O.* (1978). **66,3**. 179-182.
11. *Savolainen J., Viander M.* (1989). *J. Immunol. Methods.* **117**. 285-288.
12. *Юлаев М.Ф., Сутдыков Р.А., Дмитриева Н.М., Дзантиев Б. Б., Жердеев А. В., Аскаров К.А.*(1995) *Журн. аналит. химии.* **5, 2**. 211-214.
13. *Будников Г.К., Медянцева Э.П., Волков А.В., Аронзон С.С.* (1983) *Журн. аналит. химии.*- **38, 7**. 1283-1288.
14. *Wong R.B., Anis N., Eldefrawi M.E.* (1993) *Anal. Chim. acta.-* **279, 1**. 141-147.
15. *Медянцева Э.П., Бабкина С.С., Вертлиб М.Г., Будников Г. К.*(1993) *Ж. аналит. химии.* **48, 10**. 1632-1638.
16. *Кузнецов Б.А., Шумакович Г.П.*(1975) *Методы современной биохимии.* - М.: Наука. 102-106.
17. *Плембек Д.*(1985) *Электрохимические методы анализа.*-М.: Мир.-496.
18. *Медянцева Э.П., Будников Г. К., Бабкина С.С.* (1990) *Ж. аналит. ХИМИИ*, **45**, 7. 1386-1389.

DETERMINATION OF ANTIGEN CANDIDA ALBICANS WITH AMPEROMETRIC ENZYME IMMUNOSENSOR.

M.P. KUTYREVA, E.P. MEDYANTSEVA, E.V. KHALDEEVA, N.I. OLUSHKO*,
H.C. BLIDNIKOV

Department of Chemistry, Kazan State University, 420008 Russia, Kazan. Kremlevskaya 18.

*Kazan Institute of Epidemiology and Microbiology, Laboratory on Development of Allergens

Determination new variant enzyme immunoassay with amperometric enzyme immunosensor, including the immobilizing enzyme-choline esterase and antibodies against *Candida albicans* (CA) in biosensitivity part of sensor, for diagnose disease of CA. The method for determination of CA based on combination immunochemical icactios and voltammetric indication of analytical signal was developed. Amperometric enzyme immunosensor developed has been used as detector. Differencies dilutions of antibody (Ab) against antigen (Ag) of CA immobilizing in common with choline esterase (CE). The method of immobilization developed allows to riseive the sensor with including the immobilized CE and Ab in common. The method of determination of CA based on combination the reaction of forming immune complex tAb-AgI with enzyme immunosensor for its detection. The dynamic range of concentrations determined of Ag depends on degree of dilution of Ab used for manufactory biosensitivity part of sensor. The data indicate that the [Ab-Ag] immune complexes are stable. This is also confirmed by the values of [Ab-Ag] binding constants, obtained in Scatchard coordinates.

This method of determination doesn't require special preparation of a sample. Selectivity, sensitivity, simplicity and quickness are characterize of this method which could be used for manufacturing test-sistem for determination CA in blood.

Key Words: antibody, antigen, enzyme immunoassay, cholinesterase, enzyme immunosensor.