

© Коллектив авторов
УДК 612.174:311-08

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЛАНТАНИДНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНА ТИРОКСИНА В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ.

В.В. Жердева¹, А.В. Чудинов², А.П. Савицкий¹.

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский пр., 33;
тел/факс. (095)952-87-99/954-27-32, эл. почта: vjerdeva@inbi.ras.ru

²Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, РАН, 119991, Москва

Определение гормона тироксина (Т4) является подтверждающим тестом на врожденный гипотиреоз, который в 70% случаев протекает бессимптомно. Нами разработан метод иммунофлуоресцентного анализа тироксина для неонатального скрининга с использованием моноклональных антител и тироксина, меченного европием, в сухих пятнах крови для флуоресцентного иммуноанализа с временным разрешением (ФИАВР) с использованием импульсного спектрофлуорометра DELFIA Plate Fluorometer 1232 ("Wallac", Финляндия) и его последующих модификаций, которыми оборудованы региональные центры неонатального скрининга.

Получены, охарактеризованы и стандартизированы препараты моноклональных антител: определены классы/подклассы иммуноглобулинов (IgG 2b, IgG 1), константы связывания (107 - 108 М⁻¹), перекрестная реактивность с агентами, гомологичными по структуре с Т4 (0-2% перекреста). Отобраны наиболее устойчивые клоны с константой аффинности 108 М⁻¹, позволяющие детектировать уровень концентрации общего тироксина в крови.

Синтезированы конъюгаты хелата европия с тироксином. Оптимизирован состав буфера для анализа Т4, который включает салицилат натрия в концентрации 2 мг/мл и этилендиаминтетрауксусную кислоту в концентрации 2 мМ.

Предел детекции тироксина в сухих пятнах крови составляет 10 нМ, при коэффициенте вариации не более 15 %, что позволяет диагностировать сниженный уровень общего тироксина. Точность анализа тироксина оценена с помощью набора сывороток для межлабораторного контроля качества Lipocheck Immunoassay Plus Control Kit™ ("BioRad", США). Полученные значения укладываются в доверительный интервал концентраций Т4, указанный для сывороток, что говорит о надежности разработанного метода.

Ключевые слова: лантанидный флуоресцентный иммуноанализ, диангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДА-ДТПА), тироксин, моноклональные антитела, сухие пятна крови, неонатальный скрининг

ВВЕДЕНИЕ. Превентивная медицина играет все большую роль в высокоразвитых странах. Наиболее значительным достижением в последнее десятилетие является повсеместное распространение программ неонатального скрининга новорожденных на врожденные заболевания и, прежде всего, на заболевания, приводящие к дефектам умственного развития, такие как гипотиреоз и фенилкетонурия. Это позволяет экономить значительные бюджетные средства на содержание детей-инвалидов. Определение тироксина является основным

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРОКСИНА

подтверждающим тестом для диагностики гипотиреоза - тяжелого врожденного заболевания. Основной проблемой при разработке подтверждающего теста на гипотиреоз является необходимость очень высокой чувствительности в сочетании с высокой точностью измерений.

Флуоресцентный иммуноанализ с временным разрешением (ФИАВР) на сегодняшний день является доминирующим в программах неонатального скрининга во всем мире. Основой метода ФИАВР являются хелатные соединения европия, используемые в качестве высокочувствительных меток. Данный метод, как минимум, на порядок чувствительнее иммуноферментного анализа: это становится важным при определении тироксина в сухих пятнах крови, когда образец разбавляется в лунке в несколько раз. Использование сухих пятен крови, а не образцов сыворотки, взятых у новорожденных, наиболее удобно с клинической точки зрения. Это снимает проблемы консервации крови, краткосрочности ее хранения и транспортировки. Концентрация общего тироксина в крови у здоровых людей в среднем находится в диапазоне от 69 до 141 нМ (т.е. в среднем 100 нМ), сниженный уровень тироксина соответствует значениям <69 нМ [1]. Предложенная схема анализа разработана для определения общего тироксина в сухих пятнах крови для флуоресцентных ридеров DELFIA Plate Fluorometer 1232 ("Wallac", Финляндия) и его последующих модификаций.

МЕТОДИКА. Получение моноклональных антител.

Для иммунизации животных и получения антител к тироксину использовали конъюгат тироксина с бычьим сывороточным альбумином (БСА ("Sigma", США)) и соевым ингибитором трипсина (СИТ ("Reanal", Венгрия)). При получении конъюгата карбоксильную группу тироксина связывали с аминогруппами БСА и СИТ. Аминогруппу тироксина ("Reanal") предварительно ацилировали трифторуксусным ангидридом. Далее из трифторацетильного производного получали гидроксисукцинимидный эфир, который связывали с БСА или СИТ [2].

Для иммунизации использовали мышей линии BALB/c 6-недельного возраста. Иммунизацию проводили конъюгатами Т4-БСА и Т4-СИТ по следующей схеме: 1 день - 80 мкг конъюгата в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (0,01 М фосфат натрия однозамещенный, 0,15 М хлорид натрия, pH 7,4) в равном объеме полного адьюванта Фрейнда вводили внутрибрюшинно; 21, 30, 48 день - по 80 мкг конъюгата в том же буфере в неполном адьюванте. За 3 дня до слияния вводили внутривенно 80 мкг конъюгата в ФСБ мышам, выбранным для проведения слияния. Титр антител в сыворотке крови был не ниже 150 000. Для слияния использовали линию мышиной миеломы sp2/0, находящуюся в логарифмической фазе роста. Слияние с последующим отбором антителопродуцирующих клеток и клонирование проводили по методикам [3].

Очистка и характеристика моноклональных антител (мАт).

Моноклональные антитела выделяли осаждением из асцитной жидкости насыщенным раствором сульфата аммония и последующей очисткой на аффинной колонке, в которой в качестве лиганда использовали конъюгат Т4-СИТ, ковалентно связанный с Br-CN-сефарозой ("Pharmacia", Швеция) [4]. Колонку уравнивали 50 мМ Трис-НСl, 3 М NaCl pH 8,5, элюцию антител проводили 0,1 М глицином pH 2,8, для нейтрализации фракций использовали буфер 1,0 М Трис pH 8,0, разделение контролировали спектрофотометрически на длине волны 280 нм [5].

Специфичность взаимодействия моноклональных антител с тироксином оценивали методом непрямого конкурентного твердофазного иммуноанализа, когда за связывание с антителами конкурировал тироксин и его конъюгат с белком, адсорбированным на твердой фазе.

Получение тироксина, меченого европием.

Диангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДА-ДТПА) получали по методу [6] реакцией диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА) с уксусным ангидридом в пиридине. Схема получения ДА-ДТПА и конъюгата

тироксина с ДТПА приведены на рис. 1. Реакцию получения конъюгата тирокина с диэтилентриаминпентауксусой кислотой вели в водно-органической среде при щелочных условиях. Во флакон с винтовой крышкой и магнитной мешалкой помещали диангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты в эквимольных количествах, соответствующих 50-кратному избытку по отношению к тироксину, добавляли пара-нитрофенол и сухой пиридин. Реакционную массу перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре 30 часов. К реакционной массе добавляли кристаллический NaHCO_3 и затем добавляли раствор тирокина в смеси 1,0 М Na_2CO_3 и пиридина. Смесь дополнительно перемешивали при комнатной температуре 16 часов, затем упаривали в вакууме на роторном испарителе (температура бани не выше 50 °C). К твердому остатку добавляли 25%-ный раствор ацетонитрила в 0,1 М триэтиламмоний ацетате (ТЕАА) и добавляли кристаллическую лимонную кислоту до pH 7,0. Раствор фильтровали через фильтр 0,22 мкм и наносили на хроматографическую колонку. Реакционный флакон и фильтр промывали порциями 25%-ным раствором ацетонитрила в 0,1 М ТЕАА (500 мкл) и каждую порцию последовательно наносили на хроматографическую колонку.

Продукт реакции выделяли препаративной хроматографией на колонке с обращенной фазой RP-18 (колонка "Merck" 10x240 мм, размер частиц 40x63 мкм) при элюировании линейным градиентом ацетонитрила в 0,1 М триэтиламмонийацетатном буфере (от 20 до 50 % ацетонитрила за 6 часов, скорость 68 мл/час) при контроле на 226 нм.

Основной продукт был идентифицирован по данным УФ-спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектрометрии. В УФ- спектре имеется характерный максимум при 320 нм с минимумом при 290 нм. В MALDI-TOF масс-спектре идентифицированы сигналы относящиеся к конъюгату Т4-ДТПА (мол.масса 1152,7) и его моноватриевой соли (мол.масса 1174,7).

Лиофилизированный препарат конъюгата растворяли в 190 мкл диметилформамида (ДМФА, НИИ приборостроения, Москва) и 10 мкл воды до конечной концентрации 0,058М. Концентрацию Т4-ДТПА определяли спектрофотометрически в 0,05М КОН на длине волны 325 нм с использованием коэффициента экстинкции $\epsilon_{\text{тироксин}}^{325} = 6000 \text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$. 10 мг ацетата европия растворяли в 1 мл ДМФА для получения 0,1 М раствора. К 200 мкл Т4-ДТПА, содержащему 0,011 моль хелатированного тирокина, добавляли эквимольное количество ацетата европия на встряхивателе по каплям. Инкубировали в течении ночи в темноте.

Проведение твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА).

Подготовка иммуносорбента для анализа Т4 в ИФА. В лунках разборного полистирольного 96-луночного микропланшета ("Медбиополимер", Россия) для иммуоферментного анализа помещали по 0,1 мл раствора антигена (Т4-СИТ) с соответствующей концентрацией в 0,1 М бикарбонатном буфере pH 9,5 и инкубировали 12 часов при 37° С. Затем раствор выливали. Оставшиеся центры адсорбции на полистирольной поверхности насыщали 6% раствором маннита в фосфатно-солевом буфере в течение 2 часов при 37° С. После этого микропланшет промывали ФСБ, содержащим 0,05% Твин-20 ("Sigma") pH 7,4 (ФСБТ) и хранили его при 4° С.

А) непрямой ИФА

В лунках полистирольного микропланшета ("Медбиополимер", Россия) с адсорбированным конъюгатом Т4-СИТ последовательно разводили моноклональные антитела в буфере ФСБТ с добавлением 0,5% БСА и 0,5% фетальной сыворотки. Инкубировали 1 ч при 37°С. Отмывали ФСБТ 4 раза. Далее в каждую лунку наливали по 0,1 мл кроличьих антимышиных антител, меченных пероксидазой хрена (НИИ им. Гамалеи, Россия) в рабочем разведении 1:6 000 в том же буфере. Инкубировали при 37°С 40 мин. Отмывали ФСБТ 6 раз и заливали в каждую лунку по 0,2 мл субстратной смеси следующего состава: 4 мМ H_2O_2 ,

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРОКСИНА

1 mM 2,2' - азино- диэтилбензоатиазолин-(6)-сульфоновой кислоты (ABTS) в 0,05 M цитратном буфере, pH 4,0. Через 15 мин измеряли ферментативную активность, которая пропорциональна содержанию специфических антител. Ферментативную активность оценивали по изменению окраски на считывающем устройстве для иммуноферментного анализа Titertek Multiscan MCC/340 при длине волны 405 нм (длина волны сравнения 492 нм).

Б) конкурентный ИФА.

За центры связывания антител конкурировали антиген, иммобилизованный на планшете (адсорбция Т₄-СИТ из 200 мкл в концентрации 5 мкг/мл) и антиген (Т₄), находящийся в растворе в различных концентрациях. Гаптен и мАт (1 мкг/мл) добавляли в 100 мкл буфера ФСБТ с добавлением 0,5% БСА и 0,5% фетальной сыворотки. Инкубировали 1,5 ч при 37°C. Отмывали ФСБТ 4 раза. (Далее как в варианте А).

Проведение твердофазного ФИАВР с Т₄ меченным Eu (Т₄-Eu).

Подготовка иммуносорбента с антивидовыми антителами для анализа Т₄ в сухих пятнах крови. В лунках разборного полистирольного микропланшета ("Labsystems", Финляндия) для иммунофлуоресцентного анализа помещали по 0,1 мл раствора кроличьих антимышинных антител ("ИМТЕК", Россия) в концентрации 5 мкг/мл в 0,1 M бикарбонатном буфере pH 9,2 и инкубировали 2 часа при 37° С. Затем раствор выливали, а планшет промывали 1 раз буфером для отмывки следующего состава: 50 mM трис-HCl, 0,15 M NaCl, 0,02% тритон X-100, 0,05% NaN₃, pH 7,4. Оставшиеся центры адсорбции на полистирольной поверхности насыщали 6% раствором маннита в 50 mM трис-HCl, содержащем 0,15 M NaCl, pH 8,5 в течение 2 часов при 37° С. После этого микропланшет промывали буфером для отмывки, высушивали на воздухе и хранили его при 4°C в присутствии осушителя.

А) непрямой твердофазный ФИАВР

Подготовленные лунки полистирольного микропланшета ("Labsystems", Финляндия) заполняли буфером 50 mM Трис-HCl, 0,15 M NaCl, 10 мкМ, ДТПА, 10 мкМ Са²⁺, pH 8,5 (здесь и далее - буфером для предынкубации) и инкубировали на шейкере 15 минут, далее отмывали буфером для отмывки (состав см. выше) 4 раза. Затем производили последовательные двойные разведения Т₄-Eu в лунках в буфере 50 mM Трис-HCl, содержащем 0,15 M NaCl, 0,02% тритон X-100, 0,15% СИТ, 0,015% АНС, 2 мг/мл салицилата натрия, 2 mM ЭДТА pH 8,5 (здесь и далее - буфер для анализа) и добавляли рабочую концентрацию мАт, инкубировали 1 час при комнатной температуре. Далее промывали лунки шесть раз буфером для отмывки, десорбировали европий в усиливающий раствор ("Wallac"), в течение 15 минут и измеряли флуоресцентный сигнал на флуоресцентном ридере DELFIA Plate Fluorometer 1232 (Wallac). На основании полученных данных строили кривую титрования и выбирали рабочую концентрацию Т₄-Eu.

Б) конкурентный твердофазный ФИАВР.

Лунки полистирольного микропланшета с адсорбированным РАМ в концентрации 5 мкг/мл заполняли буфером для предынкубации и инкубировали на шейкере 15 минут, далее отмывали буфером для отмывки 6 раз. Затем из приготовленных специальным образом сухих пятен крови с концентрациями Т₄ 0, 20, 50, 100, 150, 300 нМ (калибровочные пробы) выбивали по одному диску диаметром 3 мм в лунку. В каждую лунку наливали по 0,05 мл буфера для анализа, инкубировали 1 ч на шейкере при комнатной температуре, далее добавляли по 0,05 мл буфера для анализа с рабочей концентрацией мАт и Т₄-Eu 0, 75 мкг/мл и 0,5 нМ соответственно и инкубировали 1,5 часа при комнатной температуре. Далее удаляли диски и промывали лунки шесть раз буфером для отмывки, десорбировали европий в усиливающий раствор, который добавляли по 0,1 мл на лунку, и через 15 мин измеряли флуоресцентный сигнал на флуоресцентном ридере DELFIA Plate Fluorometer 1232 (Wallac). На основании серии измерений строили калибровочный график, определяли стандартные отклонения, рассчитывали коэффициенты вариации.

Для приготовления контрольных и калибровочных проб T_4 в сухих пятнах крови использовали отмытые эритроциты группы III Rh+. Отмытые эритроциты восстанавливали 6% раствором альбумина до гематокрита цельной крови (52%). По полученной после центрифугирования сыворотке устанавливали "нулевое" значение концентрации T_4 в крови, которое определяли по уровню флуоресцентного сигнала в конкурентном ФИАВР. В восстановленную таким образом кровь добавляли T_4 для получения конечной концентрации его в крови 300, 150, 100, 50, 20, 0 нМ и раскатывали на бумагу Shleifer&Schull 2992. После 16 ч высушивания при комнатной температуре и 40% влажности пятна крови герметично упаковывали в полиэтилен и хранили при -20°C .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Первоначальный отбор антителопродуцирующих клонов производился методом ИФА. Содержащиеся в культуральной жидкости мАт тестировали в параллели на связывание с T_4 -СИТ, адсорбированном на твердой фазе, и в конкурентном анализе с T_4 . Клоны мАт считали продуцирующими специфические антитела к T_4 , если наблюдали 4-5-кратные превышения положительного сигнала над фоном в первом случае и отсутствие положительного сигнала во втором случае. Процедуру повторяли после второго клонирования. Было отобрано 7 клонов. Физико-химические характеристики некоторых из них (класс/подкласс, константы связывания) представлены в табл. 1.

Определение классов/подклассов мАт проводили методом непрямого твердофазного ИФА с использованием кроличьих антисывороток к иммуноглобулинам мыши ("Bio-Rad", США). Проявляли козьей антисывороткой к иммуноглобулинам кролика, меченным пероксидазой хрена. Две гибридомы продуцировали IgG подклассов IgG2b; гибридом, продуцирующую IgM, обнаружено не было; гибридома 6E6E5 продуцировала моноклональные антитела наиболее распространенного и устойчивого подкласса IgG 1 (табл. 1).

Таблица 1. Основные характеристики моноклональных антител.

Название клона	класс/подкласс	Константа аффинности, M^{-1}
6E6E5	IgG1	10^8
7F3G12	IgG2b	$6 \cdot 10^8$
7F3G5	IgG2b	$4 \cdot 10^7$

Константы аффинности (табл. 1) определяли методом непрямого твердофазного ИФА [7]. Величина константы связывания определяет рабочую концентрацию мАт, при которой можно достичь максимальной чувствительности в определении аналита в конкурентном иммуноанализе. Необходимым критерием для ее выбора является то, что концентрация антител должна быть меньше значения константы диссоциации комплекса антиген-антитело ($mAt < 1/K_{af}$), так, исходя из значения константы диссоциации для мАт 6E6E5 - 10 нМ, рабочую концентрацию выбрали 5 нМ [8].

Кросс-реактивность оценивали методом непрямого конкурентного твердофазного ИФА по степени ингибирования взаимодействия мАт с T_4 -СИТ, адсорбированном на поверхности лунок полистирольного планшета, в присутствии гомологичных по структуре агентов. Перекрестная реактивность T_4 представлена как отношение концентраций T_4 и ингибитора, при котором на 50% ингибируется процесс связывания антител с иммобилизованным на полистироле конъюгатом T_4 -СИТ (табл. 2). Как видно из таблицы, антитела специфичны исключительно к гормону T_4 и не чувствительны к T_3 ; при физиологических концентрациях гормонов перекрестная реактивность на T_3 менее 1%, т.к. концентрация T_3 примерно в 4 раза ниже концентрации T_4 [1]. 100% чувствительность антител к D-тироксину можно объяснить тем, что у молекулы тироксина погружена в центр связывания антител только ароматическая часть с

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРОКСИНА

остатками йода и не погружен хиральный центр, относительное положение заместителей которого и определяет тип стереоизомера.

Таблица 2. Перекрестная реактивность Т 4 (на 50% связывания) в конкурентном ИФА.

Название клона МАТ	6E6E5	7F3G5	7F3G12
Перекрестный реагент			
L-тироксин	100%	100%	100%
D-тироксин	100%	100%	100%
3,3',5-трийодо- L-тиронин	1%	2%	2%
3,5- дийодо-L-тиронин	0%	0%	0%
3,5-дийодо-L-тирозин	0%	0%	0%
3-йодо-L-тирозин	0%	0%	0%
D-фенилгидантоин	0%	0%	0%

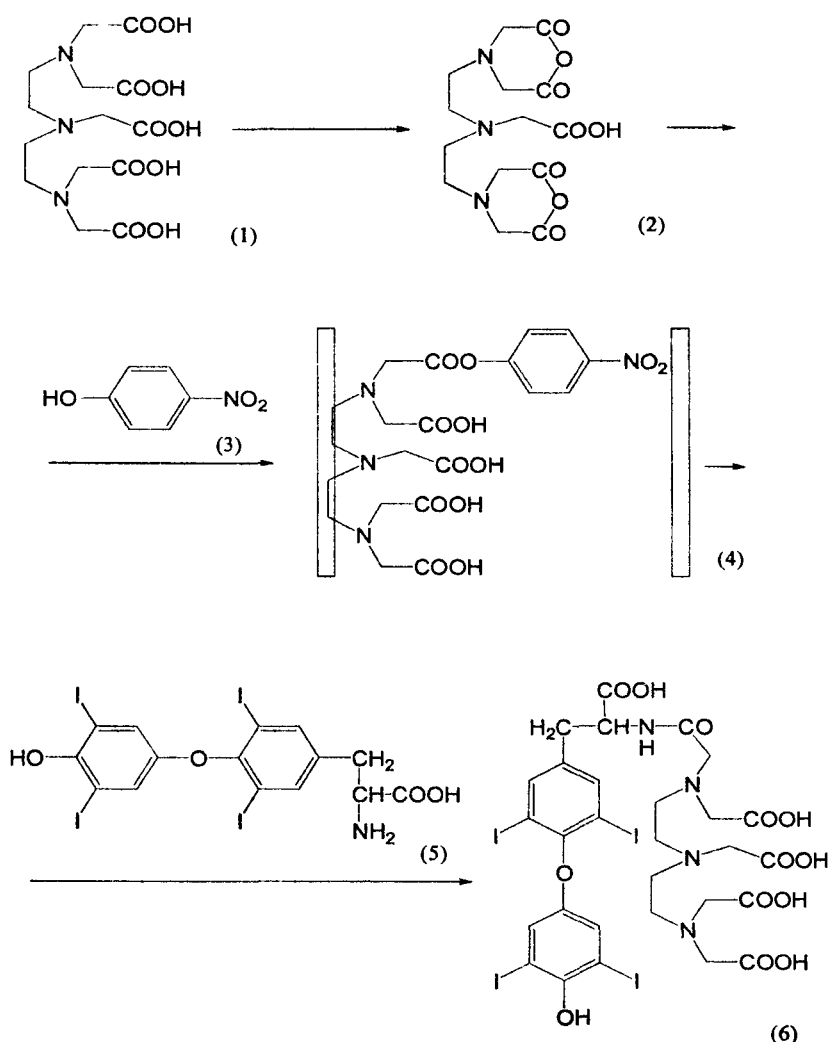


Рисунок 1.

Схема синтеза тироксина с диэтилентриаминпентауксусной кислотой.

Диангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (1) с уксусным ангидридом в пиридине. Паранитрофениловый эфир диэтилентриаминпентауксусной кислоты (4), который получали из диангидрида (2) и паранитрофенола (3), без выделения и очистки использовали непосредственно для ацилирования тироксин (5)

Для последующей оптимизации метода были выбраны моноклональные антитела 6Е6Е5 по таким показателям: а) стабильный и устойчивый рост гибридомы; б) неизменность иммунологической активности при длительном хранении. При хранении афинно очищенных антител при -20°C в течении 6 месяцев не наблюдалось падение титра для 6Е6Е5.

Выбор буферной системы для проведения анализа.

На основе 50 мМ трис, содержащего 0,15 М NaCl pH 8,5 были приготовлены буферы с добавлением разных компонентов, которые, как предполагалось, должны снять неспецифическую адсорбцию гидрофобной части тироксина и хелата в процессе проведения анализа. Нами ранее [9] был установлен состав буфера для ФИАВР с целью определения гормона тироксина: 50 мМ трис-HCl, 0,15 М NaCl, 0,02% тритон X-100, 0,15% СИТ, 0,01% АНС, pH 8,5. Стадия предынкубации с буфером, содержащим 10 мкМ ДТПА, 10 мкМ Ca^{2+} , введена для снижения фона [10]. Происходит связывание ионов тяжелых металлов, следовые количества которых влияют на проведение лантанидного анализа, и, одновременно, удаление следовых количеств лантанидов, которые содержатся в воде и солях, используемых для приготовления буферов.

Добавление 2мМ ЭДТА в буфер для хранения конъюгатов европия [11] стабилизирует активность некоторых из них. В наших экспериментах добавление 2 мМ ЭДТА в буфер для хранения и в буфер для анализа приводило к минимизации фонового сигнала до фона усиливающего раствора, а добавление салицилата натрия [12] в количестве 2 мг/мл вызывало увеличение динамического диапазона регистрации сигнала (рис. 2). Максимальное соотношение сигнал/фон наблюдалось при концентрации салицилата натрия 4 мг/мл. Это насыщающая концентрация, поэтому для буфера была выбрана концентрация салицилата 2 мг/мл.

Оптимизация иммунофлуоресцентного метода для анализа тироксина с использованием тироксина, меченого европием.

Концентрация антител должна быть сопоставима с концентрацией конъюгата так, чтобы в отсутствие определяемого тироксина он занимал не более половины центров связывания антител [8]. Для определения тироксина в данной схеме анализа была выбрана концентрация конъюгата Т 4-Еу 0,5 нМ, при которой при концентрации антител 0,75 мкг/мл диссоциация комплекса Ат-Т4-Еу происходит не более чем на 50%.

Калибровочная кривая для определения тироксина в сухих пятнах крови и профиль коэффициента вариации представлены на рис.3. Достоверный предел детекции тироксина в сухих пятнах крови составил 10 нМ ($n=8$), который определяли как среднее значение минус 2 стандартных отклонения ($\text{ПД}=\text{СР} \cdot 3\text{НАЧ.} - 2\text{СТ. ОТКЛ.}$) при коэффициенте вариации 15%. При проведении того же анализа исключительно в буферной системе с использованием Т4-стандартов, приготовленных на основе буфера для анализа, предел обнаружения Т4 составил 0,5 нМ, что соответствовало пределу детекции в сухих пятнах крови с учетом разбавления образцов в лунке. Таким образом, десорбция тироксина в разработанном нами буфере для анализа протекала практически на 100%.

О получении моноклональных антител к тироксину с высокими константами аффинности ($\text{Каф } 3 \cdot 10^9 \text{М}^{-1}$) сообщали ранее [13]. Предел детекции тироксина в сыворотке, определяемый в ИФА с помощью этих антител, составил 10 нг/мл (11нМ). Он соответствует пределу детекции тироксина в сухих пятнах крови в разработанном нами анализе, но с использованием антител с $\text{Каф } 10^9 \text{М}^{-1}$. Таким образом даже при использовании мАт с константой аффинности на порядок ниже, по сравнению с опубликованной, можно получить такой же предел детекции, что говорит о высокой чувствительности лантанидной метки.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРОКСИНА

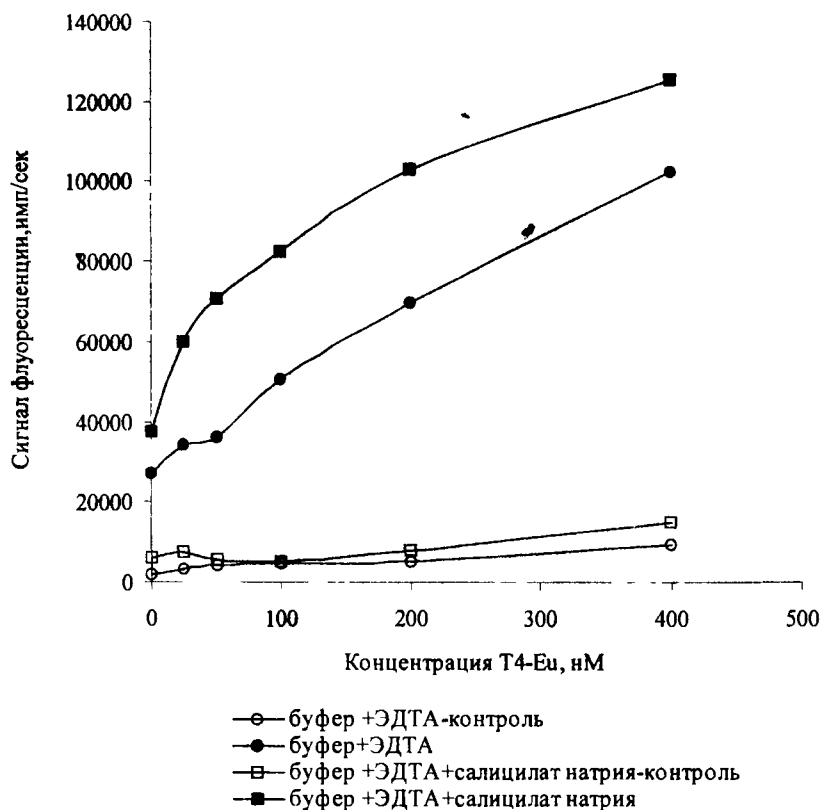


Рисунок 2.

Уровень специфического и неспецифического сигнала флуоресценции при десорбции Еу в усиливающий раствор ("Wallac") при добавлении 2 мМ ЭДТА и 2 мг/мл салицилата натрия в буфер следующего состава: 50 мМ трис-НСl, 0,15 М NaCl, 0,02% тритон X-100, 0,15% СИТ, 0,015% АНС, рН 8,5. На поверхности лунок микропланшета ("Labsystems") адсорбированы кроличьи антитела к иммуноглобулину мыши в концентрации 5 мкг/мл. В качестве контроля использованы микропланшеты не содержащие антивидовых антител, а неспецифические центры адсорбции блокированы 6% раствором маннита. МАт 6Е6Е5 и Т4-Еу добавлены в концентрациях 5 мкг/мл и 100 нМ соответственно.

Для проверки достоверности анализа в качестве неизвестных проб были взяты контрольные сыворотки (Уровень 1, Уровень 2, Уровень 3) набора межлабораторного контроля качества Lipocheck Immunoassay Plus Control Kit™ ("BioRad"). Сыворотки были предварительно нанесены на бумагу Shleier&Schull 2992 по той же схеме, что и калибровочные пробы. Значения концентраций Т₄ для метода DELFIA TR-FIA, указанные в описании к набору сывороток, и значения концентраций X1, X2, X3, рассчитанные по уравнению линии тренда калибровочной кривой, представлены в табл. 3. Определяемые концентрации попадали в доверительный интервал истинных концентраций. Это говорит о хорошей точности метода и применимости метода в клинике.

На основе полученных данных был разработан макет набора для определения общего тироксина в сухих пятнах крови. Макет набора включает:

- буфер для предынкубации (50 мМ трис-НСl, 0,15 М NaCl, 10 мкМ ДТПА 10 мкМ Са²⁺·10⁻⁵М, рН 8,5
- буфер для анализа (50 мМ трис, 150 мМ NaCl, 0,02% тритон X-100, 0,015% АНС, 0,15% СИТ, 2мМ ЭДТА, 2 мг/мл салицилата натрия, рН 8,5);
- концентрат для отмывки (50 мМ трис, 150 мМ NaCl, 0,02% тритон X-100, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4) (X25);

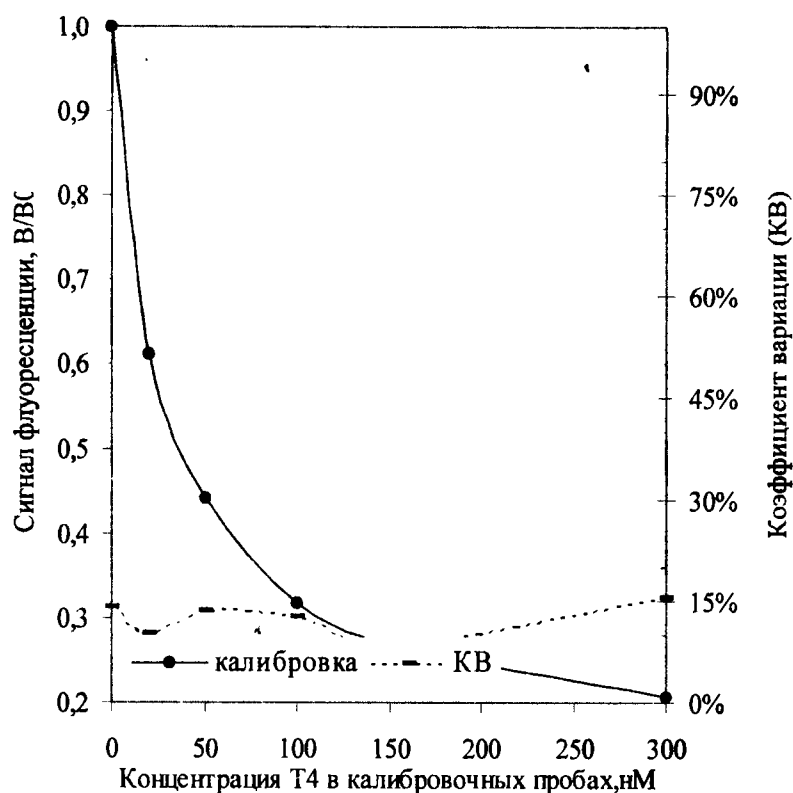


Рисунок 3.

Калибровочная кривая для определения Т4 в конкурентном анализе в сухих пятнах крови. В/В0 - отношение сигнала флуоресценции в присутствии определяемого аналита (Т4) к сигналу в отсутствие вышеуказанного. Рабочие концентрации Т4-Еu- 0,5 нМ, мАт 6Е5Е6 - 0,75 мкг/мл. На поверхности лунок микропланшета ("Labsystems") адсорбированы кроличьи антитела к иммуноглобулину мыши в концентрации 5 мкг/мл.

Таблица 3. Значения истинных концентраций Т4 в контрольных сыворотках (Уровень 1, Уровень 2, Уровень 3) набора межлабораторного контроля качества Lipocheck Immunoassay Plus Control Kit TM ("BioRad") и концентраций Т4 (X1, X2, X3), определенных методом DELFIA TR-FIA с использованием макета набора для определения тироксина в сухих пятнах крови.

№	Уровень 1 (X1)	Уровень 2 (X2)	Уровень 3 (X3)
Истинные концентрации и допустимый интервал	35 нМ 25-46 нМ	76 нМ 61-91 нМ	150 нМ 120-180 нМ
Определяемые концентрации	39±4 нМ	82±8нМ	170±17нМ

- усиливающий раствор (15 мкМ нафтоилтрифторацетон, 50мкМ триоктилфосфиноксид, 0,1% тритон X-100 в 0,1 М ацетатном буфере pH 3,2);
- концентрат раствора Т4-Еu (x100) (в буфере для анализа);
- концентрат раствора моноклональных антител к тироксину 6Е6Е5 (x100) (в буфере для анализа);
- калибровочные пробы (сухие пятна крови с калибровочными концентрациями тироксина 300, 150, 100, 50, 20, 0 нМ на бумаге S&S2992);
- микрострипы иммунологические 96-луночные ("Labsystems"), покрытые кроличьими антимышиными антителами.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРОКСИНА

Данный набор позволит производить измерения на считывающих устройствах типа DELFIA Plate Fluorometer 1232 ("Wallac") и его последующих модификаций. Построение калибровочной кривой по 3 повторам для каждой концентрации. Время проведения анализа образцов сухих пятен крови составляет 2-2,5ч. Отсутствие многоступенчатых инкубаций делают его удобным для массового использования.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Harland W. A., Orr I. S. (1975) Thyroid hormone metabolism, N. Y. Acad. Press, pp.335-345.
2. Папковский Д. Б., Стафеева О. А., Савицкий А. П. (1988) Пробл. эндокринол. 34, №1, 57-60.
3. Campbell A. M. (1991) Monoclonal antibody and molecular biology, Elsevier.
4. Pharmacia Fine Chemicals (1983) Affinity chromatography principles and methods, Sweden.
5. Hale G. (2000) In: Monoclonal Antibodies (Eds. P. Shepherd and C. Dean) Oxford Academic Press, pp. 158-160.
6. Paik C. H., Ebbert M. A., Murphy P. R., et al. (1983) J. Nucl. Med. 24, 1158-1163.
7. Friguet B., Djavadi-Ohanian L., and Goldberg M. E. (1989) Res. Immunol. 140, 355-376.
8. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. (1991) Теория и практика иммуноферментного анализа Москва, Высшая школа.
9. Савицкий А. П., Грибова Е. В., Чудинов А. В. (2000) Аллергия, астма и клиническая иммунология, 9, 151-153.
10. Пономарева И. В., Савицкий А. П., Шахнина К. Л., Щеголев А. А. (1989) Иммунология, 4, 76-78.
11. I. A. Hemmilla and H. J. Mikola (1990) Acta Radiologica Sup. 374, 53-55.
12. Fengbo Wu, Yongyuan Xu, Tao Hao et al. (1999) Approach. Analyt. Biochem. 276, 171-176.
13. Данилова Н. П., Крупина Н. В., Мерц М. В., Василов Р. Г. (1993) Биоорг. химия 19, 704-712.

Поступила 03.02.02

USING OF TIME-RESOLVED LANTHANIDE FLUOROIMMUNOASSAY FOR THYROXIN DETERMINATION IN DRIED BLOOD SPOTS.

V. V. Jerdeva¹, Chudinov A. V.², Savitsky A. P.¹

¹Bakh Institute of Biochemistry Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow Leninsky pr., 33;
tel/fax. (095)952-87-99/954-27-32, e-mail: vjerdeva@inbi.ras.ru

² Engelhardt Institute Molecular Biology of, Russian Academy of Sciences, Moscow

The determination of thyroxine (T₄) is a basic confirmative test for congenital hypothyroidism. 70% cases of this serious inborn disease are taking asymptomatic course. We developed immunofluorescent T₄-assay in dried blood spots with anti-T₄ monoclonal antibody and europium chelate (dianhydride of diethylenetriaminopentaacetic acid (DA-DTPA)). This method requires DELFIA Plate Fluorometer 1232 (Wallac, Finland) or its sub modifications.

Panel of monoclonal antibodies for T₄ has been obtained. Type/subtype (IgG2b, IgG1), affinity constants (10⁷ - 10⁸ M⁻¹), cross reactivity to homologous structures (0-2%) were determined. Stable clones with high affinity and viability were selected for the development of the assay.

Conjugates of thyroxine and europium chelate were synthesized. Inclusion of sodium salicylate (2 mg/ml) and EDTA (2mM) into the buffer reduced the nonspecific signal.

Limit for T₄ detection (T₄ standards) was 10 nM with not more than 15% variation coefficient. Accuracy was estimated by Bio-Rad Lipocheck Immunoassay Plus Control Kit™. Obtained results were within control confidence interval.

Key words: lanthanide fluorescent immunoassay, dianhydride of diethylenetriaminopentaacetic acid (DA-DTPA), thyroxine, monoclonal antibodies, dried blood spots, neonatal screening