

УДК 612.017.2; 858; 621.317

©Коллектив авторов

ДЕТЕКЦИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА

Ю.ДИВАНОВ¹, О.В.ГНЕДЕНКО¹, В.А.КОНЕВ², О.Б.КОВАЛЕВ²,
Л.И.НИКОЛАЕВА¹, Н.В.СЕМЕНОВА¹, В.Ф.УЧАЙКИН², А.И.АРЧАКОВ¹.

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН.

119992, Москва, ул. Погодинская, 10; тел. 246-33-74, факс 245-08-57.

²Российский Государственный медицинский университет, кафедра детских
инфекционных болезней, Москва.

Цель исследования - создание нового метода выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) с помощью оптического биосенсора IAsys. Оптический биосенсор IAsys - прибор, позволяющий регистрировать в реальном времени образование комплексов HBsAg с моноклональными антителами к нему. Детекция межмолекулярных взаимодействий осуществляется путем регистрации на мониторе компьютера изменений коэффициента преломления света в чувствительном слое биосенсорной кюветы. Основные преимущества биосенсорной диагностики - быстрая регистрация реально текущих взаимодействий без введения специальных меток в исследуемые молекулы.

В представленной работе впервые использовался оптический биосенсор для выявления HBsAg в сыворотке крови. Сравнительный анализ выявления HBsAg методами оптического биосенсора и иммуноферментного анализа продемонстрировал высокую специфичность детекции HBsAg с помощью оптического биосенсора.

Ключевые слова: оптический биосенсор, поверхностный антиген вируса гепатита В.

ВВЕДЕНИЕ. Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) – белковый комплекс, который формирует наружную оболочку данного вируса [1]. HBsAg обнаруживается в крови людей при остром или хроническом гепатите В и при так называемом “здоровом” носительстве. Определению HBsAg отводится

Список сокращений: IAsys – оптический биосенсор, HBsAg –поверхностный антиген вируса гепатита В, Anti-HBs – антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В, NHS - N-гидроксисукцинимид, EDC – этиламинопропилкарбодимид, PBS/T – фосфатно-солевой буфер с детергентом Tween 20, Im – количество иммобилизованного образца, К - поверхностная концентрация антигена, R - смещение резонансного угла оптического биосенсора.

ключевая роль в диагностике заболеваний, вызванных вирусом гепатита В. С 1970-х годов (вирус гепатита В был открыт и охарактеризован в 1970-1971 гг.) и до настоящего времени для детекции HBsAg были использованы практически все биологические методы выявления антигенов - от преципитации в геле до радиоиммунного анализа. До сих пор продолжаются поиски более чувствительного, специфического, быстрого и простого в исполнении метода детекции HBsAg.

В 1990 г появился первый коммерческий оптический биосенсор. С тех пор растет поток научных статей, посвященных использованию оптического биосенсора в биохимических и фармакологических исследованиях [2]. Оптический биосенсор нашел применение в протеомных исследованиях [3, 4], при проведении эпигенетического картирования белковых антигенов [5], в анализе взаимодействий клетка-лиганды [6]. Детекция микробных антигенов с помощью оптического биосенсора - новое направление, которое начало развиваться в последнее время [7, 8]. Основное преимущество данного метода - анализ в реальном времени быстротекущих межмолекулярных взаимодействий без введения каких-либо меток в анализируемые молекулы. Комбинация методов оптического биосенсора и масс-спектрометрии позволяет поднять уровень чувствительности при детекции белковых молекул до фемтомолярного уровня [9, 10].

В настоящее время разработаны несколько конструкций биосенсоров, из которых можно выделить два типа оптических биосенсоров: первый, основанный на использовании плазмонного резонанса, и второй - так называемое «оптическое резонансное зеркало». В обоих случаях детекция межмолекулярного взаимодействия основана на регистрации изменения показателя преломления среды при образовании комплекса белка, иммобилизованного на резонансном слое измерительной кюветы, с его партнером с очень высокой чувствительностью за счет использования резонансных эффектов. Оптический биосенсор типа «резонансное зеркало» имеет разрешение на порядок выше, чем на основе плазмонного резонанса за счет оптимального подбора оптических структур, формирующих данный тип конструкции [11].

МЕТОДИКА. Прибор. Оптический биосенсор IAsys ("Affinity Sensors, division of Labsystems", Финляндия), кюветы с покрытием "CM-Dextran" или "Carboxylate".

Реактивы. Холат натрия получен из "Sigma" (St. Louis, USA), этиламинопропилкарбодиимид (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), этаноламин получены из "Affinity Sensors" (Division of Labsystems, Cambridge, UK), HCl, NaCl получены из "Реахим" (Россия, Москва).

Антиген и антитела. HBsAg - рекомбинантный поверхностный антиген вирусного гепатита В получен из "Комбиотех" (Россия, Москва). Моноклональные антитела к разным эпитопам HBsAg - NE 2 и NE 3 - получены в НИИ Иммунологии РАМН (Россия, Москва), С-24 получены из НИИ экспериментальной кардиологии РАМН (Россия, Москва).

Сыворотки. В работе исследованы 290 образцов сывороток больных острым и хроническим вирусным гепатитом В или острым гепатитом А. По данным иммуноферментного анализа 115 образцов сывороток содержали HBsAg.

Методы. Принцип анализа межмолекулярных белковых взаимодействий с помощью оптического биосенсора описан в разделе «Результаты и обсуждения». Иммобилизация моноклональных антител на поверхности кюветы с «CM»-

декстрановым покрытием была выполнена по процедуре, рекомендованной фирмой Affinity Sensors [12].

В качестве контрольного метода для анализа достоверности результатов, полученных методом оптического биосенсора, использован иммуноферментный анализ в коммерческих диагностических тест-системах: HBsAg (НПО "Диагностические системы", Нижний Новгород; Рош-Москва, Швейцария; "Orgenics", Израиль), анти-HBs (НПО "Диагностические системы", Нижний Новгород; Рош-Москва, Швейцария; "Human", Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ. Схема оптический биосенсор типа "резонансное зеркало" представлена на рис. 1. Прибор содержит измерительную кювету, дно которой состоит из стеклянной призмы и волновода с высоким показателем преломления (n_{eh}), разделенными кварцем-средой с низким показателем преломления (n_{el}). К чувствительной поверхности волновода, являющейся поверхностью дна кюветы, иммобилизуется один из партнеров взаимодействующей пары. Луч лазера падает на границу призма-кварц под углом больше угла полного внутреннего отражения. Часть света при этом туннелирует через кварцевый слой при определенном резонансном угле падения и распространяется вдоль волновода, а затем туннелирует обратно и выходит из призмы. При добавлении в кювету второго партнера, образующего комплекс с иммобилизованным компонентом, меняется показатель преломления в пристеночном слое, и соответственно, наблюдается смещение провала отраженного света по угловой координате в зависимости от времени.

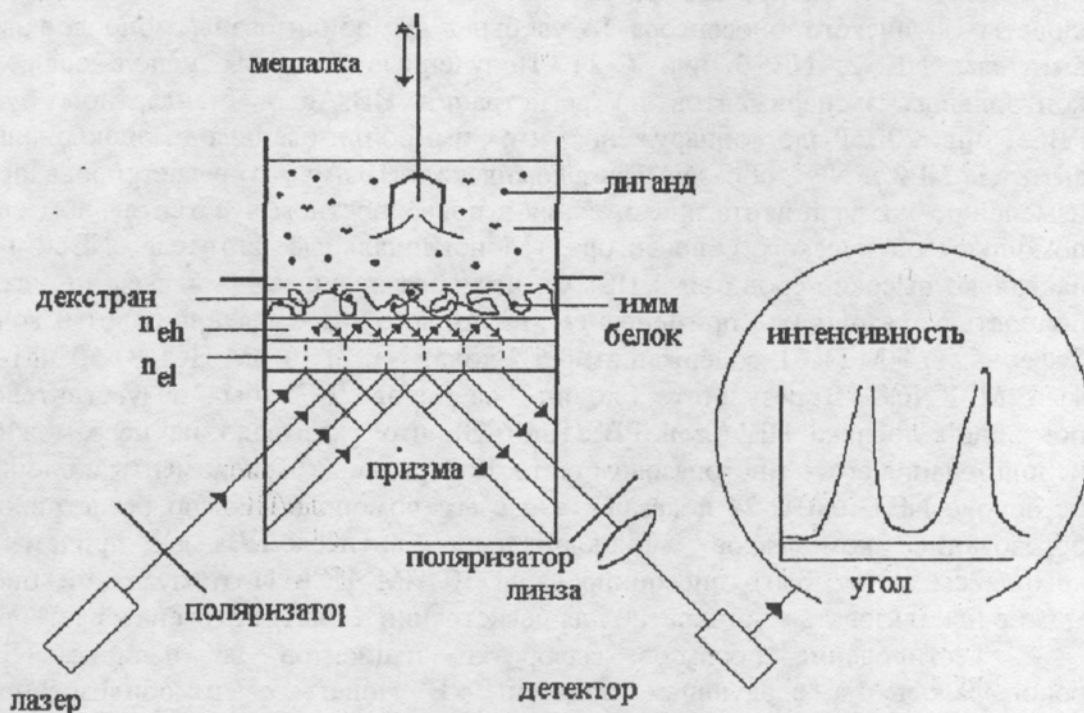


Рисунок 1.

Схема оптического биосенсора. Имм. белок – иммобилизованный белок.

При резонансном угле падения излучения лазера на чувствительной поверхности волновода формируется поле затухающей световой волны, интенсивность которой экспоненциально спадает с расстоянием от поверхности.

При добавлении в кювету второго партнера - лиганда - в концентрации гораздо большей, чем концентрация иммобилизованного партнера, происходит комплексообразование. В результате чего меняется показатель преломления среды в пристеночном чувствительном слое и, соответственно, иным становится резонансное положение угла излучения. Мониторинг изменения положения резонансного угла падения лазерного луча в зависимости от времени позволяет регистрировать кинетическую кривую образования комплексов. Регистрируя эти кривые для различных концентраций можно рассчитать константы скорости ассоциации и диссоциации. Реакцию комплексообразования иммобилизованного партнера А с добавляемым в кювету партнером В можно описать уравнением:



Сигнал, соответствующий отклику R оптического биосенсора на образование комплекса, можно записать как [12]:

$$dR/dt = d[AB]/dt = k_{on}[A][B] - k_{off}[AB] = k_{on}[B]R_{max} - (k_{on}[B]R + k_{off}R) \quad (2),$$

где k_{on} , k_{off} - константы скорости образования и диссоциации комплексов.

При замене в кювете раствора с лигандом на буферный раствор, наблюдается диссоциация комплекса.

Для выявления HBsAg в сыворотке крови человека с помощью оптического биосенсора был разработан биочип. С этой целью на поверхности кюветы оптического биосенсора IAsys были иммобилизованы моноклональные антитела: NE 2, NE 3 или C-24. Полученные биочипы использовали для контрольных экспериментов по регистрации HBsAg в стандартном буфере PBS/Твин 20. Было обнаружено, что иммобилизованные моноклональные антитела NE2 и NE3, образуют комплекс с HBsAg, что регистрировалось по изменению коэффициента преломления в поверхностном чувствительном слое с помощью оптического биосенсора. Моноклональные антитела NE2 имели настолько высокое сродство к HBsAg, что образованные комплексы не удалось полностью разрушить применением ни одного из следующих отмывочных буферов: 1) 1 М NaCl, содержащим 0,5% холат Na, 2) 10 мМ HCl, 3) 50 мМ HCl, 4) 3 М KNCS. В результате биочип на основе NE2 был нечувствителен к повторной добавке HBsAg в PBS/Твин 20, что указывало на невозможность использования его в многократном тесте. Контрольные эксперименты с биочипом на основе NE3 или C-24 показали, что с его помощью можно регистрировать образование комплексов моноклональное антитело/HBsAg, причем эти комплексы могут быть диссоциированы 10 мМ HCl. Поэтому такой биочип можно использовать многократно для регистрации HBsAg антигена в растворе.

Тестирование образцов сыворотки пациентов на наличие HBsAg основывалось на следующем принципе. В кювету с иммобилизованными моноклональными антителами к HBsAg (NE3 или C-24) добавляли 20 мкл сыворотки. В том случае, если сыворотка содержала HBsAg, образовывались комплексы, в результате чего менялся индекс преломления вблизи поверхности, что регистрировалось прибором. Для регистрации процессов диссоциации этих комплексов сыворотку из кюветы удаляли и добавляли туда стандартный буфер (PBS/Твин 20). Экспериментальные кривые, отражающие связывание антиген-антитело, были аппроксимированы полиномом первой степени и представлены в

виде значений поверхностных концентраций HBsAg (K), связанного с антителами и рассчитанных по следующей формуле:

$$\Delta K (\text{ед.}) = \Delta R / 200 \quad (3),$$

где $\Delta R = (R_1 - R_2)$; R_1 и R_2 – смещение резонансного угла прибора при $\Delta t = 10$ сек; 200 – масштабный множитель; 1 ед. соответствует поверхностной концентрации связавшегося белка 1 нг/мм^2 .

Для определения специфичности связывания иммобилизованных моноклональных антител к HBsAg (NE3) методом оптического биосенсора был проведен сравнительный анализ выявления HBsAg в сыворотках крови больных вирусными гепатитами А или В двумя методами: методом оптического биосенсора и иммуноферментным анализом. В 144 случаях для сывороток пациентов, не содержащих HBsAg по результатам иммуноферментного анализа, был характерен низкий уровень сигнала биосенсора, ниже $\Delta K = 1,1 \text{ нг/мм}^2$. Среднее значение составляло $0,7 \pm 0,3$. Поэтому, сыворотки, характеризующиеся значением ΔK выше 1,1 рассматривались как положительные, то есть содержащие HBsAg. В 82 сыворотках, содержащих HBsAg по результатам иммуноферментного анализа, был характерен уровень сигнала биосенсора ΔK от 1,1 до $3,85 \text{ нг/мм}^2$.

На рис. 2 приведена типичная кривая отклика иммобилизованного моноклонального антитела NE3 на добавление сывороток № 2 и №41508. По данным иммуноферментного анализа сыворотка №41508 содержала HBsAg, а сыворотка №2 – нет. После добавления сыворотки в измерительную кювету наблюдался рост сигнала, связанный как с процессом специфического, так и неспецифического связывания. Результаты, полученные на двух видах кювет ("CM-Dextran" и "Carboxylate"), были аналогичными.

После записи кривой ассоциации сыворотку в кювете заменяли на PBS/Твин - 20 буфер и наблюдали десорбция неспецифически связанного вещества. В результате кривая выходила на плато, которое характеризует количество образовавшихся комплексов антиген/антитело. Видно, что для сыворотки №2 наблюдается только неспецифическое связывание, так как адсорбированное вещество практически полностью отмывается PBS/Твин - 20 буфером. В случае сыворотки №41508 наблюдался высокий уровень образования комплексов антиген/антитело после отмывки буфером неспецифически сорбированных молекул на поверхности кюветы.

В табл. 1 представлены результаты выявления HBsAg в сыворотках методом оптического биосенсора и иммуноферментного анализа. Видно, что кроме описанных выше случаев совпадения положительных (82) и отрицательных (144) на HBsAg сывороток, имеется расхождение в 64 случаях: в 33 случаях был получен отрицательный результат с помощью оптического биосенсора в сыворотках, позитивных на HBsAg по данным иммуноферментного анализа, а в 31 случае, наоборот, сыворотки, отрицательные по данным иммуноферментного анализа были положительными при тестировании методом оптического биосенсора. В целом, совпадение в определении HBsAg двумя методами наблюдалось в 78 % сывороток. Несовпадение результатов определения HBsAg в сыворотках методом оптического биосенсора и иммуноферментного анализа может быть обусловлено неспецифическим взаимодействием компонентов сыворотки с иммобилизованными моноклональными антителами.

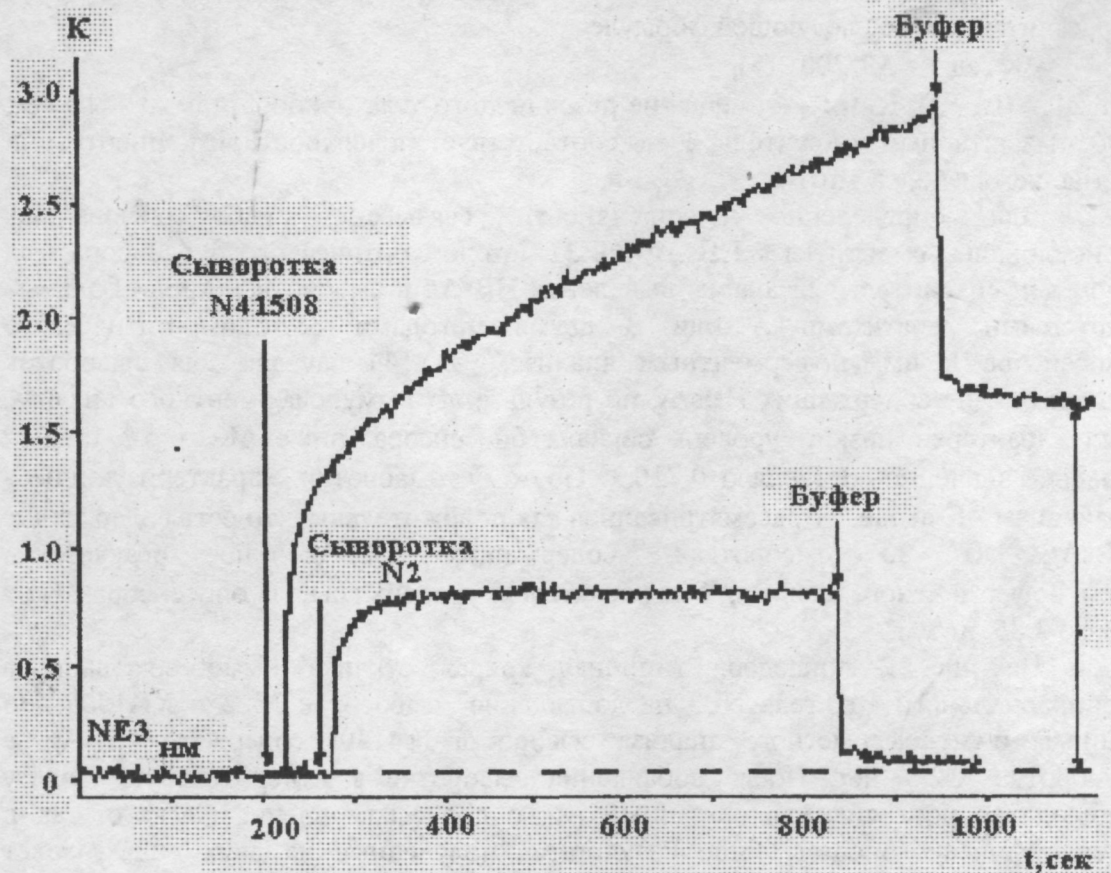


Рисунок 2.

— - кривая связывания антигена с иммобилизованными антителами;
 --- - базовая линия сигнала прибора.

Стрелками обозначены добавление сыворотки и PBS/Твин - 20 буфера, $t=25^{\circ}\text{C}$.

По оси ординат (ΔK) - поверхностная концентрация антигена, связанного с иммобилизованными антителами (нг/мм^2); по оси абсцисс (t) - время (сек).

Таблица 1. Сравнение данных по выявлению HBsAg в сыворотке крови у 290 больных вирусным гепатитом с помощью иммуноферментного анализа и оптического биосенсора.

Количество измерений	Данные иммуноферментного анализа		Данные тестирования с помощью оптического биосенсора	
	Оптическая плотность	Результат	ΔK , нг/мм^2	Результат
82	0,8 - 2,2	+	1,1 - 3,85	+
33	0,2 - 1,5	+	0,52 - 1,0	-
31	< 0,1	-	1,1 - 2,5	+
144	< 0,1	-	0,05 - 1,0	-

Таким образом, с помощью оптического биосенсора возможно выявление HBsAg в сыворотках в течение 10 мин. Одна и та же кювета с иммобилизованными моноклональными антителами может быть использована многократно. Специфичность и чувствительность метода оптического биосенсора для выявления HBsAg может быть увеличена за счет применения двухканальной

схемы регистрации вместо одноканальной схемы, использованной в данной работе.

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке Межведомственной научно-технической программы «Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего».

ЛИТЕРАТУРА

1. Almeida J.D., Stott E.J. (1971) *Lancet*, **2**, 1225-1227.
2. Rich R.L., Myszka D.G. (2000) *J. Mol. Recognit.*, **13**, 388-407.
3. Nelson R.W., Nedelkov D., Tubbs K.A. (2000) *Electrophoresis*, **21**, 1155-1163.
4. Nedelkov D., Nelson R.W. (2000) *J. Mol. Recognit.*, **13**, 140-145.
5. Novotny L.A., Jurcisek J.A., Pichichero M.E., Bakaletz L.O. (2000) *Infect. Immunol.*, **68**, 2119-2128.
6. Quinn J.G., O'Neill S., Doyle A et al. (2000) *Anal. Biochem.*, **281**, 135-143.
7. Nedelkov D., Rasooly A., Nelson R.W. (2000) *Int. J. Food Microbiol.*, **60**, 1-13.
8. Welschof M., Terness P., Kipriynov S.M. et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 1902-1907.
9. Natsume T., Nakayama H., Jansson O. et al. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 4193-4198.
10. Nelson R.W., Nedelkov D., Tubbs K.A. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 404A-411A.
11. Cush, R., Gronin, J.M., Stewart, W.J., Maule, C.H., Molloy, J., Goddard, N.J. (1993) *Biosensor and Bioelectronics*, **8**, 347-353.
11. IAsys Cuvette System. (1993) User's Guide. Fisons Applied Sensor Technology.

Поступила 01.02.01.

THE OPTICAL BIOSENSOR TECHNIQUE FOR DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN.

YR.D.IVANOV¹, O.V.GNEDENKO¹, V.A.KONEV², O.B.KOVALEV², L.I.NIKOLAEVA¹,
N.V.SEMENOVA¹, V.F. UCHAIKIN², A.I.ARCHAKOV¹

¹Institute of Biomedical Chemistr, Russian Academy of Medical Sciences
Pogodinskaya, 10, Moscow, Russia; phone: 246-33-74, fax: 245-08-57.

²Russian State Medical University, Chair of children infection disease, Moscow.

A new method for detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) has been developed. It employs IAsys optical biosensor registration kinetics of HBsAg complexes with monoclonal antibodies. Detection of intermolecular interactions is accompanied by changes of the light refraction coefficient in the sensitive layer of the biosensor cuvette. The main advantage of this diagnostic technique consists in rapid registration of these interactions in real time, without any introduction of special labels into analysing molecules.

The optical biosensor method was successfully employed for the detection of HBsAg in human blood serum. A comparative study of HBsAg detection by the optical biosensor and by immunoenzyme analysis demonstrated high specificity of HBsAg detection by this new method.

Key words: optical biosensor, hepatitis B surface antigen.