

ПРИМЕНЕНИЕ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В ФОРМАТЕ МИКРОЧИПА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ

Плотникова М.А., Клотченко С.А., Егоров В.В.,
Никуленков К.П., Васин А.В., Киселев О.И.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург

Резюме. В настоящей работе описан мультиплексный «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа в формате иммунологического микрочипа для количественной оценки белкового профиля экспрессии цитокинов. На примере IL-2, IL-4, IL-10 и TNF человека показана высокая специфичность метода, широкий диапазон измеряемых концентраций (от 30 до 20000 пг/мл) и высокая производительность. Представленный метод может быть в дальнейшем использован как в научных, так и клинических исследованиях.

Ключевые слова: цитокины, антитела, микрочип, иммунологический анализ.

Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Egorov V.V., Nikulenkov K.P., Vasin A.V., Kisselev O.I.

APPLICATION OF SOLID-PHASE, ENZYME-LINKED IMMUNOASSAYS IN MICROARRAY FORMATE FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF CYTOKINES

Abstract. Present work describes a multiplex “sandwich” approach to enzyme-linked, solid-phase immunosorbent assay designed in microarray formate, aiming for quantitative evaluation of individual profile of cytokine expression. Its high specificity, throughput and sensitivity (30 to 20,000 pg/mL) are demonstrated with human IL-2, IL-4, IL-10, and TNF assays. This diagnostic technique may be further used both for research applications and in clinical trials. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 4-5, pp 415-418)

Keywords: cytokines, antibodies, microarray, immunological analysis.

Введение

В последние 20 лет методы определения белкового профиля цитокинов интенсивно развивались и совершенствовались [2]. В настоящее время широко применяют такие методики, как иммуноферментный анализ (ИФА), проточная флуориметрия, вестерн-блоттинг, иммуногистохимия *in situ*, однако они имеют существенное ограничение по числу одновременно определяемых цитокинов в одной пробе. Этого недостатка лишен метод биологических микро-

чипов, позволяющий проводить одновременный анализ специфических взаимодействий сотен и даже тысяч молекул в одной реакции [1]. Существует два основных формата иммунологических микрочипов: 1) антигены, входящие в состав исследуемой иммобилизованной пробы, выявляют посредством специфического меченого антитела, или 2) иммобилизованные антитела связывают антигены в составе тотально меченой белковой пробы [3]. Во втором случае детекцию взаимодействия можно также проводить с помощью дополнительных меченых антител в формате двухстадийного «сэндвич»-варианта твердофазного ИФА. Такой подход обладает наиболее высокой чувствительностью, что чрезвычайно важно для детекции цитокинов, значимо экспрессирующихся даже в фемтомолярных концентрациях, и именно он был применен в данной работе.

Адрес для переписки:

197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова,
15/17.

Тел.: (812) 346-10-80.

Факс: (812) 234-59-73.

E-mail: vasin@influenza.spb.ru

Материалы и методы

Все использованные в работе рекомбинантные белки и моноклональные антитела производства BD Biosciences (США). Антитела ресуспендировали в 1 буфере «Protein Printing Buffer» (ArrayIt, США) до конечной концентрации 250 мг/мл и иммобилизовали на альдегидные слайды «VALS-25» (CEL Associates, Эстония) контактным способом на споттере «SpotBot 3» (ArrayIt, США) с помощью игл SMP3 (Telechem, США). После печати слайды оставляли в камере споттера на 1 час, затем облучали ультрафиолетом (0,09 Дж/см²) на кросслинкере «BioLink» (Biometra, Германия). Перед проведением анализа слайды инкубировали в фосфатно-солевом буфере (PBS) 1-2 минуты, накрывали рамкой «FAST» (Whatman, США) и помещали в гибридационную камеру «Chip Clip™» (Whatman,

США). Забивку слайда проводили 1% бычьим сывороточным альбумином (Sigma, США), растворенным в PBS, 30 минут. Здесь и далее все этапы инкубации и отмывок проводили при 37 °С на термошейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) при 250 об/мин. После забивки слайды отмывали в PBS 3 раза по 2 минуты. Стоковые растворы цитокинов разбавляли в PBS до необходимой концентрации (от 4 до 20000 пг/мл) и инкубировали с микрочипом 1 час, после чего отмывали в PBS 3 раза по 2 минуты. Далее слайды инкубировали со смесью биотинилированных антител в концентрациях 0,5 мкг/мл в PBS буфере 1 час, после чего отмывали в PBS 3 раза по 2 минуты. Затем слайды инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с цианиновым красителем Cy3 (Invitrogen, США), разведенным в PBS-T (PBS с добавлением Tween-20 до конеч-

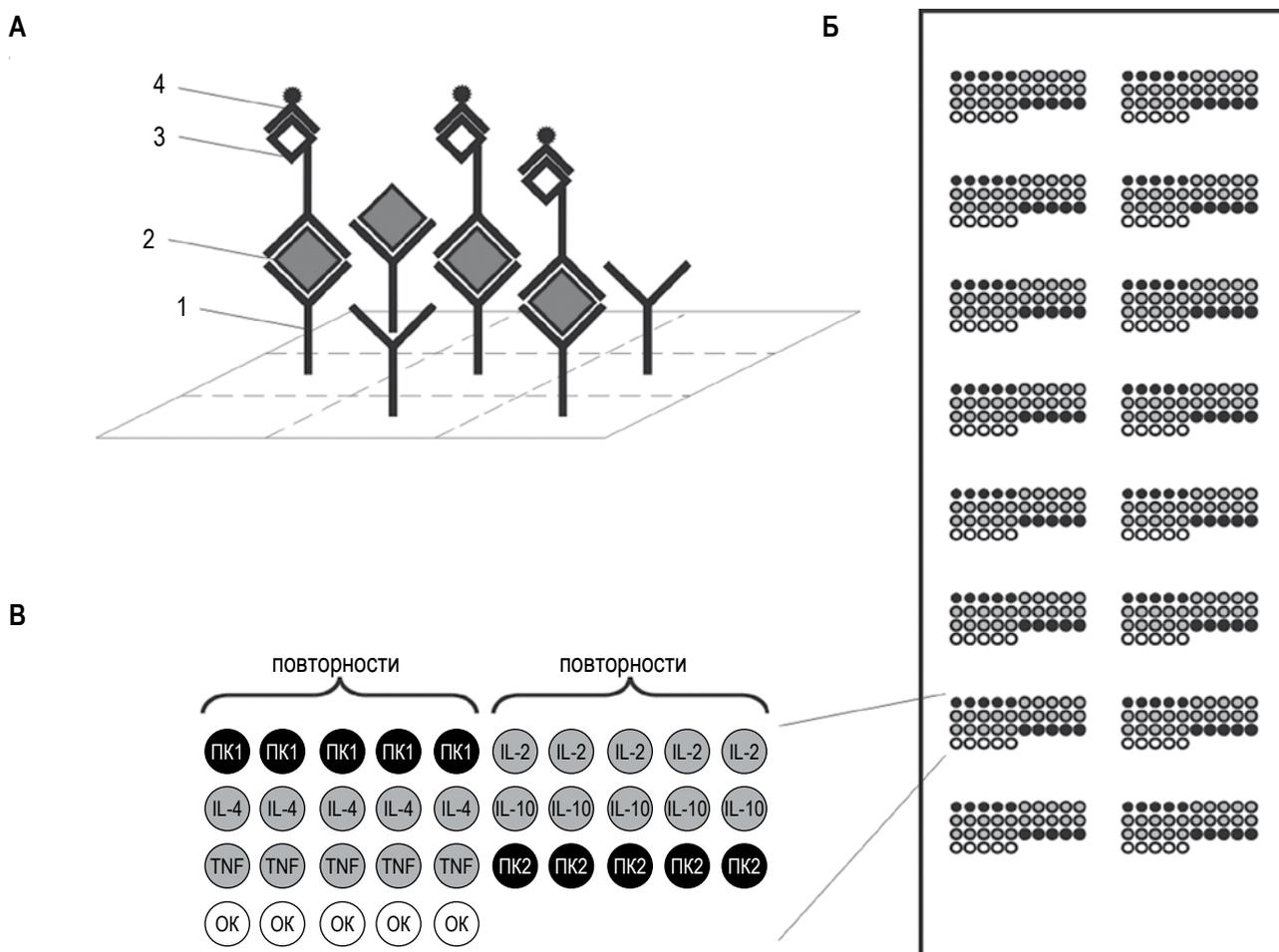


Рисунок 1. Микрочип для выявления цитокинов

Примечание. А – Схема проведения «сэндвич»-иммуноанализа на биочипе. 1 – моноклональное антитело, 2 – анализируемый антиген, 3 – биотинилированное моноклональное антитело, 4 – флуоресцентно меченый стрептавидин. Б – Общая схема микрочипа, состоящего из 16 идентичных массивов точек. Диаметр спота составляет 200 нм, расстояние между центрами соседних спотов – 300 нм, все споты нанесены в пяти повторностях. В – Схема отдельного массива микрочипа. PK1, PK2 – положительные контроли флуоресценции (Cy3-стрептавидин) и связывания со стрептавидином (биотинилированные антитела к IL-2 мыши). OK – отрицательный контроль (антитела к IFN γ мыши). IL2, IL-4, IL-10, TNF – моноклональные антитела к соответствующим цитокинам.

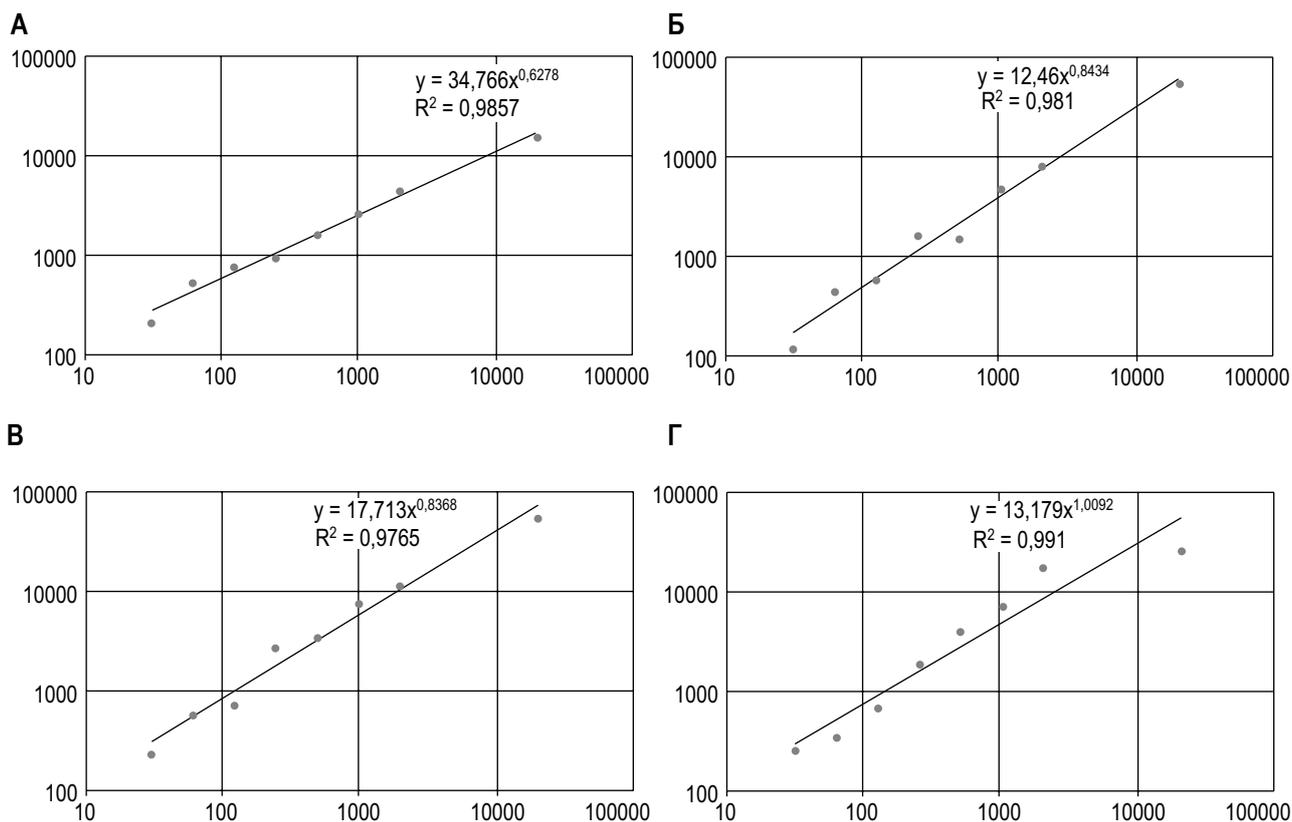


Рисунок 2. Стандартные кривые для IL-2 (А), IL-4 (Б), IL-10 (В) и TNF (Г), полученные с помощью иммунологического микрочипа в формате «сэндвич»-варианта твердофазного ИФА для мультиплексного определения цитокинов

Примечание. По оси x – концентрация цитокина (пг/мл), по оси y – интенсивность флуоресценции (ед.). Для визуального расширения линейной области графиков и последующего упрощения процедуры количественного анализа проведены логарифмирующие преобразования осей, используя логарифмическую шкалу.

ной концентрации 0,05%) в соотношении 1:50, 15 минут, после чего отмывали в PBS 3 раза по 2 минуты. Аккуратно снимали рамку и инкубировали слайд без рамки в 5 мл PBS 2 минуты, высушивали слайд центрифугированием при 300 г и сканировали на сканере «ScanArray Express» (PerkinElmer, США) с разрешением 5 мкм, при значениях РМТ равных 90, регистрацию сигнала проводили при длине волны 570 нм. Изображения обрабатывали в программе «ScanArray» (PerkinElmer, США).

Результаты и обсуждение

При разработке иммунологического микрочипа для определения цитокинов использовали IL-2, IL-4, IL-10 и TNF человека. Микрочип представлял собой стеклянный слайд с альдегидной подложкой, на котором в виде отдельных точек (спотов) в матричном порядке иммобилизовали антитела к IL-2, IL-4, IL-10 и TNF и необходимые контрольные образцы (рис. 1В). Каждый слайд состоял из 16 идентичных массивов, что позволяло одновременно анализировать до 16 различных проб (рис. 1Б). Микрочип последовательно инкубировали с содержащей ци-

токины пробой, моноклональными биотинилированными антителами и Cy3-стрептавидином (рис. 1А). Оптимальные концентрации антител и стрептавидина, составы буферов, количество отмывок и времена инкубаций подобраны экспериментально и подробно описаны в разделе «Материалы и методы». Для проверки специфичности метода микрочип инкубировали с IL-2, IL-4, IL-10 и TNF в концентрациях 60, 250 и 2000 пг/мл как по отдельности, так и в смеси в различных комбинациях. Качественная и количественная картины флуоресценции спотов, в которых произошло связывание цитокинов и антител, показали специфичность реакции. Уровень неспецифического связывания не превышал значений фонового сигнала. Для построения концентрационных зависимостей использовали смесь стоковых растворов IL-2, IL-4, IL-10 и TNF, которые титровали серией двухкратных разведений от 20000 до 30 пг/мл. На основе полученных значений стандартных кривых построили 4 калибровочных графика (рис. 2).

Полученные данные показывают, что представленный в работе иммунологический микрочип позволяет адекватно проводить мультиплекс-

ную количественную оценку уровня цитокинов и может быть использован в научных и клинических исследованиях.

Благодарности

Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-13734 и КНВШ Правительства Санкт-Петербурга.

Список литературы

1. Мирзабеков А.Д. Биочипы в биологии и медицине XXI века // Вестник Российской академии наук. – 2003. – 73 (5). – С. 412.

2. Сенников С.В., Силков А.Н. Методы определения цитокинов // Цитокины и Воспаление. – 2005. – 4 (1). – С. 22-27.

3. Spurriera В., Honkanenc Р., Holwayc А. et al. Protein and lysate array technologies in cancer research // Biotechnology Advances. – 2008. – Vol. 26, N 4. – P. 361-369.

поступила в редакцию 11.11.2011

отправлена на доработку 04.01.2012

принята к печати 12.01.2012