

**Приготовление иммунозолотого маркера и его использование в иммуно-дот анализе для выявления дифтерийного токсина**

*НПП эпидемиологии и микробиологии, МЗ РБ*

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук  
Белорусский государственный университет*

Синтезирован монодисперсный коллоидный раствор золота с размером частиц 15 нм и подобраны оптимальные условия получения специфичного к дифтерийному токсину стабильного биоконъюгата, путем функционализации золотых наночастиц поликлональными антителами. Биоконъюгат был использован в усовершенствованном иммуно-дот методе для выявления токсигенности клинических изолятов *C. diphtheriae*.

Ключевые слова: коллоидное золото, дот-анализ, дифтерийный токсин.

Дифтерия является острой инфекцией верхних дыхательных путей и вызывается токсигенными штаммами *Corynebacterium diphtheriae*. Значительно реже аналогичное по клинической форме заболевание могут вызывать токсигенные штаммы *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*. Эпидемия дифтерии, возникшая в 90-е годы, сегодня находится под контролем, однако, несмотря на выраженную тенденцию к снижению заболеваемости, которая наметилась с 1996 года, случаи дифтерии все еще продолжают регистрироваться в стране и циркуляция токсигенных штаммов возбудителя сохраняется. В 2008 году зарегистрировано 3 случая дифтерии, вызванные токсигенными штаммами *C. diphtheriae*.

Способность к продукции токсина – основной фактор вирулентности возбудителя дифтерии. Дифтерийный токсин состоит из одиночной полипептидной цепи с молекулярной массой 58 кДа, которая в свою очередь состоит из трех структурно-функциональных доменов. Содержащий аминокислотную группу компонент (фрагмент А) с молекулярной массой 21 кДа содержит домен, катализирующий с использованием НАД рибозилирование АДФ эукариотического фактора элонгации 2, который инактивирует синтез белка в клетках человека. Карбокситерминальный компонент токсина – фрагмент В (39 кДа) – содержит эукариотический рецепторсвязывающий и гидрофобный домены, отвечающие за транспорт каталитического домена через эндосомальную мембрану в цитозоль.

Существующие генетические и фенотипические методы определения токсигенности возбудителя дифтерии наряду с преимуществами имеют и недостатки, которые отражены в ряде работ и указывают на необходимость разработки новых, специфичных, высокочувствительных, быстрых тестов, не требующих специализированного оборудования [11, 12].

Новая эра в использовании коллоидного золота в биологии и медицине была положена исследованиями Faulk и Taylor, в которых конъюгат коллоидного золота с иммуноглобулинами был впервые использован как иммунохимический маркер [13]. Исследования Frensa G. позволили получать частицы коллоидного золота с заранее заданным размером частиц [14]. Все это послужило началом широкого использования конъюгированных с коллоидным золотом биоспецифических маркеров в различных отраслях биологии и медицины. Благодаря высокой специфичности и чувствительности иммуноанализа, был разработан и выпущен ряд тест-систем, предназначенных для диагностики различных инфекций, токсинов, наркотических соединений [7,10,17]. Наиболее интенсивно разрабатываемым и широко внедряемым в практику форматом экспресс-иммунотестов является иммунохроматография. Однако технология изготовления компонентов таких тест-систем (в отличие от дот-блот тестов) достаточно сложная и является собственностью фирм-производителей, что ограничивает применение этих методов в обычной лабораторной практике [2]. Методика дот-анализа разных антигенов с

визуализацией продуктов реакции конъюгатами коллоидного золота также приобретает большое значение в лабораторно-клинической практике [3,4]

В данной работе представлены результаты получения конъюгата коллоидного золота с антителами, специфичными к дифтерийному токсину, и его использование в диагностическом иммуно-дот тесте с целью выявления дифтерийного токсина в клинических изолятах *C. diphtheriae*.

#### Материал и методы

Золотохлористоводородную кислоту ( $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich) и цитрат натрия (Fluka, Switzerland) использовали без дополнительной очистки. Все растворы готовили с применением деионизованной воды.

В экспериментах использовали два типа антител: дифтерийный антитоксин производства НПО «Биомед», Пермь, содержащий антитела, выделенные путем иммуносорбции-десорбции на иммобилизованном дифтерийном анатоксине из частично ферментированной лошадиной гипериммунной противодифтерийной сыворотки, и мышечные моноклональные антитела, специфичные к фрагменту А дифтерийного токсина (Abscam).

Водный раствор золотохлористоводородной кислоты (250 мл 0.01%  $\text{HAuCl}_4$ ) доводили до кипения. Раствор цитрата натрия (7,5 мл 1%) добавляли при быстром перемешивании для получения частиц коллоидного золота с размером 15 нм в соответствии с методом Френса [14].

Приготовление конъюгата коллоидного золота с иммуноглобулинами включало приготовление и очистку водных растворов антител, определение «золотого числа» (минимального количества белка, защищающего золь против солевой агрегации), соединение пробы с меткой, добавление вторичного стабилизатора, концентрацию маркера, оптимизацию конечного продукта, и выполнено, как описано в работах ряда авторов [3,8,15, 16]. Конъюгация коллоидного золота с антителами проводилась при pH 8,2, используя полиэтиленгликоль (Mr 20 000) как вторичный стабилизатор.

Дот анализ выполняли на нитроцеллюлозных мембранах с диаметром пор 0,2 мкм (Hybond, Amersham Biosciences). Испытуемый материал каплями в объеме 1 мкл наносился на нитроцеллюлозные фильтры в центр очерченного квадрата размером 5 мм<sup>2</sup>. Для лучшей фиксации материала мембрану выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 10 минут. Для блокирования сайтов неспецифической адсорбции, мембраны после нанесения материала, инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в блокирующем буфере – 20 мМ фосфатном буфере, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma), 150 мМ NaCl, и 20 мМ азидата натрия, pH 7,4. Для обнаружения антигена нитроцеллюлозные полоски после вышеуказанной обработки помещали в конверты из парафильма и инкубировали в растворе биоконъюгата, предварительно разведенного фосфатным буфером pH 8,2 до оптической плотности 1 при длине волны 520 нм и кювете 1 см.

Протекание реакции приводило к появлению ярко-красных пятен в месте специфического взаимодействия антигена и связанных с коллоидным золотом иммуноглобулинов через 5-10 минут после добавления маркера. Цвет пятен постепенно интенсифицировался на протяжении 1 часа. Полоски затем промывали водой и далее они могли храниться любое время без изменения интенсивности окраски.

#### Результаты и обсуждение

Характеристика частиц коллоидного золота.

Частицы коллоидного золота были получены путем восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Средний диаметр наночастиц золота составил 15 нм согласно спектрофотометрии и результатам электронной микроскопии полученной суспензии.

Анализ оптимальных условий для конъюгации коллоидного золота и антител.

Стабилизация золотых наночастиц полимерными макромолекулами осуществляется, как правило, благодаря электростатическим и гидрофобным взаимодействиям. Оптимальные для стабилизации условия обычно достигаются при возможно более низкой ионной силе раствора зонда и значениях pH на 0,5 ед. выше изоэлектрической точки стабилизирующего вещества [1,5,16]. Для каждой новой пары зонд-метка условия стабилизации маркера подбираются эмпирически.

Минимальное количество поликлональных антитоксических антител, необходимое для стабилизации золя, определяли по результатам анализа спектров поглощения (увеличение и расширение пика поглощения при стабилизации золя, а также стабильности кривой поглощения в области 600-700 нм при добавлении соли) [1].

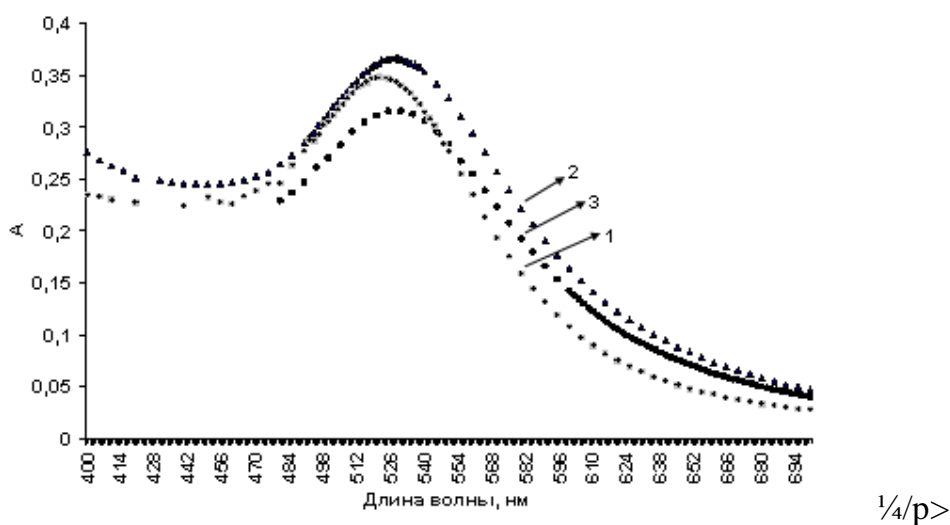


Рисунок 1 – Спектры поглощения исходного золя золота (1), золя, стабилизированного антителами (2) и после добавления NaCl (3)

Как видно на рисунке 1 при стабилизации золя наблюдалось увеличение и уширение пика кривой поглощения. Максимум пика поглощения нестабилизированного золя составил 521 нм (оптическая плотность – 0,349), при конъюгации с антителами в концентрации 10 мкг/мл – 525-530 нм (0,366). Добавление к биоконъюгату раствора NaCl до конечной концентрации 1% не приводило к изменению спектра поглощения в области 600-700 нм при концентрации антител 10 мкг/мл, что означает отсутствие агрегации частиц при высокой ионной силе раствора.

Коллоидные растворы образуются фактически в результате баланса между силами электростатического отталкивания и силами притяжения Ван-дер-Ваальса между частицами [5,16]. При добавлении солей (например, NaCl) силы притяжения становятся выше, чем отталкивания, что ведет к агрегации, которая сопровождается изменением цвета раствора с красного (максимум поглощения 520 нм) на голубой [15]. Однако нестабильность раствора может быть предотвращена адсорбцией молекул белка, в частности иммуноглобулинов, на поверхности частиц золя. Количество белка, необходимое для получения стабильной коллоидной суспензии, может быть приблизительно получено из кривой флокуляции [9]. Оптимальные условия конъюгации также определяли в U-образных иммунологических

планшетах с лунками объемом 200 мкл. Для этой цели делали серию последовательных разведений антител в фосфатном буфере и добавляли золи с предварительно доведенным поташом значениями рН в интервале от 7 до 9. В тех лунках, где условия среды не были оптимальными по кислотности или золотому числу, после добавления 10%-го раствора NaCl до конечной концентрации 1% происходила агрегация. Агрегация сопровождалась изменением цвета золя с красного на голубой или серый. Золотое число для поликлональных антитоксических антител было определено как 10 мкг на мл коллоидного золота при рН 8,2.

Чувствительность и специфичность иммунодот-анализа.

Биоконъюгат с поликлональными антитоксическими антителами был приготовлен, как описано в материалах и методах, и его иммуноактивность проверена методом твердофазного иммуноанализа с использованием нитроцеллюлозной мембраны с диаметром пор 0,2 мкм и дифтерийного анатоксина (300 Lf/мл), производства Государственного контрольного института имени Тарасевича. По 1 мкл приготовленной серии разведений анатоксина наносили на нитроцеллюлозную мембрану в центр расчерченных на ней квадратов размером 5×5 мм. После подсушивания мембраны в термостате при температуре 37°C и выдерживания в блокирующем буфере, ее помещали в конверт из парафила и инкубировали в растворе биоконъюгата.

На рисунке 2 представлены результаты выявления дифтерийного анатоксина с полученным биоконъюгатом. Первое пятно соответствует 0,3 Lf или 525 нг анатоксина при условии, что 1 Lf эквивалентен 1,75 мкг токсина [6]. Другие пятна получены двукратным разведением так, что последнее пятно соответствует  $1 \times 10^{-3}$  Lf или 2,0 нг анатоксина. Полученный биоконъюгат не реагировал с молекулами бычьего сывороточного альбумина (БСА), взятыми в качестве отрицательного контроля в такой же концентрации, что и анатоксин, а также питательной средой пгла MEM, используемой для культивирования штаммов *S.diphtheriae*.

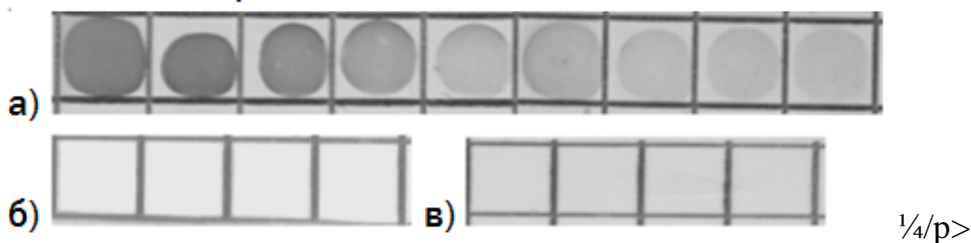


Рисунок 2 – иммунозолотой дот-анализ дифтерийного анатоксина (а), БСА (б), среды пгла MEM (в).

Таким образом, полученный биоконъюгат коллоидного золота с поликлональными противодифтерийными антителами выявлял только дифтерийный анатоксин, минимальное количество которого составило 2 нг.

Выявление токсигенности среди клинических изолятов дот-иммунозолотым методом. Для выявления дифтерийного токсина в бульонных культурах клинических изолятов *S. diphtheriae* использовали нитроцеллюлозную мембрану с предварительно фиксированными на ней моноклональными мышинными антителами, специфичными к фрагменту А дифтерийного токсина. Мембрану инкубировали сначала в суспензии изолятов *S. diphtheriae*, а затем в растворе биоконъюгата. Возможность применения дот-иммунозолотого метода для выявления токсигенности клинических изолятов была оценена на 80 токсигенных и 60 нетоксигенных штаммах *S. diphtheriae*. Выявлена 100% корреляция между результатами определения токсигенности традиционным тестом Элека и дот-

иммунозолотым методом. Чувствительность дот-иммунозолотого теста составила 100% (95% доверительный интервал,  $98,0 \div 100$ ) и специфичность также составила 100% (95% доверительный интервал,  $97,5 \div 100$ ). Разработанный метод в сравнении с Элек-тестом позволяет сократить время проведения исследования. Анализ токсигенности дотиммунозолотым методом занимает 5 часов, тогда как традиционный тест – 18-24 часа.

#### Выводы

1. Синтезирован стабильный и специфичный биоконъюгат частиц коллоидного золота 15 нм и поликлональных антитоксических антител, выявляющий только дифтерийный токсин.
2. Разработан высокочувствительный дот иммунозолотой метод для выявления дифтерийного токсина.
3. Преимуществом метода в сравнении с традиционным тестом Элека является сокращение времени на проведение исследования и отсутствие ложноположительных результатов, имеющих место при использовании гипериммунной лошадиной сыворотки в Элек-тесте.

#### Литература

1. Богатырев, В. А. Метод дифференциальной спектроскопии рассеянного света для исследования биоспецифических реакций в системах конъюгатов золотых наночастиц с белками или олигонуклеотидами / В. А. Богатырев [и др.] // Коллоидный журнал 2002. Т. 64, № 6. С. 745–755.
  2. Дыкман, Л. А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии / Л. А. Дыкман, В. А. Богатырев // Успехи химии. 2007. Т. 76, № 2. С. 199–213.
  3. Дыкман, Л. А. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение / Л. А. Дыкман [и др.]. М.: Наука, 2008. 319 с.
  4. Лазарчик, В. А. Тест-система на основе конъюгатов антибактериальных антител с коллоидным золотом для выявления антигенов шигелл в биологических жидкостях / В. А. Лазарчик [и др.] // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Мед. сер. 2005. № 3. С. 44–47.
  5. Albrecht, R. M. Correlative video-enhanced light microscopy, high voltage transmission electron microscopy, and field emission scanning electron microscopy for the localization of colloidal gold labels / R.M. Albrecht, S.R. Simmons, J.B. Pawley // In: Immunocytochemistry a Practical Approach, Beesley, J.E. (ed), Oxford Univ. Press. 1993. P. 151–176.
  6. Barksdale, L. *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives / L. Barksdale // Bacteriol. Rev. 1970. Vol. 34, № 4. P. 378–422.
  7. Dar, V.S. Rapid detection of rotavirus by using colloidal gold particles labeled with monoclonal antibody / V.S. Dar, S. Ghosh, S. Broor // J. Virol. Methods. 1994. Vol. 47. P. 51–58.
  8. De Mey, J. The preparation of colloidal gold probes and their use as marker in electron microscopy / J. De Mey, M. Moeremans // In: Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy III (Koehler J.K., Ed.) Springer-Verlag, Berlin, 1986. P. 229–271.
- Оригинальная атья
9. De Roe, C. A model of protein-colloidal gold interactions / C. De Roe, P.J. Curtoy, P. Baudhuin // The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1987. Vol. 35, № 11. P. 1191–1198.
  10. Dykman, L. A. Use of the dot-immunogold assay for the rapid diagnosis of acute enteric infections / L.A. Dykman, V.A. Bogatyrev // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000. Vol. 27, № 2. P. 135–137.

11. Efstratiou, A. Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria / A. Efstratiou [et al.] // *J. Infect. Dis.* 2000. Vol. 181, Suppl 1. P. 138–145.
12. Engler, K. H. Rapid enzyme immunoassay for determination of toxigenicity among clinical isolates of corynebacteria / K.H. Engler, A. Efstratiou // *J. Clin. Microbiol.* 2000. Vol. 38, № 4. P. 1385–1389.
13. Faulk, W. An immunocolloid method for the electron microscope / W. Faulk, G. Taylor // *Immunochemistry.* 1971. Vol. 8. P. 1081–1083.
14. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in minodisperse gold suspension / G. Frens // *Nat. Phys. Sci.* 1973. Vol. 241, № 105. P. 20–21.
15. Hayat, M. A. (Ed.) *Colloidal Gold: Principles* / M.A. Hayat // *Methods and Applications* Academic Press, San Diego, CA. 1989. Vol. 1. 519 p.
16. Roth, J. The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry / J. Roth // In *Techniques in Immunocytochemistry* (Bullock, C. R., and Petrusz, P., Eds.) Academic Press, London. 1983. Vol. 2. P. 217–284.
17. Xiulan, S. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1 / S. Xiulan [et al.] // *Int. J. Food Microbiol.* 2005. Vol. 99, № 2. P. 185–194.