



МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 57.083.5

ДВУСАЙТНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧЕСКОГО α_2 -ГЛОБУЛИНА МОЗГА НА ОСНОВЕ КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

ЧЕХОНИН В. П., ЩЕРБАКОВ В. М., МОРОЗОВ Г. В., МОРКОВКИН В. М.
ВНИИ общей и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, Москва

Разработан колоночный вариант двусайтного иммуноферментного метода для определения α_2 -глобулина мозга (α_2 -ГМ) человека.

Оптимальную работу системы наблюдали при использовании конъюгата $F(ab)_2$ фрагментов антител к α_2 -ГМ с β -D-галактозидазой в количестве 130 Ед/л, а $F(ab)$ фрагментов антител с иммуноглобулином IgG кролика—в концентрации 40 мкг/мл.

Этот метод был использован для исследования проницаемости ГЭБ больных, находящихся в критическом состоянии, обусловленном психическими расстройствами.

Иммунохимическое изучение специфических антигенов мозга позволило ввести в лечебную практику способы дифференциальной диагностики и контроля за эффективностью лечения психических [1], неврологических [2], а также некоторых онкологических заболеваний [4, 5]. Среди иммунохимических методов центральное место в последние годы заняли иммуноферментный и радиоиммунный, каждый из которых имеет несколько вариантов и модификаций [3, 8], обладающих различными уровнями чувствительности.

В настоящей работе описан колоночный вариант двусайтного иммуноферментного метода [11] для определения специфического α_2 -ГМ [1], принцип которого представлен на рис. 1.

Антисыворотки к α_2 -ГМ получали иммунизацией овец очищенными препаратами этого антигена [1]. Антитела выделяли из моноспецифических антисывороток с помощью специфических иммуносорбентов на основе CNBr-сефарозы 4В и препарата α_2 -ГМ [10]. $F(ab)_2$ фрагменты антител к α_2 -ГМ выделяли обработкой антител пепсином [6], восстанавливали 2 меркаптоэтиламиноом и конъюгировали с β -D-галактозидазой (ЕС 32.1.23 из E. Coli, «Boeringer», ФРГ) при помощи N—N-о-фенилендималенисеимида («Sigma», США). $F(ab)$ фрагменты антител к α_2 -ГМ получали при обработке $F(ab)_2$ фрагментов 2-меркаптоэтиламиноом [6].

Конъюаты $F(ab)$ фрагментов антител к α_2 -ГМ с IgG кролика.

10 мг препарата IgG кролика, выделенного высаливанием сульфатом аммония диализом и хроматографией на ДЭАЭ-52 целлюлозе («Whatman», Англия) [7], смешивали с 30 мг $F(ab)$ фрагментов антител овцы к α_2 -ГМ и к смеси прибавляли 15 мг 1-циклогексил-3-(2-морфолинэтил) карбодинимид мето-4-толуолсульфоната («Serva», ФРГ), встряхивали в течение 12 ч и насливали на колонку с сефадексом G-200 («Pharmacia», Швеция), уравновешенную 0,1 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,4. При гель-хроматографии отбирали белковую фракцию с M_r 210 кД—иммунохимически именно она содержала конъюат $F(ab)$ —IgG кролика.

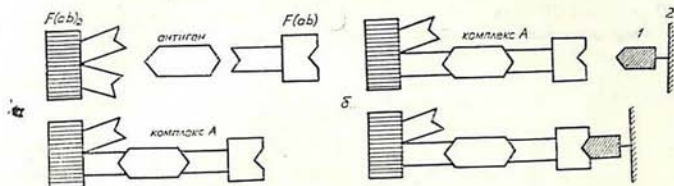


Рис. 1. Принципиальная схема двусайтного иммуферментного анализа. а—двусайтное образование антиген-антительного комплекса (комплекс А): с одной стороны, за счет взаимодействия с антигеном конъюата $F(ab)_2$ фрагментов овечьих антител с ферментом, а с другой—конъюат $F(ab)$ фрагментов овечьих антител с IgG кролика; б—иммунохимическое взаимодействие комплекса А с антителами осла к IgG кролика (1), иммобилизованными на твердой фазе (2)

Иммобилизация анти IgG антител на CNBr сефарозе 4В.

Антитела осла к IgG кролика получали на иммуносорбенте из соответствующей антисыворотки («Boeingerwerke», ФРГ). Для иммобилизации смешивали 50 мг антител осла в 10 мл 0,1 М карбонатного буфера pH 9,0 с 10 мл CNBr-сефарозы 4В («Pharmacia», Швеция) и инкубировали на роторной мешалке в течение 12 ч при 4°. Блокаду активных групп CNBr-сефарозы проводили путем 2-часовой инкубации геля в 1 М растворе глицина. Иммуносорбент с иммобилизованными антителами уравновешивали 0,1 М трис-HCl буфером, pH 8,0.

Стандартные сыворотки. Высокоочищенный препарат α_2 -ГМ разводили в сливной сыворотке крови человека с учетом ее свободного пассажа через колонку с иммобилизованными антителами.

Процедура иммуноопределения. 50 μ л стандартной сыворотки, содержащей α_2 -ГМ различной концентрации или исследуемого образца биологической жидкости, смешивали с 500 μ л конъюата антител к α_2 -ГМ с β -D-галактозидазой в рабочем буфере (0,1 М натрий-фосфатный буфер, содержащий 0,3 М хлорида натрия; 1 мМ хлорида марганца; 1 г бычьей

го сывороточного альбумина фирмы «Sigma», США: 1 г азид натрия, рН 7,4). Смесь инкубировали в течение 10 мин при 30°, после чего к ней прибавляли 100 μ л конъюгата овечьих F(ab) фрагментов антител к α_2 -ГМ с кроличьим IgG (40 мкг/мл в рабочем буфере) и инкубировали 30 мин при 30°.

500 μ л полученной смеси наслаивали на колонку (4 \times 8 мм, воронкообразной верхушкой) при скорости протока 1 мл/мин, наполненную 0,1 мл CNBr сефарозы 4B, с иммобилизованными антителами осла к IgG кролика и уравновешенную рабочим буфером. После этого колонку дважды промывали натрий-фосфатным буфером 0,1 М, рН 7,4 (рабочим буфером) и наслаивали на нее 0,25 мл о-нитрофенил β -D-галактозида (8,3 мМ), растворенного в рабочем буфере, и задерживали проток на 60 мин при 30° для полноценного протекания ферментной реакции. Тормозили протекающую реакцию промывкой колонки 1 мл 80 мМ карбоната лития.

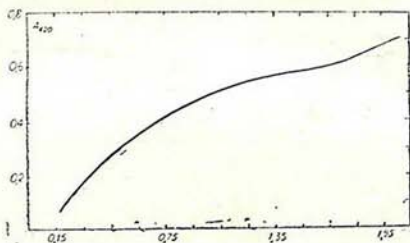


Рис. 2. Типичная стандартная калибровочная кривая для α_2 -ГМ. По оси абсцисс—концентрация α_2 -ГМ в нг/мл, по оси ординат—абсорбция при 420 нм

Абсорбцию элюата измеряли при 420 нм на спектрофотометре («Hitachi», Япония); в контрольную кювету добавляли о-нитрофенол.

Разработанный метод определения α_2 -ГМ позволил выявить антиген в интервале концентраций от 0,150 до 250,0 нг/мл. Типичная стандартная кривая для определения α_2 -ГМ, построенная на основании данных 25 экспериментов, показана на рис. 2. Статистический анализ среднего квадратичного отклонения точек, которое не превышает 1,0%, позволяет судить о надежности и хорошей воспроизводимости в работе описанной системы. Оптимальную работу системы наблюдали при использовании и конъюгатов F(ab)₂ фрагментов антител к α_2 -ГМ с ферментом в концентрации 140 ед./л, а конъюгата F(ab) фрагмента антител к α_2 -ГМ и IgG кролика—в концентрации 40 мкг/мл. Минимально обнаруживаемое количество α_2 -ГМ было равно 150 ± 8 нг/мл. Для сравнения необходимо сказать, что с помощью «сендвич» варианта ELISA [9] нам удалось определить количество α_2 -ГМ, равное 800 пкг/мл.

Разработанная система была применена нами для иммунохимического поиска специфического α_2 -ГМ в сыворотке крови здоровых доноров (32 мужчины и 28 женщин), а также больных, находящихся в критическом состоянии, обусловленном соматическими (панкреатит, перитонит), а также психическими (фебрильная шизофрения, острая алкогольная энцефалопатия, тяжелая нейролепсия) заболеваниями. Результаты иммуноферментного определения α_2 М в сыворотке крови психически больных представлены в таблице. При иммуноферментном исследовании сыворотки крови доноров изучаемый антиген не был обнаружен.

Таблица

Результаты иммуноферментного изучения α_2 -ГМ в сыворотке крови больных, находящихся в критическом состоянии, обусловленном психическими и соматическими заболеваниями

Критические состояния, обусловленные:	Количество больных	Количество исследованных больных, содержащих в сыворотке крови α_2 -ГМ (нг/мл)					
		0,150—0,300	0,300—0,600	0,600—1,200	1,200—2,400	2,400—4,800	4,800—9,600
фебрильной шизофренией,	46	10	5	2	1	2	1
острой алкогольной энцефалопатией,	48	7	4	1	1	1	—
тяжелой нейролепсией,	47	12	4	1	—	—	—
острым панкреатитом,	23	—	—	—	—	—	—
перитонитом	30	—	—	—	—	—	—

Анализируя данные таблицы, можно отметить факт появления α_2 -ГМ в сыворотке крови больных, находящихся в критическом состоянии, обусловленном психическими расстройствами. Этот антиген обнаруживается в сыворотке крови больных фебрильной шизофренией (45% больных), острой алкогольной энцефалопатией (30% больных) и тяжелой нейролепсией (40% больных) в интервале концентраций от 9,6 до 0,15 нг/мл.

Для сравнения необходимо отметить, что обычный «сендвич» вариант [9] иммуноферментного анализа не обнаруживал появления низких концентраций α_2 -ГМ в сыворотке крови и не позволял маркировать подобные состояния.

Таким образом, применение относительно простого, легко воспроизводимого метода определения высокомолекулярных соединений (антигенов и антител), каким является двусайтный иммуноферментный анализ на основе колоночной хроматографии, в практике критических состояний, обусловленных психическими расстройствами, не только позволяет осуществлять объективный контроль за проницаемостью ГЭБ, но, по-видимому, может открыть широкие перспективы в диагностике и наблюдении за эффективностью лечения подобных состояний.

DOUBLE-SITE IMMUNOENZYME ASSAY OF BRAIN SPECIFIC α -2-GLOBULIN ON THE BASIS OF THE COLUMN CHROMATOGRAPHY

CHEKHONIN V. P., SHCHERBAKOV V. M., MOROZOV G. V.,
MORKOVKIN V. M.

V. P. Serbky All-Union Scientific Research Institute of General
and Forensic Psychiatry

The column version of double-site immunoenzyme assay for the determination of human brain α -2-globulin has been developed. The optimal functioning of the system has been observed when conjugates of $F(ab)_2$ fragments of antibodies to α_2M and β -D-galactosidase (130 U/l), as well as conjugates of antibody $F(ab)$ fragments and rabbit immunoglobulin IgG (40 μ g/ml) were used.

This method was applied for the investigation of hemato-encephalic barrier permeability in patients being in critical state caused by mental disorders.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов Г. В., Морковкин В. М., Чехонин В. П., Кскалдас Э. И.—В кн.: Проблемы неотложной психиатрии, М., с. 110—112, 1985.
2. Морковкин В. М., Чехонин В. П., Каменных А. Н. Журн. невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова, № 10, с. 1474—1476, 1986.
3. Chard T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1985.
4. Delpech B., Delpech A., Vigard N. N. Brit. J. Cancer, v. 37, p. 33, 1978.
5. Dittman L., Axelsen, N., Norgaard-Pedersen B. Brit. J. Cancer, v. 35, p. 135, 1977.
6. Kato K., Fukui H., Hamaguchi Y., Ishikawa E. Immunology, v. 116, p. 1554, 1976.
7. Kato K., Umeda Y., Suzuki F., Hayashj D., Kasaka A. J. Appl. Biochem., v. 1, p. 479, 1979.
8. Tijssen P. Practice and Theory of Enzyme immunoassays, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1985.
9. Voller A., Bidwell D. E. Bull. Wed Heth. Org., v. 53, p. 55, 1976.
10. Weir D. Handbook of Experimental Immunology, Oxford, 1978.
11. Yamamoto R., Kimura S., Matsuura A., Fukuda Y., Hayakawa T., Kato K. J. Immunologic. Methods, v. 87, p. 197—201, 1986.

Поступила 12. XII 1987