

УДК 66.067

Теровский В.Б., Рейфман Л.С., Полякова Т.И. Аналитический метод определения веществ на основе иммуноспецифичных взаимодействий // Научное приборостроение. Л.: Наука, 1987.

Рассматривается возможность потенциометрии локализованной на мембране иммуноспецифичной реакции. Получены аналитические выражения скорости образования комплексов антиген-антитело на поверхности мембраны в частных случаях лимитирующей диффузии и лимитирующей химической реакции. Впервые показана возможность применения метода для определения концентрации вирусов на примере вируса гриппа. Библиогр. 9 назв.

В.Б.Теровский, Л.С.Рейдман, Т.И.Полякова

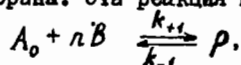
АНАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ ИММУНОСПЕЦИФИЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

В настоящее время наблюдается интенсивное становление нового направления аналитического приборостроения, использующего методы, основанные на биоспецифических взаимодействиях типа фермент-субстрат, фермент-ингибитор, антиген-антитело. Относительно простые в изготовлении и недорогие приборы для определения различных ионов, органических соединений, высокомолекулярных соединений, вирусов и т.д. находят применение в биотехнологии, клиническом анализе, контроле окружающей среды. Наибольшее распространение из таких приборов получили электрохимические датчики – ферментные электроды, клеточные и тканевые электроды, иммуноэлектроды. Ежегодно публикуется более 1000 работ, посвященных использованию биоспецифических электродов при решении различных задач перечисленных выше областей [1] .

В то же время собственно иммуноэлектрохимическому методу (т.е. прямому потенциометрическому измерению локализованной на поверхности мембраны реакции образования комплекса между антигеном и антителом) посвящены лишь единичные работы. Идея иммуноэлектрода выдвинута в 1975 г. [2] и развивалась в дальнейшем в основном японскими исследователями [3-9] . Электрод с антихорионогонадотропином был применен для ранней диагностики беременности [9] , электрод с антигеном Вассермана – для определения сифилиса [6] . Принцип иммуноэлектрохимического метода состоит в следующем.

Антитела и антигены в водных растворах, являющиеся полиэлектролитами, несут электрический заряд, величина и полярность которого определяются изоэлектрической точкой антитела (антигена) и ионным составом среды. Поэтому если один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) связан с поверхностью мембраны, а другой находится в растворе в свободном состоянии, то при их взаимодействии, как правило, изменяется заряд поверхности. Величина (и/или скорость) этого изменения зависит от концентрации растворенного компонента. Если поместить такую "иммуночувствительную" мембрану между двумя электродами, то возникающая между ними разность потенциалов будет определяться концентрацией образовавшегося иммунного комплекса. Формирование заряженного слоя на мембране определяется двумя одновременно протекающими процессами: диффузией свободного компонента в растворе и реакцией между свободным и иммобилизованным компонентами

на поверхности мембраны. Эта реакция может быть записана в виде



где A_0 - "концентрация" связывающих центров на мембране; B - концентрация свободного компонента в растворе; n - стехиометрический коэффициент; P - концентрация комплекса; k_{+1} , k_{-1} - константы скорости образования и диссоциации иммунного комплекса.

Следует заметить, что k_{+1} и k_{-1} отличаются от соответствующих констант для реакции между свободными антигеном и антителом. Кроме того, для случая, когда растворенный компонент неодновалентен, k_{+1} существенно зависит от поверхностной плотности иммобилизованного компонента.

Скорость образования иммунного комплекса определяется выражением

$$dP/dt = k_{+1}(A_0 - P)B - k_{-1}P. \quad (1)$$

Здесь рассматривается случай, когда $n = 1$. Учитывая, что константа равновесия $K = k_{+1}/k_{-1}$ для реакции между свободными антигеном и антителом имеет значения $10^8 - 10^{11}$, можно опустить второй член в выражении (1):

$$dP/dt = k_{+1}(A_0 - P)B. \quad (2)$$

Диффузия свободного компонента описывается уравнением

$$\partial B / \partial t = D \cdot \partial^2 B / \partial x^2, \quad (3)$$

где D - коэффициент диффузии. Координата x отсчитывается по нормали к плоскости мембраны, и $x = 0$ соответствует положению мембраны. Считая, что в начальный момент времени концентрация свободного компонента одинакова во всем объеме и равна B_0 , можно написать

$$B|_{t=0} = B_0; \quad (4) \quad \left. \frac{\partial B}{\partial x} \right|_{x=d} = 0, \quad (5)$$

где $x = d$ соответствует положению контрольной мембраны либо внешней границе диффузионного пограничного слоя.

Еще одно граничное условие определяется реакцией образования комплекса на иммуночувствительной мембране и может быть получено из соотношений

$$\begin{aligned} \left. \frac{\partial B}{\partial t} \right|_{x=0} &= -D \left. \frac{\partial B}{\partial x} \right|_{x=0} - k_{+1} B|_{x=0} (A_0 - P); \\ \left. \frac{dP}{dt} \right|_{x=0} &= k_{+1} B|_{x=0} (A_0 - P). \end{aligned} \quad (6)$$

Решение уравнения (3) с граничными условиями (4) - (6) представляет значительные трудности, поэтому рассмотрим два частных случая: медленной и бесконечно быстрой реакции образования иммунного комплекса. В первом случае - лимитирующей стадией процесса является реакция на поверхности - задача сводится к решению уравнения (2) с начальным условием $P|_{t=0} = 0$:

$$\begin{aligned} P &= A_0 (1 - e^{-k_{+1} B t}); \\ \text{откуда} \quad \left. \frac{dP}{dt} \right|_{t=0} &= k_{+1} B A_0; \quad P|_{t \rightarrow \infty} = A_0. \end{aligned} \quad (7)$$

Так как измеряемая разность потенциалов U пропорциональна концентрации комплекса P , то начальная скорость $\left. \frac{dU}{dt} \right|_{t=0}$ должна быть прямо пропорциональна концентрации растворенного компонента.

Во втором случае - лимитирующей стадией является диффузия - задача сводится к решению уравнения (3) с граничными условиями (4) и (5). Условие, описывающее реакцию образования комплекса на мембране, переходит в $B|_{x=0}$ при $t > 0$. Предполагается, что скорость реакции бесконечна, т.е. реакция имеет нулевой порядок, по концентрации растворенного компонента.

Решение задачи имеет вид

$$B = \frac{4}{\pi} B_0 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{2n+1} e^{-\frac{(2n+1)^2 \pi^2 D}{4d^2} t} \sin(2n+1) \frac{\pi}{2} \frac{x}{d}.$$

Поток растворенного компонента к поверхности мембраны

$$N_B = -D \left. \frac{\partial B}{\partial x} \right|_{x=0} = -2 \frac{B_0 D}{d} \sum_{n=1}^{\infty} e^{-\frac{(2n+1)^2 \pi^2 D}{4d^2} t}. \quad (8)$$

Интегрируя (8) по t от 0 до t_0 , получим

$$\Delta P(t_0) = \int_0^{t_0} N_B dt = \frac{8d}{\pi^2} B_0 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1 - e^{-\frac{(2n+1)^2 \pi^2 D}{4d^2} t_0}}{(2n+1)^2}. \quad (9)$$

Из выражений (8) и (9) видно, что в случае лимитирования скорости процесса диффузией и изменения потенциала U , и его скорость dU/dt прямо пропорциональны концентрации растворенного компонента.

Из сопоставления выражений (7) и (8) можно вывести критерий, определяющий лимитирующую стадию процесса. Если $k_+ B_s A_0 > 2B_v D/d$, то более медленным процессом является диффузия; если неравенство имеет обратный знак, то лимитирующей является скорость реакции образования комплекса (отметим, что в левой и правой частях стоят соответственно поверхностная B_s и объемная B_v концентрации растворенного компонента).

На практике в иммуноэлектрохимических датчиках могут иметь место оба рассмотренных выше механизма: в работах Ямамото [7-9] процесс лимитируется скоростью реакции образования комплекса, а результаты, полученные Аидзава [5, 6] свидетельствуют об определяющей роли диффузии.

До настоящего времени иммуноэлектрохимический метод применялся только для определения антигенных белков или антител. Была поставлена задача применить его для определения концентрации низкомолекулярных образований - вирусов. Первым объектом был выбран вирус гриппа (штамм $Nib - 4$). Экспериментальная установка состояла из измерительной ячейки, RC-фильтра быстрых сигналов и самопишущего потенциометра постоянного тока ЛКС-4 или *Endiue* 620.02 (ГДР). В состав измерительной ячейки входили два хлорсеребряных электрода, разделенных двумя мембранами, с одной из которых были ковалентно связаны антитела к данному штамму вируса гриппа. В пространство между мембранами вводился раствор, содержащий вирусные частицы, и изменение разности потенциалов между электродами записывалось регистрирующим прибором.

Были испытаны несколько конструкций измерительных ячеек, отличающихся объемом измерительной камеры, размером мембран, способом введения пробы, наличием или отсутствием перемешивания. Применялись мембраны разных типов и различные методы иммобилизации антител. Лучшие результаты были достигнуты при иммобилизации антител на предварительно обработанных глутаровым альдегидом мембранах "Владигор" типов УАМ-100 и УАМ-200. Регистрируемое изменение потенциала в разных опытах составляло от 1 до 10 мВ в зависимости от концентрации вируса в пробе, применяемой мембраны и способа ее обработки и т.д. Введение в измерительную камеру раствора, не содержащего вирусных частиц или содержащего другой штамм вируса, не

приводило к изменению потенциала.

При рассмотрении вопроса о лимитирующей стадии процесса было отмечено решающее значение конструкции измерительной ячейки, в частности способа введения пробы. В том случае, когда проба вносилась при помощи пипетки, скорость процесса лимитировалась диффузией. Если же конструкция измерительной ячейки предусматривала полное вытеснение предшествующего раствора вирусосодержащей жидкостью, то здесь наиболее медленной стадией являлась реакция образования комплекса. Но для очень низких концентраций вирусных частиц и в этом случае определяющей является скорость диффузионного процесса. Таким образом, наблюдается смена лимитирующей стадии при изменении концентрации растворенного компонента.

Достигнутая в наших опытах концентрационная чувствительность на несколько порядков превышает чувствительность метода РГА (реакции гемагглютинации), единственного широко применяемого в настоящее время. В перспективе описанный метод, по-видимому, не уступает обычным вариантам радиоиммунного и иммуноферментного методов и позволяет избежать сложностей, связанных с применением радиоактивных изотопов или получением конъюгатов антител с ферментом. Еще одним его достоинством является оперативность: процедура измерения занимает не более 10-20 мин (для всех остальных методов время измерения составляет минимум несколько часов).

Здесь описаны только предварительные исследования возможностей иммуно-электрохимического метода на примере определения концентрации вируса гриппа. Метод применим, разумеется, и к любым другим биологическим объектам - для этого достаточно лишь использовать чувствительную мембрану с соответствующими антителами.

Разработанные модели и экспериментальные установки могут явиться базой для создания нового направления иммунного анализа самого разнообразного круга биологических объектов в широком диапазоне молекулярных масс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rechnitz J.A. // *Anal. Chem.*, 1982. Vol.54, N 11, P.1194A-1200A.
2. Janata J. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1975. Vol.97, N10. P.2914-2916.
3. Aizawa M., Kato S., Suzuki S. // *Membr. Sci.* 1977. Vol.2, N 2. P.125-132.
4. Аизава М., Като С., Сузуки С., Нагамура У., Шинохара Р., Ишигуро И. // *Кобунсё ромбунсё*. 1977. Т.34, № 11. С.813-817.
5. Aizawa M., Suzuki S., Nagamura Y., Shionohara R., Ishiguro I. // *Chem. Lett.* 1977. N7. P. 779-782.
6. Aizawa M., Suzuki S., Nagamura Y., Shionohara R., Ishiguro I. // *Solid Phys. Biochem.* 1979. Vol. 4, N 1, P. 25-31.
7. Yamamoto N., Nagasawa Y., Shuto S., Sawai M., Sudo T., Tsubomura H. // *Chem. Lett.* 1978. N 3. P.245-246.
8. Yamamoto N., Nagasawa Y., Sawai M., Sudo T., Tsubomura H. // *Immunol. Meth.* 1978, Vol. 22, N 3-4. P. 309-317.
9. Yamamoto N., Nagasawa Y., Shuto S., Tsubomura H., Sawai M., Okumura H. // *Clin. Chem.* 1980. Vol. 26, N 11. P. 1569-1572.