

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕАКЦИИ ЛАТЕКСНОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ

**А.В. Санджиева^{1, @}, студент, А.В. Бахтина¹, аспирант, А.А. Сиваев¹,
аспирант, Л.Ю. Басырева², старший научный сотрудник, С.А. Гусев²,
заведующий лабораторией, И.А. Грицкова¹, профессор**

¹Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий),
Москва, 119571 Россия

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России,
Москва, 119435 Россия

@ Автор для переписки, e-mail: Anastasia215965@yandex.ru

Статья посвящена описанию и обсуждению исследований по созданию новых диагностических тест-систем, работающих на основе реакции латексной агглютинации. Диагностические тест-системы, где в качестве носителя биолиганда (Vi-антигена) использовались модифицированные декстраном полимерные микросферы, характеризовались недостаточной специфичностью и нуждались в дополнительном модифицировании поверхности микросфер для исключения ее неспецифического взаимодействия с поверхностью полимерных планшет, в которых проводится реакция латексной агглютинации. Показано, что модифицирование поверхности полимерных частиц неионным ПАВ (Твин-80), взятым в определенной концентрации, обеспечивает повышение специфичности реакции.

Ключевые слова: полимерные микросферы, латексная агглютинация, Твин 80, Vi-антиген, диагностические тест-системы.

WAYS OF IMPROVING THE SPECIFICITY OF THE LATEX AGGLUTINATION REACTION

**A.V. Sandzhieva^{1, @}, A.V. Bakhtina¹, A.A. Sivaev¹, L.Yu. Basyreva², S.A. Gusev²,
I.A. Gritskova¹**

¹Moscow Technological University (Institute of Fine Chemical Technologies),
Moscow, 119571 Russia

²Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, FMBA of Russia,
Moscow, 119435, Russia

@ Corresponding author e-mail: Anastasia215965@yandex.ru

The article describes research on the development of new diagnostic test systems operating on the basis of latex agglutination reaction, in which polymer microspheres are used as bioligand carriers instead of erythrocytes. Polymeric microspheres to be used as bioligand carriers must satisfy the following requirements: narrow size distribution, diameter of 5 microns. Besides, they must be characterized by aggregative stability in water and buffer solutions and be contained functional groups in the surface layer for linking with the functional groups of the protein. They are crosslinked particles obtained by copolymerization of styrene and divinylbenzene on polystyrene seed particles 1.5 microns in diameter with a narrow size distribution followed by modification by chloromethylation and amination by ethylenediamine. To increase the hydrophilicity of the surface of the polymer microspheres and to reduce nonspecific adsorption of proteins dextran was immobilized on the surface of the particles by covalent binding with amino groups of particles using Maillard reaction. It was found that diagnostic test systems, where modified dextran particles were used as carriers of the bioligand (Vi-antigen), are characterized by insufficient specificity

and require additional modification of the surface of the polymer microspheres to eliminate its non-specific interaction with the surface of the polymer plate used for the latex agglutination reaction. A nonionic surfactant (Tween 80) proposed for the surface modification and used in a certain concentration provides the best reaction specificity.

Keywords: polymer microspheres, latex agglutination, Tween 80, Vi-antigen, diagnostic test-systems.

Введение

Полимерные микросферы с узким распределением частиц по размерам и функциональными группами на поверхности представляют большой интерес для биологии и медицины, в частности, для использования в качестве носителей биолигандов вместо эритроцитов при создании диагностических тест-систем на различные виды заболеваний [1, 2].

Для замены эритроцитов на полимерные микросферы им необходимо обеспечить определенные свойства, о чем будет сказано ниже.

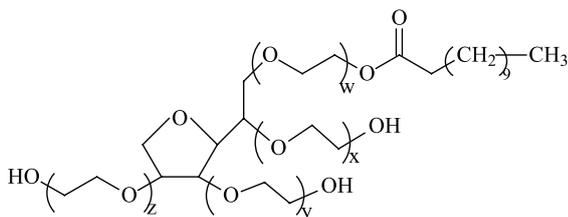
При создании диагностических тест-систем проблемой остается обеспечение высокой специфичности отрицательного контроля реакции латексной агглютинации.

Настоящая работа посвящена разработке простого, легко воспроизводимого метода проведения реакции латексной агглютинации, позволяющего с помощью визуальной регистрации результатов реакции определить пути увеличения специфичности отрицательного контроля.

Экспериментальная часть

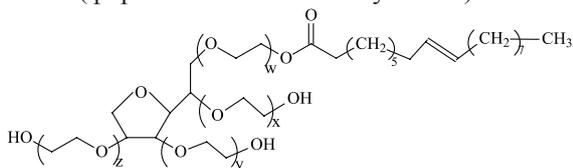
Исходные вещества:

- 1) Полистирольные хлорметиловые аминированные частицы с диаметром 5 мкм.
- 2) Tween 20 – полиоксиэтилен (20) сорбитан-монолаурат (фирма «Ferak» laboratory Berlin)



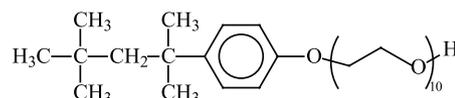
$w+y+z=20$; ММ = 1226; ГЛБ = 16.7; ККМ = 0.055 ммоль/л; агрегационное число 50–100.

- 3) Tween 80 – полиоксиэтилен (20) сорбитан-моноолеат (фирма «Ferak» laboratory Berlin)



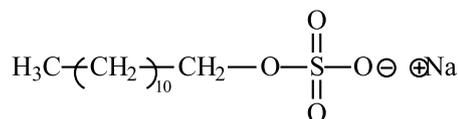
$w+y+z=20$; ММ = 1308; ГЛБ = 15; ККМ = 0.013 ммоль/л; агрегационное число 50–100.

- 4) Тритон X-100 – моно(тетраметилбутанол) фениловый эфир полиэтиленгликоля (фирма «Ferak» laboratory Berlin)



ММ = 646; ГЛБ = 13.5; ККМ = 0.25 ммоль/л; агрегационное число 100–150.

- 5) SDS – додецилсульфат натрия (фирма «Sigma-Aldrich»)



ММ = 289; ГЛБ = 40; ККМ = 8.3 ммоль/л; агрегационное число 55–62.

- 6) Фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7.4 (фирма «Sigma-Aldrich»).

Получение диагностической тест-системы

Для получения диагностических тест-систем были синтезированы полистирольные частицы, содержащие аминогруппы на поверхности, со средним диаметром $d_{cp} = 5$ мкм, узким распределением по размерам. Частицы были получены затравочной сополимеризацией стирола и дивинилбензола (4%) на затравочных полистирольных частицах диаметром 1.5 мкм. Затем частицы хлорметиловали монохлордиметилэтилендиамином.

Для увеличения гидрофильности поверхности полимерных микросфер и снижения уровня неспецифической сорбции белков на поверхность частиц иммобилизовали декстран (ММ = 60 000) путем его ковалентного связывания с аминогруппами частиц (с помощью реакции Майяра). После этого на полученную поверхность иммобилизовали Vi-антиген.

Микрофотографии полистирольных частиц

Микрофотографии полистирольных частиц были получены на электронном сканирующем микроскопе «S-570» фирмы «НИТАСНІ» (Япония), при ускоряющем напряжении 15 кВ. Подготовка образцов производилась путем нанесения водной суспензии

зии частиц с концентрацией 0.1% мас. на металлический столик, сушки образцов в течение суток и нанесения платино-паладиевого слоя толщиной 100Å на приборе «Eiko IB-3» (Япония).

Определение размеров частиц

Размер частиц оценивали методом динамического светорассеяния. Для этого готовили 0.1% мас. водную суспензию полимерных частиц, которую исследовали на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS фирмы «Malvern» (Великобритания) по методике производителя.

Определение размеров частиц полимерных суспензий методом световой микроскопии

Для построения диаграммы распределения частиц по размерам использовали фотографии полимерной суспензии, полученные на световом микроскопе Motic B Series, оснащенный цветной видеокамерой KY-F32. Для этого на предметное стекло микроскопа нанесли 0.1% суспензию частиц. Обсчет полученных фотографий проводили в программе «ImagePro-Plus 6.0». Статистическую обработку данных по размеру частиц проводили в программе «Microsoft Excel».

Постановка реакции агглютинации

Постановку реакции агглютинации осуществляли в лунках полистирольного планшета. Для проведения агглютинации в лунках планшета проводили последовательное двухкратное разведение антисыворотки к Vi-антигену, последняя лунка в ряду заполнялась фосфатно-солевым буфером и рассматривалась в качестве отрицательного контроля. Затем в каждую лунку добавляли диагностикум. Учет титра реакции проводили по последнему разведению сыворотки, при котором интенсивность реакции агглютинации составляла не менее 3+++ . Кроме того, чувствительность диагностикума изучали в среде фосфатно-солевого буфера в присутствии ПАВ различной концентрации.

Постановка и учет результатов контроля в лунках планшета

Постановку контроля проводили в U-образных лунках полистирольного планшета в отсутствие и в присутствии ПАВ, путем ресуспендирования диагностической тест-системы в водном растворе ПАВ. Учет результатов проводился с помощью планшетного сканера «Mustek 12000 SP Plus» и программы ABBYY Fine Reader

Определение количества агрегатов в суспензии до и после добавления детергента

Количество агрегатов в суспензии исследовали методом световой микроскопии в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) до и после добавления детергента.

Для этого 20 мкл 0.2% суспензии частиц в PBS смешивали с 50 мкл раствора ПАВ в PBS при определенной концентрации ПАВ. Затем полимерные суспензии выдерживали в течение 30 и 70 мин и, доводя концентрацию частиц до 0.022%, помещали в камеру и фотографировали с помощью светового микроскопа «Motic B Series» фирмы «COIC» (Китай), оснащенного цветной видеокамерой KY-F32. Анализ полученных изображений проводили визуально, подсчитывая число агрегатов.

Фотографии лунок планшета

Фотографии были получены с помощью светового микроскопа (МБС-9), оснащенного цветной видеокамерой KY-F32.

Результаты и их обсуждение

Одним из перспективных методов диагностики является метод, основанный на реакции агглютинации полимерных микросфер, содержащих на поверхности функциональные группы, ковалентно связанные с функциональными группами биолганда (антигена или антитела). Преимущества данного метода заключаются в отсутствии измерительной аппаратуры, быстром получении результатов, простоте постановки реакции, отсутствии опасных для человека излучений и реактивов, возможности длительного хранения диагностикума.

В настоящее время для создания диагностикумов в качестве носителя биолгандов используются эритроциты. Однако эритроцитарные диагностикумы имеют ряд недостатков:

- эритроциты получают из крови животных, содержание которых трудоемко и дорогостояще;
- эритроциты содержат много собственных антигенных детерминант, которые могут реагировать с компонентами сывороток человека и животных, что может обуславливать протекание неспецифических реакций и приводить к ложноположительным результатам;
- свойства эритроцитов часто зависят от источника и способа их выделения, а также сроков хранения, что затрудняет стандартизацию получаемых диагностикумов.

Устранить эти недостатки возможно заменой эритроцитов на полимерные микросферы, свойства которых должны соответствовать следующим требованиям: скорость седиментации 3–8 мм/ч, диаметр частиц порядка 5 мкм, узкое распределение по размерам, агрегативная устойчивость в электролитах в широком интервале pH, воспроизводимые свойства и характеристики, наличие в поверхностном слое функциональных групп, доступных для ковалентного связывания с функциональными группами биологических макромолекул без значительного изменения их функциональной активности.

Полимерные микросферы с такими свойствами были получены путем заправочной сополимеризации стирола с дивинилбензолом с последующей их модификацией, обеспечивающей высокую концентрацию аминогрупп на поверхности, и использованы для получения диагностикума на антитела к Vi-антигену (для определения заболевания брюшным тифом) (рис. 1, 2).



Рис. 1. Микрофотография хлорметилированных аминированных полистирольных частиц.

Созданный диагностикум на антитела к Vi-антигену обладал чувствительностью, сравнимой с чувствительностью диагностикума на основе эритроцитов, которая составляет 1:640 (рис. 3).

Оказалось, что полученная диагностическая тест-система имела отрицательный контроль в виде «пуговки» с размытыми границами («ореол»), что затрудняет чтение результатов и дает ложное представление о чувствительности тест-системы (рис. 4А). Было предположено, что частицы диагностической тест-системы обладают высокой адгезией к поверхности полистирольной плашки, в которой проводится реакция латексной агглютинации, из-за высокой гидрофобности их поверхности.

Для решения данной проблемы было предложено модифицировать поверхность полимерных частиц ПАВ различной природы. Для простой и эффективной регистрации эффекта действия ПАВ были найдены условия, при которых диагностическая тест-система при проведении отрицательного контроля первоначально не образует «пуговку», но формирует только «ореол» на стенке лунки (рис. 4Б). В этих условиях была определена минимальная концентрация ПАВ, при которой происходит формирование «пуговки» (рис. 4В). Также была определена концентрация частиц, при которой не образуется «пуговка», но формируется «ореол» на стенке лунки (рис. 5) – она составила 0.055% мас.

Для модификации поверхности частиц ПАВ были выбраны додецилсульфат натрия, Твин 20 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонолаурат) и Твин 80 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат), а также Тритон X-100 (моно(тетраметилбутанол)фениловый эфир полиэтиленгликоля), которые широко исполь-



Рис. 2. Распределение по размерам хлорметилированных аминированных полистирольных частиц.

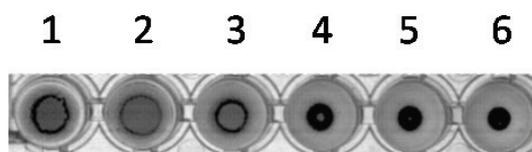


Рис. 3. Результаты определения чувствительности диагностикума брюшного тифа, разведение сыворотки: 1 – 1:160; 2 – 1:320; 3 – 1:640; 4 – 1:1280; 5 – 1:2560; 6 – контроль.

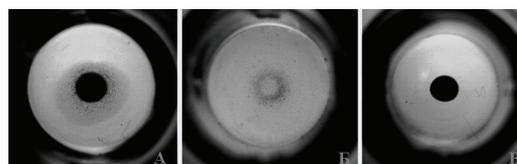


Рис. 4. Фотографии контролей, полученные методом световой микроскопии:
 А – контроль с размытыми границами («ореолом»);
 Б – контроль с «ореолом» и без «пуговки»;
 В – контроль в присутствии ПАВ Твин-80.

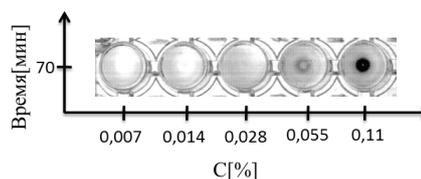


Рис. 5. Результаты постановки отрицательного контроля при разных концентрациях частиц.

зуются в биотехнологии [4, 5].

Результаты исследования показали, что в присутствии додецилсульфата натрия во всех исследованных концентрациях улучшения отрицательного контроля не происходит (в ряду г (рис. 6) наблюдается полное отсутствие образования «пуговки»). При

добавлении Твина 20 и Твина 80, а также Тритона Х-100 происходит образование «пуговики» с четкими краями, причем улучшение контроля в присутствии Тритона Х-100 происходит при более высоких концентрациях, чем в присутствии Твина 80 и Твина 20

(рис. 6). Наилучшие результаты были получены при модифицировании поверхности полимерных частиц Твином 80 (образование «пуговики» происходит при меньших концентрациях, чем в среде с Твином 20), поэтому для определения влияния ПАВ на чувстви-



Рис. 6. Результаты постановки отрицательного контроля с концентрацией частиц 0.055% мас. в присутствии различных ПАВ (в каждой следующей лунке, начиная с 9-ой и до 1-ой, концентрация ПАВ снижается в 2 раза): а – Тритон Х-100; б – Твин 80; в – Твин 20; г – SDS (диапазон концентраций $(0.78-200) \cdot 10^{-5}$ моль/л для а, б, в, $(0.013-3.46) \cdot 10^{-3}$ моль/л для г).

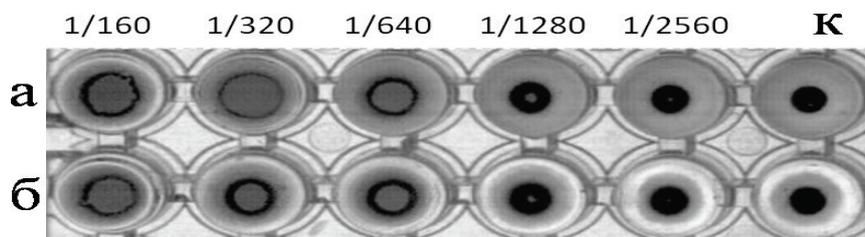


Рис. 7. Результаты протекания реакции агглютинации Vi-антигенного диагностикума с антисывороткой в отсутствие (а) и в присутствии (б) Твина 80 ($6.25 \cdot 10^{-5}$ моль/л).

тельность реакции агглютинации были проведены исследования в отсутствие и в присутствии Твина 80, взятого в концентрации $6.25 \cdot 10^{-5}$ моль/л (рис. 7).

Из приведенных данных видно, что в ряду а в контроле (К) наблюдается четкая черная точка на сером фоне. После добавления Твина 80 (ряд б) в контроле наблюдается существенное уменьшение размеров серого фона, что свидетельствует об улучшении отрицательного контроля реакции. Причем реакция агглютинации в обоих случаях наблюдается при разведении сыворотки 1/640, что указывает на отсутствие влияния Твина 80 на чувствительность реакции.

Согласно литературным данным, при модификации поверхности частиц, покрытых белком, Твином 80 происходит агрегация частиц. Для проверки этих данных были проведены эксперименты по определению агрегативной устойчивости частиц диагностикума в присутствии Твина 80 в среде. Методом световой микроскопии было показано, что в присутствии Твина 80 в выбранной для исследования концентрации доля неагрегированных частиц менялась незначительно (рис. 8).

Полученные данные позволяют рекомендовать для модификации поверхности полимерных частиц Твин 80 и другие неионные ПАВ, положительно влияющие на устойчивость полимерных частиц.

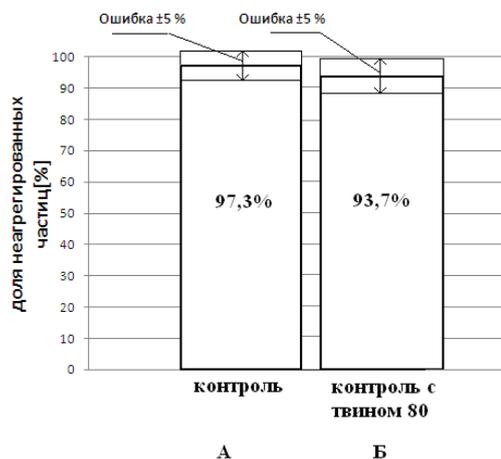


Рис. 8. Агрегативная устойчивость полимерных частиц диагностикума в отсутствие (А) и в присутствии (Б) Твина 80.

Выводы

Для создания диагностической тест-системы на антитела к Vi-антигену с использованием вместо эритроцитов полимерных микросфер необходимо:

- использовать модифицированные полистирольные микросферы с диаметром порядка 5 мкм, узким

распределением частиц по размеру, агрегативно устойчивые в электролитах в широком интервале рН, с высоким содержанием аминогрупп на поверхности;

- модифицировать поверхность полимерных микросфер путем ковалентного связывания декстрана с аминогруппами, расположенными на их поверхности;
- увеличить гидрофильность поверхности полимерных микросфер путем адсорбции ПАВ, в качестве которого рекомендован Твин 80.

Список литературы:

1. Чадаев П.Н. Полимерные микросферы в качестве антистатических компонентов защитных сло-

ев фотографических материалов: дис. . . . канд. хим. наук. М.: МИТХТ, 2011. 111 с.

2. Волкова Е.В., Грицкова И.А., Гусев С.А., Лукашевич А.Д., Гусев А.А., Левшенко Е.Н., Злыднева Л.А., Сочилина К.О. // Биотехнология. 2012. № 4. С. 74–77.

3. Волкова Е.В. Создание диагностических тест-систем с использованием полимерных микросфер: дис. . . . канд. хим. наук. М.: МИТХТ, 2012. 100 с.

4. Chou D.K., Krishnamurthy R., Randolph T.W., Carpenter J.F., Cornell M. // J. Pharm. Sci. 2005. V. 94. Iss. 6. P. 1368–1381. DOI 10.1002/jps.20365.

5. Задымова Н.М., Ямпольская Г.П., Филатова Л.Ю. // Коллоидный журн. 2006. № 2. С. 187–197.