

28. Mehta P.K., Kalra M., Khuller G.K. et al. Development of an ultrasensitive polymerase chain reaction-amplified immunoassay based on mycobacterial RD antigens: implications for the serodiagnosis of tuberculosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, 72:166-174.
29. Mehta P.K., Raj A., Singh N. et al. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012, 66: 20-36.
30. Monjezi R., Tan S.W., Tey B.T. et al. Detection of hepatitis B virus core antigen by phage display mediated TaqMan real-time immuno-PCR. *J. Virol. Methods.* 2013, 187:121-126.
31. Morin I., Askin S.P., Schaeffer P.M. IgG-detection devices for the Tus-Ter-lock immuno-PCR diagnostic platform. *J. Analyst.* 2011, 136:4815-4821.
32. Niemeyer C.M., Adler M., Wacker R. Detecting antigens by quantitative immuno-PCR. *Nat. Protoc.* 2007, 2:1918-1930.
33. Niemeyer C.M., Adler M., Pignataro B. et al. Selfassembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27:4553-4561.
34. Perez J.W., Vargis E.A., Russ P.K. et al. Detection of respiratory syncytial virus using nanoparticle amplified immuno-polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 2011, 410:141-148.
35. Rajkovic A., Moualij B., Uyttendaele M. et al. Immunoquantitative real-time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72:6593-6599.
36. Ryazantsev D.Y., Petrova E.E., Kalinina N.A., Valyakina T.I., Grishin E.V., Zavriev S.K. Application of supramolecular DNA streptavidin complexes for ultrasensitive detection of several toxins by immuno-PCR. *Global J. Analytical Chemistry.* 2012, 3:e17.
37. Tian P., Mandrell R. Detection of norovirus capsid proteins in faecal and food samples by a real time immuno-PCR method. *J. Appl. Microbiol.* 2006, 100:564-574.
38. Wu H.C., Huang Y.L., Lai S.C. et al. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immunoPCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001, 32:321-325.
39. Zhang W., Bielaszewska M., Pulz M. et al. New immuno-PCR assay for detection of low concentrations of Shiga toxin 2 and its variants. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 46:1292-1297.

Поступила 27.07.18

Контактная информация: Баркова Ирина Анатольевна, к.м.н.,
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. р.т. (8442) 37-37-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Ю.Н.Тараканова¹, А.Д.Дмитриев¹, Д.А.Дмитриев¹, В.Ф.Лавров^{1,2}, Ю.С.Массино¹, А.А.Печелюшко¹,
О.Л.Сезал¹*

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ: ИСТОРИЯ, ТЕОРИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

¹НИИ вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова, ²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва

Иммуноферментный твердофазный анализ (ИФА) играет значительную роль в развитии ряда важных направлений биологии и медицины, в том числе для диагностики опасных инфекций. В настоящем обзоре освещается история изобретения твердофазного ИФА, его дальнейшее усовершенствование и применение. Особый акцент сделан на факторах, влияющих на взаимодействие между антителами и антигенами на твердой фазе и их использовании для увеличения аналитической чувствительности твердофазного ИФА, включая сэндвич-метод определения антигенов.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 117—125

Ключевые слова: иммуноферментный твердофазный анализ, аналитическая чувствительность, моноклональные антитела, аффинность, авидность, сэндвич-метод

THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA): HISTORY, THEORY AND APPLICATION

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) play a significant role in the development of many important fields of biology and medicine, including the detection of the dangerous infections agents. In the present review there is described the history of ELISA's invention, further improvement of this method and application in modern biology and medicine. The special accent is made on factors influencing antibody-antigen interactions on the solid phase and their use to increase the analytical sensitivity of the method.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 117—125

Key words: enzyme-linked immunosorbent assays, analytical sensitivity, monoclonal antibodies, affinity, avidity, sandwich ELISA

Иммуноферментный анализ (ИФА) уже свыше 50 лет играет значительную роль в развитии ряда важных направлений биологической и медицинской науки. ИФА успешно используется в лабораторной диагностике инфекционных, онкологических, эндокринных болезней, заболеваний иммунной системы. С его помощью осуществляется контроль качества и безопасности продуктов питания, мониторинг вредных факторов окружающей среды [1, 23]. Во многих научных публикациях значение ИФА часто сравнивается с другими важнейшими вехами развития биологической науки XX столетия, в том числе, с открытием антибиотиков, расшифровкой структуры ДНК и генома человека [23]. ИФА был разработан в конце 60-х — начале 70-х годов XX века в результате творческого продолжения и качественных изменений ряда важнейших теоретических и практических достижений в области иммунохимии, которые возникли в близкий по времени предшествующий период. Говоря об открытиях, подготовивших условия для разработки ИФА, необходимо отметить, что они тесно связаны с разработкой другого не менее важного метода диагностики — радиоиммунологического анализа (РИА), что позволило качественно повысить эффективность иммунохимического анализа, основанного на взаимодействии антител с антигенами. Вместе с тем, РИА был не лишен серьезных недостатков, которые заключались в работе с опасными для здоровья радиоактивными изотопами. Еще одним «узким местом» РИА являлась необходимость разделения связавшихся с антителами и «свободных» антигенов. В начале 70-х годов две группы исследователей продемонстрировали, что антитела возможно ковалентно связать с такими ферментами, как щелочная фосфатаза, β -глюкозоксидаза и пероксидаза хрена, с помощью реакции с глютаровым диальдегидом или другими методами. Полученные конъюгаты успешно использовались в световой, флуоресцентной и электронной микроскопии для иммуногистохимического окрашивания структур, содержащих анализируемые антигены [11, 16]. Эти эффекты были замечены и успешно использованы двумя группами ученых в Швеции и Нидерландах для замены в иммунохимическом анализе радиоактивной метки на ферментную [16]. Особенно большой вклад в разработку ИФА внесла шведская исследовательница Eva Engvall, предложив использовать пассивную адсорбцию антител или антигенов на поверхность 96-луночных планшетов, чтобы проводить реакции на твердой фазе. Именно Engvall предложила термин ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), в русскоязычной литературе «твердофазный ИФА» [11]. Благодаря этому предложению процедуры отделения им-

мунных комплексов от несвязавшихся реагентов существенно упростились. Следует отметить, что приблизительно в это же время был разработан и внедрен в практику метод твердофазного РИА [11, 16]. Важнейшее значение для развития ИФА сыграло открытие в 1975 году Kohler и Milstein метода получения с помощью гибридомной технологии моноклональных антител (МКА) [15]. Данное открытие впоследствии удостоилось присуждения Нобелевской премии в области физиологии и медицины и позволило, во-первых, решить задачу получения практически неограниченного количества однородных антител, во-вторых, этот метод позволил получать МКА к отдельным эпитопам на молекуле белка. Это создало условия для конструирования сэндвич-метода определения антигенов — одного из наиболее широко используемых на практике вариантов ИФА.

Принцип работы сэндвич-метода состоит в следующем. На поверхность твердой фазы прикрепляются МКА, распознающие один из эпитопов анализируемого антигена. После добавления образца, содержащего антиген, на поверхности «твердой фазы» образуются иммунные комплексы (ловящие антитела — антиген). После отмывок добавляют детектирующие МКА, направленные к другому эпитопу антигена. Эти антитела связаны с ферментом, в качестве которого чаще всего выступает пероксидаза хрена. В результате образуются тройные комплексы — «сэндвичи», в которых молекула антигена оказывается «зажатой» между двумя молекулами МКА к разным эпитопам. Для визуализации этих комплексов добавляют субстрат фермента, который дает цветную реакцию; интенсивность окрашивания регистрируется на спектрофотометре. При этом интенсивность реакции пропорциональна концентрации определяемого антигена в инкубационной смеси. Путем сравнения интенсивности окрашивания калибровочной кривой с интенсивностью окрашивания в анализируемом образце определяют концентрацию тестируемого антигена. Образующиеся на твердой фазе комплексы могут иметь различную конфигурацию. В частности, благодаря бивалентному взаимодействию антител с молекулами антигена, в сэндвич-методе могут образовываться очень прочные циклические комплексы [9, 13]. Показано, что будучи энергетически более выгодными, чем линейные комплексы, образуемые при моновалентном взаимодействии антитела с антигеном, циклические структуры формируются даже при низкой концентрации антигена [9]. При этом аналитическая чувствительность метода многократно увеличивается [9, 13]. Иммуноферментные тест-системы (ИФТС), сконструированные по принципу сэндвич-метода, позволяют достигать высокой аналитической чувствительности и специфичности, так как в них распознаются два различных эпитопа белковой молекулы и возможно образование прочных циклических комплексов.

После открытия ИФА, разработка методов тестирования антигенов проводилась преимущественно в отдельных научных группах и лабораториях. Вскоре к этому процессу подключились биотехнологические компании, которые поставили производство ИФТС на индустриальную основу. По своей чувствительности и специфичности многие современные методы ИФА не уступают, а в некоторых случаях даже превосходят РИА. Наиболее распространен формат ИФА, выполняемый в 96-луночных пластиковых планшетах. Вместе с тем, развиваются и новые направления ИФА, которые используют новые подходы и материалы. В частности, во многих из них образование и определение сигнала основано не на ферментных реакциях, а на других физико-химических взаимодействиях [20]. Назначение этих модернизированных методов, во-первых, связано с увеличением их чувствительности и специфичности, во-вторых — с возможностью автоматизации процесса и, в-третьих, с мультиплексностью, что близко к методу «биочипов» [23]. Также разрабатываются и

выпускаются сложные системы, которые представляют собой разновидности микроэлектрофореза и микроиммуноблоттинга с детекторами [24]. Простейший вариант таких проточных систем — это известные тесты на беременность (определение хорионического гонадотропина), построенные по принципу сэндвич-методов, в которых используются наночастицы золота, связанные с детектирующими антителами.

Тем не менее, наиболее часто используемым на практике вариантом ИФА до настоящего времени остается классический твердофазный метод, выполняемый в 96-луночных пластиковых планшетах. Это, в частности, подтверждают оценки развития индустрии и рынка ИФА, проводимые специальными маркетинговыми компаниями в области биотехнологий. Существует несколько вариантов классического твердофазного ИФА. Они различаются объектами определения — антиген или антитело. Соответственно, из этого следует, какой из компонентов иммобилизуется на твердой фазе. Методы могут быть основаны на принципе конкуренции определяемого антигена и меченых реагентов, или на принципе сэндвича. Для тестирования низкомолекулярных веществ применяют конкурентные методы ИФА [1]. Для определения антигенов белковой природы, несущих несколько антигенных детерминант, распознаваемых различными МКА, наиболее часто используют сэндвич-метод, который нашел широкое применение при выявлении в лабораторных условиях маркеров ряда инфекционных заболеваний, в частности, поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). С помощью данного метода осуществляется массовый скрининг донорской крови на наличие маркеров многих опасных вирусных инфекций [1, 11, 16, 23].

В развитии твердофазного ИФА практика нередко опережала теорию [4]. Тем не менее, именно практика стимулировала теоретические работы, и несколько ведущих ученых в области иммунохимии специально посвятили свои работы подробному анализу и описанию физико-химических процессов в твердофазных ИФА [12]. В России наиболее известным и достаточно полным руководством такого рода является монография под ред. акад. А.М. Егорова [1]. Как подчеркивается в руководствах и статьях, описывающих физико-химические процессы в твердофазных ИФА, эти реакции могут быть представлены в той же терминологии, что и реакции в растворах, с использованием сходных математических уравнений [4]. С другой стороны, они характеризуются рядом важных отличительных особенностей. Это своеобразие связано с протеканием реакций на разделе твердой и жидкой фаз. Особый интерес представляет связь процессов, протекающих в твердофазных системах ИФА с таким параметром, как аналитическая чувствительность метода. При конструировании новых ИФТС первоочередной задачей является достижение высокой аналитической чувствительности. Как показывает практика, это создает важнейшую предпосылку для создания в итоге наиболее эффективных ИФТС, обладающих высокой специфичностью, и снижает минимально определяемую концентрацию антигена [22]. Для математического выражения «аналитической чувствительности» используют два параметра. В 90-е годы даже разгорелась дискуссия, какой из них предпочтительнее [10, 19]. Однако на самом деле оба параметра в практическом смысле полезны, могут быть связаны между собой и являются принятыми способами количественной характеристики чувствительности ИФА [19]. Первый параметр — это «наклон» калибровочной кривой или коэффициент кривой связывания (тангенс угла наклона линейного участка кривой к оси концентраций) [19]. Второй — это так называемая «минимальная, достоверно определяемая концентрация антигена» [10].

Усовершенствования «традиционного» 96-луночного формата ИФА, касающиеся чувствительности и специфичности метода, можно условно разделить на два основ-

ных направления. Первое связано с усилением регистрируемого сигнала. Наиболее часто используемой в ИФА ферментной меткой является пероксидаза хрена, затем идет щелочная фосфатаза, реже используют β -галактозидазу. Но в современных и более дорогостоящих ИФТС существует тенденция заменять субстраты, дающие цветное окрашивание, на вещества, генерирующие более сильные флуоресцентные и хемилюминесцентные сигналы [1]. Наряду с этим широко используют биотин-стрептавидиновые комплексы. В простом варианте это меченные биотином детектирующие МКА, которые взаимодействуют со стрептавидином, который ковалентно связан с пероксидазой хрена. Такие антитела в существенно меньшей степени утрачивают свою антигенсвязывающую активность, чем после конъюгации с ферментом [1].

В силу коммерческих причин фирмы-производители часто не раскрывают детали усовершенствований ИФА. Однако о приоритетных направлениях разработок можно узнавать по большому потоку научных публикаций на эту тему. В частности, анализ литературы свидетельствует, что в качестве одного из перспективных подходов для усиления сигнала в ИФА в настоящее время рассматривают использование конъюгатов детектирующих МКА с наночастицами [19]. Такие частицы, как например, нанозолото, позволяют увеличивать количество метки, связанной с детектирующими антителами, а также их avidность при взаимодействии с антигеном в сэндвич методе. Развиваются методы, сочетающие принцип ИФА с технологией рекомбинантных ДНК, когда для амплификации сигнала используют ПЦР [18]. Вторым подходом к увеличению аналитической чувствительности ИФА является получение антител, обладающих более высоким аффинитетом и специфичностью, а также использование таких методов иммобилизации антител на твердой фазе, которые способствовали бы сохранению их биологической активности. Как отмечается во многих работах, с точки зрения аналитической чувствительности важнейшим этапом при конструировании твердофазного ИФА является создание «первого этажа» или «фундамента», на котором держится вся конструкция, а именно эффективно работающего слоя «улавливающих» иммобилизованных антител [4]. Обычно указывают на два важнейших фактора: на аффинность иммобилизованных антител и их поверхностную концентрацию на твердой фазе. Роль этих факторов подтверждается в ряде работ с помощью математических и экспериментальных моделей [21]. Одна из них, наиболее простая и наглядная, предлагается в работе Peterman [21]. Показано, что в условиях избытка рецептора над лигандом взаимодействие антигенов и антител в твердофазном ИФА можно представить в виде следующего математического выражения: $L_b = KR_f / (1 + KR_f) \times L_t$; где: L_b — молярная концентрация сайтов лиганда, связанных с рецептором (L_b); L_t — суммарная концентрация эпитопов лиганда, R_f — молярная концентрация свободных сайтов рецептора, K — константа ассоциации (аффинность).

В этом случае мы имеем обычный калибровочный график $Y = kX$, показывающий зависимость количества связанного лиганда (ось Y) от его концентрации в образце (ось X). В такой простой форме часто представляют результаты измерений в сэндвич-методах определения антигенов в твердофазных ИФА. Аналитическая чувствительность в такой упрощенной модели ИФА, определяемая как коэффициент графика k будет определяться выражением $KR_f / (1 + KR_f)$. Из приведенного уравнения следует, что аналитическая чувствительность зависит от аффинности антител (K) и количества антигенсвязывающих сайтов антител (R_f) на твердой фазе.

В работе Zhang S. et al. [25] с помощью математической модели был проведен анализ изменения минимальной детектируемой дозы в сэндвич-методе определения антигенов в зависимости от аффинности иммобилизованных антител. Приведенные

расчеты демонстрируют, как повышая аффинность антител на твердой фазе можно значительно увеличить чувствительность метода. Кроме того, помимо собственно иммунохимических факторов в работе кратко обсуждаются технологические подходы повышения аналитической чувствительности метода за счет усиления сигнала детекции путем использования хемилюминесцентных и флуоресцентных реакций, наночастиц и т.п. Как правило, в соответствии с теоретическими расчетами в руководствах по применению и конструированию твердофазных ИФА, в сэндвич-методе рекомендуется прикреплять к твердой фазе антитела, имеющие наиболее высокую аффинность [22]. Что же касается поверхностных концентраций антител на твердой фазе, то в реальности картина осложняется тем, что при адсорбции на поверхность пластиковых планшетов большинство из них теряет свою антигенсвязывающую активность [4]. Это подробно изучалось в работах группы Butler [4, 5]. В частности, было обнаружено, что после адсорбции свою активность утрачивают до 70% ПКА и 75-99% МКА [5]. Потеря активности антител может быть связана как с их денатурацией при контакте с твердой фазой, так и с «неправильной» ориентацией в результате адсорбции. Считается, что наиболее, если не единственно эффективной ориентацией антител, является их прикрепление к твердой фазе с помощью Fc-фрагмента так, чтобы переменные области были обращены в раствор, оставаясь свободными для «улавливания» антигена [17]. Большой вклад в изучение ориентации молекул на твердой фазе вносят современные физико-химические методы анализа структуры и состава поверхностей, например, атомно-силовая микроскопия, масс-спектрометрия вторичных ионов и др. [17].

Таким образом, количество образуемых при данной дозе антигена иммунных комплексов зависит от поверхностной концентрации (плотности) биологически активных молекул антител на твердой фазе и их аффинности. Чем больше иммунных комплексов находится на твердой фазе, тем сильнее выявляемая реакция, тем выше аналитическая чувствительность метода. Следует отметить, что в подобных исследованиях принято различать истинную аффинность как характеристику связывания одного антигенсвязывающего сайта антитела с соответствующим эпитопом на молекуле антигена, и avidность, характеризующую общую прочность связывания молекул антигенов и антител в иммунных комплексах [8]. Можно предположить, что конфигурация иммунных комплексов зависит от плотности активных адсорбированных молекул, а значит от этого же зависит и степень их avidности. Например, при более высокой плотности МКА на твердой фазе могут создаваться стерические возможности для образования бивалентных комплексов между иммобилизованными антителами, антигенами и детектирующими антителами. Циклические иммунные комплексы обладают более выраженной avidностью, по сравнению с линейными, о чем уже говорилось ранее. Гибкость молекул антител, определяемая их шарнирной областью, также может влиять на образование высокоavidных циклических комплексов [13]. Возможно, этот фактор следует учитывать при конструировании ИФТС, в составе которых будут IgY птиц, в отличие от антител млекопитающих, не имеющих шарнирного участка [2]. Образование циклических комплексов способствует повышению аналитической чувствительности метода [9, 13]. Поэтому важнейшим этапом при создании подобных твердофазных систем являются усилия, направленные на увеличение числа активных, правильно ориентированных молекул антител на твердой фазе. При этом возможность прикрепления антител к твердой фазе ограничена образованием монослоя. Следовательно, количество адсорбируемых молекул нельзя увеличить просто за счет увеличения их концентрации в адсорбционном буфере, используемом при иммобилизации антител.

В большинстве случаев сохранившейся активности антител, адсорбированных на твердой фазе, оказывается достаточно для анализа образца [4]. Но в ситуациях, когда нужна особо высокая чувствительность, проблема повышения доли активных антител существенно актуализируется. С учетом фактора инактивации антител при пассивной адсорбции был предложен ряд альтернативных способов иммобилизации, которые были направлены на увеличение доли биологически активных антител на твердой фазе. В их основе лежит создание промежуточных звеньев между поверхностью полистирола и МКА, которые защитили бы иммобилизованные молекулы антител от денатурации и обеспечили пространственную ориентацию, оптимальную для распознавания и захвата антигена. Suter и Butler в целях лучшего сохранения активности иммобилизованных МКА при конструировании сэндвич-методов твердофазных ИФА предложили прикреплять антитела к пластику с помощью биотинавидиновых мостиков [4]. До сих пор практикуется использование коммерческих плашек с уже прикрепленным стрептавидином. Среди других известных методов иммобилизации антител на твердой фазе следует упомянуть использование в качестве первого слоя антивидовых антител [4]. Наряду с этим применяются специально обработанные коммерческие пластиковые планшеты, обеспечивающие образование ковалентных связей между активированными молекулами на поверхности пластика и антителами [10]. Но следует учитывать, что на практике эти методы оказываются более затратными по времени и средствам, чем пассивная адсорбция, а результат иммобилизации часто непредсказуем. Поэтому пассивная адсорбция остается наиболее часто используемым методом иммобилизации антител при конструировании сэндвич-методов. Именно с нее советуют начинать конструирование сэндвич-метода в специальных руководствах [4]. В этой связи, особый интерес представляют приемы, позволяющие повысить эффективность этого метода.

К числу наиболее существенных факторов, влияющих на сохранение биологической активности антител, можно отнести состав и физико-химические свойства адсорбционных буферов. Однако вопросу о влиянии рН на биологическую активность адсорбированных антител в специальной литературе уделено мало внимания. В руководствах по ИФА для адсорбции антител традиционно рекомендуется использовать в качестве оптимальных буферные растворы с рН 7.5 и 9.5 [14]. Однако в некоторых немногочисленных работах описаны поликлональные и моноклональные антитела, для сохранения антигенсвязывающей активности которых использовали буферные растворы с более низким или более высоким значением рН [6]. В нашей лаборатории в процессе конструирования сэндвич-метода определения HBsAg были получены и использованы МКА, адсорбция которых в буферных растворах с рН 2.8 позволяла значительно увеличить аналитическую чувствительность метода [7]. Обнаруженный феномен побудил нас провести более углубленное исследование, цель которого заключалась в получении ответов на несколько важных вопросов. Являются ли описанные в нашей работе [7] «кислотоустойчивые» МКА к HBsAg неким редким явлением или это отражение более общих свойств антител, важных с теоретической и практической точек зрения. И каковы механизмы повышения аналитической чувствительности ИФА при использовании адсорбционных буферов с «жестким» значением рН для иммобилизации подобного рода МКА. В частности, связано ли это явление с изменением общего числа адсорбированных на «твердой фазе» молекул антител или это отражает более высокую сохранность их антигенсвязывающей активности в «экстремальных» условиях.

Для ответа на поставленные вопросы нами был проведен сравнительный анализ изменений поверхностной концентрации и антигенсвязывающей активности МКА

после их адсорбции на твердой фазе при различных значениях рН буферов [3]. В дополнение к традиционным показателям рН иммобилизации (7.5 и 9.5) прямая адсорбция антител проводилась в т. н. «жестких» условиях (рН 1.0; 2.8 и 11.9), которые теоретически могли бы способствовать инактивации МКА. В процессе выполнения данной работы нами была проанализирована активность 28 МКА. Эффективность связывания адсорбированных антител с меченым антигеном оценивали по тангенсу угла наклона линейного участка кривых связывания с антигенами. В результате было выявлено, что шесть МКА (21.5%) показали статистически значимое увеличение антигенсвязывающей активности (проявлявшееся в возрастании аналитической чувствительности метода) после адсорбции в буферных растворах с рН 2.8 и рН 11.9, по сравнению с более «мягкими» условиями адсорбции в растворах с рН 7.5 и 9.5. Анализ связывания ^{125}I -НВsAg с адсорбированными антителами позволил сделать вывод, что наблюдаемое нами увеличение аналитической чувствительности метода было обусловлено лучшим сохранением антигенсвязывающей активности этих МКА после их иммобилизации в буферах с нефизиологическими («жесткими») значениями рН, по сравнению с адсорбцией в буферных растворах с физиологическими значениями рН. При этом общее количество IgG на твердой фазе не увеличилось. Так, после адсорбции в «жестких» условиях антигенсвязывающую активность сохраняли около 20% антител, а после иммобилизации при рН 7.5 — всего 6%. Наблюдаемые различия в сохранении антигенсвязывающей активности МКА при адсорбции в буферных растворах с различными значениями рН, вероятно, могут быть связаны с отличиями в заряде и степени гидрофобности вариабельных участков легких и тяжелых цепей МКА. Эти особенности, по-видимому, определяют ориентацию и конформационное состояние молекул при различных условиях адсорбции. Полученные результаты могут оказать существенную пользу при оптимизации твердофазного ИФА. Таким образом, можно сделать вывод, что аналитическая чувствительность сэндвич-метода определения антигена зависит многих факторов. Однако если иметь ввиду факторы, определяемые собственно взаимодействиями антител и антигенов, то важнейшим условием является возможность формирования на твердой фазе монослоя иммобилизованных антител, которые могли бы эффективно захватывать из раствора молекулы определяемого антигена, обеспечивая, таким образом, стерические предпосылки для образования высокоavidных иммунных комплексов с детектируемыми антителами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М., Высшая школа, 1991.
2. Печелюшко А.А., Тараканова Ю.Н., Дмитриев Д.А. и др. Сравнительный анализ эффективности использования антител птиц и млекопитающих с сэндвич-методом определения НВsAg. Прикладная биохимия и микробиология. 2017, 53(1):104-114.
3. Тараканова Ю.Н., Дмитриев А.Д., Массино Ю.С. и др. Влияние рН адсорбционных буферов на количество и антигенсвязывающую активность моноклональных антител, иммобилизованных на поверхность полистироловых планшетов. Прикладная биохимия и микробиология. 2017, 51(4):424-433.
4. Butler J.E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *In: Methods in molecular medicine: Molecular Diagnosis of Infectious Diseases*. Eds.: Decker J. and Reischl U. Humana Press Inc., 2004, p. 333-372.
5. Butler J.E., Ni L., Brown W.R. et al. The immunochemistry of sandwich ELISAs. VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescein capture antibodies (CABs) are denatured by passive adsorption. *Mol. Immunol.* 1993, 30(13):1165-1175.

6. Cuvelier A., Bourguignon J., Muir J.F. et al. Substitution of carbonate by acetate buffer for IgG coating in sandwich ELISA. *J. Immunoassay*. 1996, 17(4):371-382.
7. Dmitriev A.D., Tarakanova J.N., Yakovleva D.A. et al. Monoclonal antibodies requiring coating buffer with low pH for efficient antigen capture in sandwich ELISA: the rarities or practically important phenomena? *J. Immunoassay. Immunochem.* 2013, 34(4):414-437.
8. Dmitriev D.A., Massino Y.S., Segal O.L. Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor. *J. Immunol. Methods*. 2003, 280(1-2):183-202.
9. Ehrlich P.H., Moyle W.R. Specificity considerations in cooperative immunoassays. *Clin. Chem.* 1984, 30(9):1523-1532.
10. Ekins R., Edwards P. On the Meaning of «Sensitivity». *Clin. Chem.* 1997, 43(10):1824-1831.
11. Engvall E. The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical Chemistry*. 2010, 56(2):319-320.
12. *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay* (first edition). Ed.: Butler J.E. Boca Raton, FL, CRC Press, 1991.
13. Jackson A.P., Siddle K., Thompson R.J. A monoclonal antibody to human brain-type creatine kinase. Increased avidity with mercaptans. *Biochem J.* 1983, 215(3):505-512.
14. Jordan W. Part 155. Antigen Measurement Using ELISA. In: *The Protein Protocols Handbook* (Second edition). Ed.: Walker J.M. Humana Press Inc., 2002, p. 1083-1087.
15. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975, 256:495-497.
16. Lequin R.M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* 2005, 51(12):2415-2418.
17. Liu F., Dubey M., Takahashi H. et al. Immobilized Antibody Orientation Analysis using Secondary Ion Mass Spectrometry and Fluorescence Imaging of Affinity-generated Patterns. *Analyt. Chem.* 2010, 82(7):2047-2058.
18. McDermed J.E., Sanders R., Fait S. et al. Nucleic acid detection immunoassay for prostate-specific antigen based on immuno-PCR methodology. *Clin. Chem.* 2012, 58(4):732-740.
19. Pardue H. L. Counterpoint The inseparable triad: analytical sensitivity, measurement uncertainty, and quantitative resolution. *Clinical Chemistry*. 1997, 43(10):1831-1837.
20. Pei X., Zhang B., Tang J. et al. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Anal. Chim. Acta.* 2013, 758(3):1-18.
21. Peterman J.H. Immunochemical considerations in the analysis of data from non-competitive solid-phase immunoassays. In: *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay* (first edition). Ed.: Butler J.E. Boca Raton, FL, CRC Press, 1991, p. 47-65.
22. Porstmann T., Kiessig S.T. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J. Immunol Methods*. 1992, 150(1-2):5-21.
23. Wu A.H. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta.* 2006, 369(2):119-124.
24. Yu Z.T., Guan H., Cheung M.K. et al. Rapid, automated, parallel quantitative immunoassays using highly integrated microfluidics and AlphaLISA. *Sci. Rep.* 2015, 5:11339.
25. Zhang S., Garcia-D'Angeli A., Brennan J.P. et al. Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *The Analyst*. 2013, 139(2):439-445.

Поступила 29.01.19

Контактная информация: Тараканова Юлия Николаевна,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-55-01