

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО ИММУНОГЛОБУЛИНА Е В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗНЫХ СПОСОБОВ АППРОКСИМАЦИИ ГРАДУИРОВОЧНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Таранова Н. А., Берлина А. Н., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б.

*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН (119071, Москва, Россия), e-mail: taranovana@gmail.com*

В работе показана возможность использования сигмоидальной и экспоненциальной аппроксимации градуировочной зависимости для получения количественных результатов иммунохроматографического определения содержания общего иммуноглобулина Е (IgE) в сыворотке крови человека. Исследование проведено с использованием разработанной иммунохроматографической тест-системы на основе квантовых точек в качестве детектируемого маркера. Установленные экспоненциальная и сигмоидальная зависимости позволяют работать в диапазоне определяемых содержаний общего IgE 5-1000 МЕ/мл. Предложенные для описания градуировочной зависимости уравнения были использованы для расчета содержания общего IgE в 22 пробах сыворотки крови пациентов от 18 до 60 лет с аллергическими заболеваниями. Полученные значения концентраций аналита характеризуются малым относительным стандартным отклонением (не более 17 %). Сопоставленные аппроксимации незначительно отличаются по характеристикам, что позволяет в равной степени использовать их для определения концентраций аналита.

Ключевые слова: общий иммуноглобулин Е, иммунохроматография, квантовые точки, аппроксимация.

## QUANTITATIVE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF TOTAL IMMUNOGLOBULIN E IN HUMAN SERUM WITH THE USE OF DIFFERENT APPROXIMATION TECHNIQUES OF CALIBRATION CURVE

Taranova N. A., Berlina A. N., Zherdev A. V., Dzantiev B. B.

*A.N. Bach Institute of Biochemistry Russian Acad. Sci. (119071, Moscow, Russia), e-mail: taranovana@gmail.com*

The possibility to use sigmoid and exponential approximation of calibration curve for obtaining quantitative results of immunochromatographic determination of total immunoglobulin E (IgE) in human serum is demonstrated. Developed immunochromatographic test-system is based on quantum dots application as detecting labels. The established sigmoid and exponential plots allow to work in dynamic range of total IgE 5-1000 U/mL. The equations, proposed to describe calibration curve, was used to calculate the content of total IgE in 22 serum samples of patients (18-60 years old) with allergic diseases. Obtained analyte values are characterized by low standard deviation ( $\leq 17\%$ ). Compared approximations differ insignificantly that allows use the both of them for determination of analyte content.

Key words: total immunoglobulin E, immunochromatography, quantum dots, approximation.

### 1. Введение

В настоящее время иммунохроматографический анализ (ИХА) широко используется в медицинской диагностике с целью определения онкомаркеров, гормонов, характеристики иммунного статуса человека и др. [5, 8, 9]. Благодаря экспрессности и простоте проведения ИХА нашел применение также при экологическом мониторинге окружающей среды [2], контроле качества продуктов питания [4]. Однако основным ограничением большинства иммунохроматографических тестов является качественная оценка содержания аналита в пробе: выше или ниже порогового уровня. В ряде случаев информативность и практическая значимость тестирования существенно возрастает при наличии количественных данных о содержании определяемого соединения. Некоторые фирмы предлагают в комплекте с тест-

полосками портативные устройства регистрации сигнала (IDEXX Laboratories (США), Drager (Германия), «Синтэко-Комплекс» (Россия)). Однако используемый при этом способ аппроксимации градуировочной кривой независимо выбирается разными производителями без представления в научной литературе экспериментальных обоснований принимаемого решения. При этом вид уравнения калибровочной кривой играет существенную роль в анализе, поскольку он влияет на характеристики тест-системы и точность определения аналита.

С учетом вышеизложенного, цель данной работы заключалась в сравнительной характеристике сигмоидальной и экспоненциальной аппроксимации градуировочной зависимости ИХА. Исследование было проведено на примере для определения уровня общего иммуноглобулина Е (IgE) в сыворотке крови человека с использованием квантовых точек в качестве детектируемого маркера.

## **1. Материалы и методы**

### **2.1. Реагенты**

В работе были использованы водорастворимые карбоксилированные квантовые точки состава CdSe/ZnS с полимерным покрытием (пик эмиссии при 625 нм) производства фирмы «Invitrogen» (США). Неионный детергент Твин-20 и бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Sigma» (США). Моноклональные антитела против иммуноглобулина Е человека – клон 4F4 фирмы «Полигност» (Россия) и ME-113 фирмы GeneTex (США) и поликлональные козы антитела против иммуноглобулинов G мыши фирмы «ИМТЕК» (Россия). Гидрохлорид N-(4-диметиламинопропил)-N'-этил-карбодимид (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимид натрия (sulfo-NHS) фирмы «Fluka» (Швейцария). Сефадекс G 100 фирмы «MP Biomedicals» (США). Все прочие реактивы фирмы «Химмед» (Россия). Все водные растворы готовили на деионизированной воде (18.2 МΩ·см при 25 °С, система «Simplicity» фирмы «Millipore» (США)).

Рабочие нитроцеллюлозные мембраны типа CNPC и предобработанные мембраны под образец (TYPE-GBF-R7L) фирмы «MDI» (India). Стекловолоконные крупнопористые мембраны для нанесения конъюгата с квантовыми точками (CFSP203000) и адсорбирующие мембраны (CFSP223000), а также ультрацентрифужные пробирки «Amicon Ultra 100 kDa» фирмы «Millipore» (США).

Сыворотки крови охарактеризовали методом ИФА с помощью коммерческого набора для определения содержания общего IgE («Total IgE HRP EIA») фирмы «Dr. Fooke» (Германия), согласно инструкции производителя.

### **2.2. Синтез конъюгата КвТ с антителами против IgE человека.**

Конъюгат синтезировали по модифицированной сукцинимидно-карбодиимидной методике [7] с мольным соотношением КвТ: антитела против IgE (клон ME-113) при синтезе, равным 1:10. Для удаления активаторов после синтеза использовали концентрирование с одновременным диализом против боратного буферного раствора, (50 мМ, рН 8,3) (ББ) с помощью микроцентрифужных пробирок Amicon Ultracel 100K при 10.000 g в течение 15 минут. После пятикратного центрифугирования собирали сконцентрированный в 10 раз конъюгат. Очистку конъюгата от свободных низкомолекулярных соединений и несвязавшихся антител проводили на гель-фильтрационных колонках с сорбентом Sephadex G-100, уравновешенным фосфатным буферным раствором (10 мМ, рН 7,4). Концентрация КвТ в конъюгате составила 4,8 мкМ. Полученные после гель-фильтрации фракции повторно подвергали концентрированию с одновременным диализом против ББ с помощью микроцентрифужных пробирок Amicon Ultracel 100K при 10.000 g в течение 15 минут. После последнего этапа центрифугирования конъюгат, сконцентрированный в 10 раз, собирали в микропробирку и хранили при 4 °С.

2.3. Изготовление тест-полосок для определения содержания общего IgE в сыворотках крови человека.

На нитроцеллюлозную мембрану CNPC 12 с помощью диспенсера IsoFlow («Image Technology», США) наносили в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, с 0,1 М хлорида натрия (ФБС), моноклональные антитела против IgE человека (клон 4F4), в концентрации 3 мг/мл для формирования тестовой зоны, и поликлональные антитела козы против IgG мыши, в концентрации 1 мг/мл для формирования контрольной зоны [3]. Расход растворов – 0,1 мкл на 1 мм мембраны. Раствор конъюгата антител с квантовыми точками (концентрация 10 нМ) наносили на стекловолоконную мембрану в ББ, содержащем 7,5 % бычьего сывороточного альбумина, из расчета 2 мкл на 1 мм мембраны. Мембраны оставляли при комнатной температуре на 20 часов до полного высыхания. После этого проводили сборку мультимембранного композита из рабочей нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными антителами, стекловолоконной крупнопористой мембраны (CFSP203000, glass fiber macroporous) с нанесенным конъюгатом, сепарирующей мембраны под образец (R7L) и адсорбирующей (CFSP223000) мембраны. Нарезку на отдельные тест-полоски шириной 3,5 мм проводили с использованием гильотинного нарезчика. Для дальнейшей работы тест-полоски были упакованы в пластиковые кассеты с окошком для внесения пробы и с осушителем (силикагелем) хранились в запаянных пакетах из ламинированной алюминиевой фольги.

2.4. Проведение иммунохроматографического определения содержания общего IgE в сыворотках крови человека.

Пробы сыворотки крови человека и тест-полоски перед проведением анализа доводили до комнатной температуры. В пробу объемом 100 мкл вносили 20 мкл 5 % раствора Твин-20. Тест-полоску располагали на горизонтальной поверхности и в окошко пластиковой кассеты помещали пробу. Через 10 мин после внесения пробы освещали тест-полоску УФ-светом и измеряли интенсивность флуоресценции в тестовой зоне с использованием портативного флуориметра «Рефлеком-УФ» с программным обеспечением «Видеотест» (фирма «Синтэко-Комплекс», Россия).

## 2. Результаты и обсуждение

Предложенный метод определения IgE основан на «сэндвич»-формате иммуноанализа. Содержащиеся в образце молекулы IgE связываются с антителами, мечеными КвТ. Под действием капиллярных сил сформированный комплекс движется вдоль мембран тест-полоски и взаимодействует с адсорбированными в тестовой зоне антителами против IgE человека.

Построение градуировочных зависимостей интенсивности флуоресценции в тестовой зоне от концентрации общего IgE проводилось с использованием стандартных растворов IgE с концентрациями 5, 20, 50, 100, 200, 1000 МЕ/мл (фирма «Dr. Foocke», Германия). По полученным с помощью ИХ тест-системы данным построены калибровочные зависимости аналитического сигнала (интенсивности флуоресценции в тестовой зоне) от концентрации общего IgE в пробе.

Было охарактеризовано влияние вида уравнения, используемого при аппроксимации градуировочной кривой, на результаты количественного анализа. Экспоненциальная зависимость аналитического сигнала ( $y$ ) от концентрации аналита в пробе ( $x$ ) описывается уравнением:

$$y = A \cdot \exp\left(-\frac{x}{B}\right) + y_0 \quad (1),$$

которое может быть преобразовано следующим образом:

$$-\frac{1}{B} x = \ln \frac{y - y_0}{A} \quad (2),$$

где  $A$  – асимптотическая величина сигнала аналитической зоны при больших концентрациях аналита;  $1/B$  – константа, описывающая наклон линейной зависимости после линеаризирующего преобразования;  $y_0$  – константа, введенная для учета фонового сигнала в отсутствие аналита [1].

На рис. 1 представлены полученные экспериментальные данные и экспоненциальное приближение градуировочной кривой. Аппроксимирующая функция имеет вид:

$$y = -9,8 \cdot \exp\left(-\frac{x}{425}\right) + 10,1 \quad (3)$$

При этом значение коэффициента детерминации ( $R^2$ ) составляет 0,995, т.е. уравнение экспоненты достаточно точно описывает градуировочную кривую.

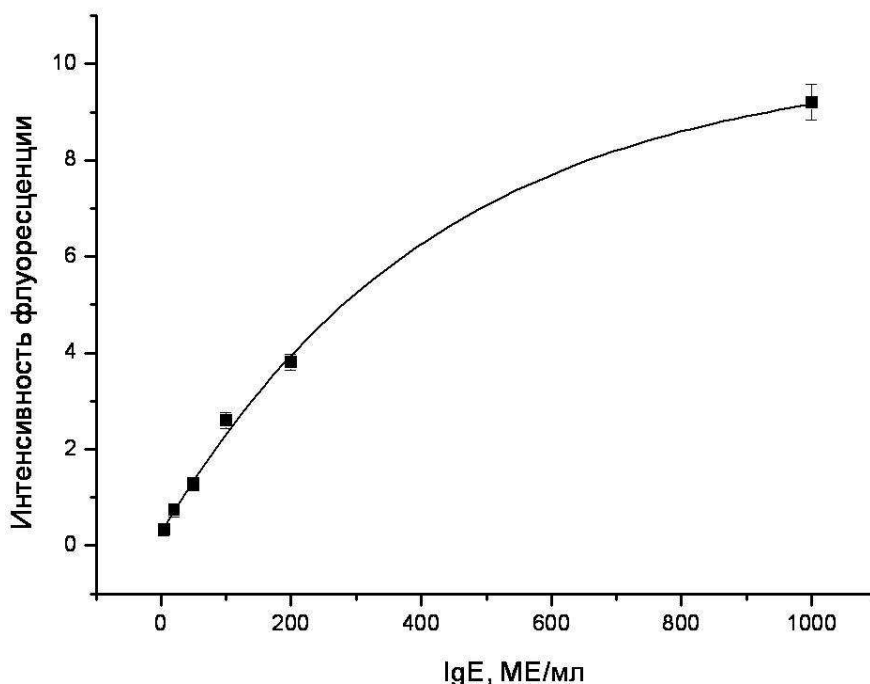


Рисунок 1. Градуировочная зависимость интенсивности флуоресценции в тестовой зоне от концентрации общего IgE в линейных координатах

Зависимость аналитического сигнала ( $y$ ) от концентрации аналита ( $x$ ) в полулогарифмических координатах описывается четырехпараметрической сигмоидальной функцией:

$$y = \left( \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \right) + D \quad (4)$$

где  $A$  – значение сигнала при нулевой концентрации аналита;  $B$  – коэффициент Хилла;  $C$  – концентрация аналита при половине амплитуды сигнала;  $D$  – значение сигнала при максимальной концентрации аналита [6].

Уравнение этой зависимости, представленной на рис. 2, имеет вид:

$$y = \left( \frac{0,154 - 15,4}{1 + \left(\frac{x}{674,8}\right)^{0,930}} \right) + 15,4 \quad (5)$$

Значение коэффициента детерминации ( $R^2$ ) составляет 0,996, что также подтверждает высокую точность аппроксимации, значимо не отличающуюся от первого приближения.

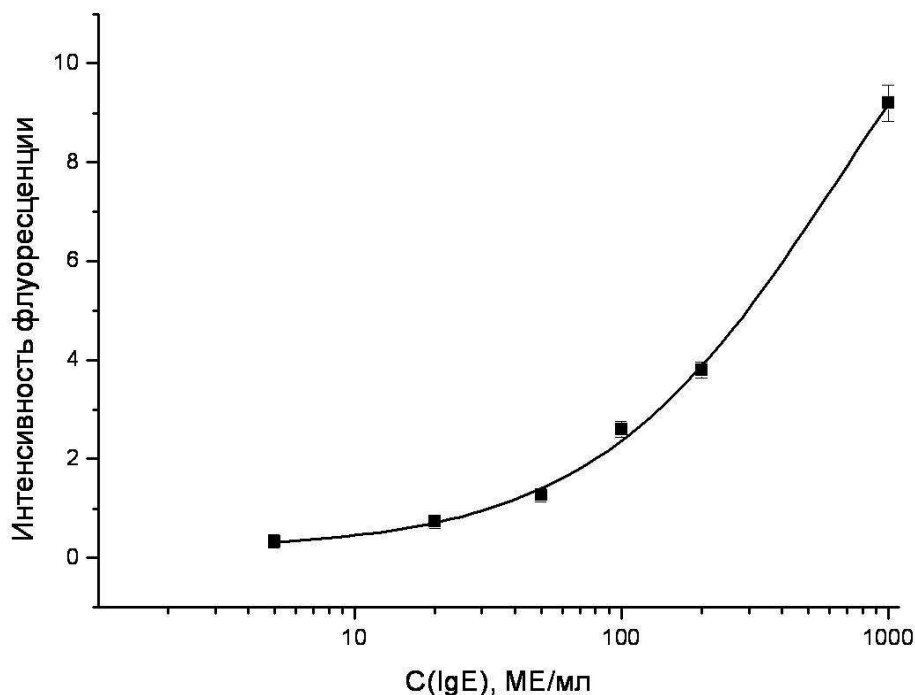


Рисунок 2. Градуировочная зависимость интенсивности флуоресценции в тестовой зоне от концентрации общего IgE в полулогарифмических координатах

Предложенные для описания градуировочной зависимости уравнения (3) и (5) были использованы для расчета содержания общего IgE в 22 пробах сыворотки крови пациентов от 18 до 60 лет с аллергическими заболеваниями. В табл. 1 представлены концентрации, определенные методами ИХА с двумя вариантами обработки данных и ИФА. Согласно инструкции коммерческого набора ИФА для аппроксимации калибровочной кривой и определения концентраций IgE рекомендуется использовать четырехпараметрическую сигмоидную функцию.

Таблица 1. Концентрации IgE в пробах сыворотки крови, полученные с помощью ИФА и ИХА, МЕ/мл

№	ИФА	ИХА	
	Аппроксимирующая функция		
	Сигмоида	Экспонента	Сигмоида
1	303±14	280±11	296±13
2	135±19	133±8	132±9
3	313±35	315±25	336±29
4	1757±38	н/о	1621±37

5	418±51	394	428
6	419±59	428±16	467±19
7	427±9	342±13	368±16
8	331±22	280±11	296±13
9	208±21	200±15	205±16
10	975±32	748±35	800±32
11	341±30	288	305
12	285±6	292±18	310±21
13	1200±221	1202±643	1153±122
14	580±27	399±8	434±9
15	73±0,1	70±4	67±4
16	67±10	65±10	62±10
17	119±20	107±4	105±4
18	29±7	26±3	26±3
19	937±26	845±22	884±18
20	92±2	72±7	69±7
21	51±9	45±3	43±3
22	958±135	862±46	897±36

На рис. 3 представлена корреляция значений содержания IgE в образцах сыворотки крови, полученных с помощью ИФА ИХА. При использовании в случае ИХА экспоненциальной функции корреляция результатов ИФА (x) и ИХА (y) описывается линейным уравнением:

$$y = -0,67 + 0,896 \cdot x \quad (R^2 = 0,986) \quad (6),$$

а при использовании сигмоиды – линейным уравнением:

$$y = 5,92 + 0,915 \cdot x \quad (R^2 = 0,995) \quad (7)$$

В целом уравнение (7) отражает лучшее соответствие результатов измерений двумя методами, хотя и свидетельствует о завышенных результатах ИХА при низких концентрациях аналита.

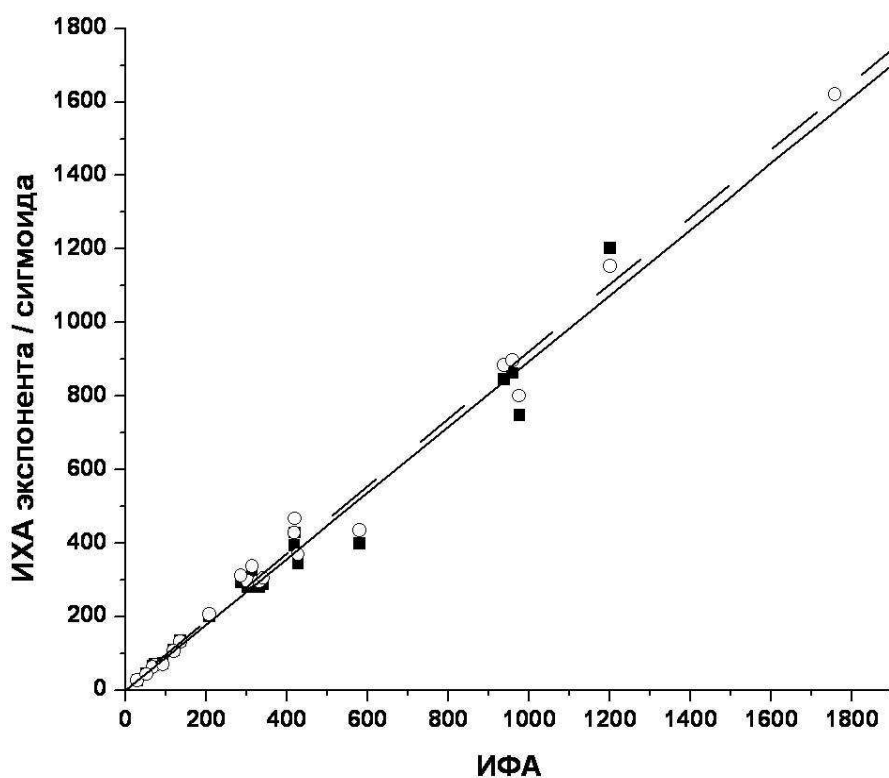


Рисунок 3. Корреляция значений содержания IgE (МЕ/мл) в пробах сыворотки крови, определенных методами ИФА и ИХА с двумя способами аппроксимации: белые круги и пунктирная линия – при использовании четырехпараметрического сигмоидального уравнения; черные квадраты и сплошная линия – экспоненциальной зависимости

На рис. 4 представлена корреляционная зависимость между значениями концентрации, полученными с использованием двух видов аппроксимации данных ИХА. Линейное уравнение, описывающее корреляцию результатов экспоненциальной (x) и сигмоидальной (y) аппроксимации, имеет вид:

$$y = 10,4 + 1,01 \cdot x \quad (R^2 = 0,998) \quad (8)$$

Экспоненциальная зависимость позволяет достоверно определять низкие и средние значения концентраций аналита (5-900 МЕ/мл), охватывающие основной диапазон вариации содержания IgE в сыворотках крови человека. В свою очередь, четырехпараметрическое сигмоидное уравнение хорошо описывает и более высокие концентрации, выходящие за номинальный рабочий диапазон тест-системы (5-1600 МЕ/мл).



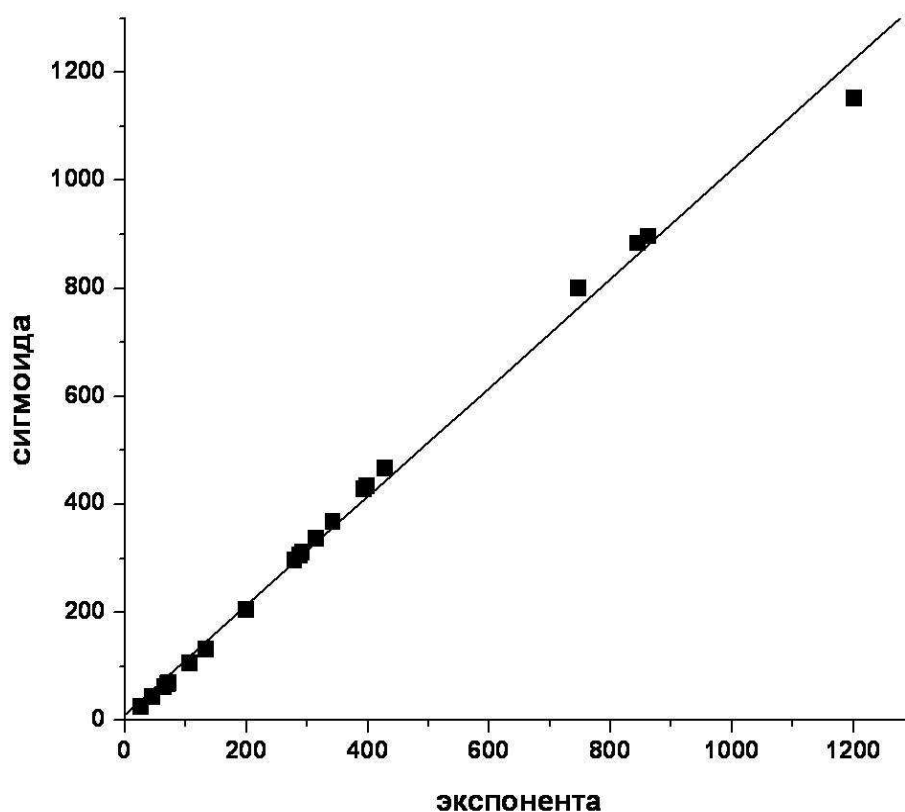


Рисунок 4. Корреляция значений концентраций IgE (МЕ/мл), полученных с использованием при аппроксимации экспоненциального и сигмоидального уравнения

### 3. Выводы

Показана возможность использования двух вариантов аппроксимации градуировочной кривой для определения содержания общего IgE в сыворотке крови человека, с помощью разработанной иммунохроматографической тест-системы на основе КвТ. Установленные экспоненциальная и сигмоидальная зависимости позволяют работать в диапазоне определяемых содержаний общего IgE 5-1000 МЕ/мл. Значения концентраций аналита, полученные с помощью данных способов аппроксимации, характеризуются малым относительным стандартным отклонением (не более 17 %). Предложенные варианты аппроксимации незначительно отличаются по характеристикам, что позволяет в равной степени использовать их для определения концентраций аналита в пробе.

### Список литературы

1. Голубев С. С. Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов // Законод. прикл. метрол. — 2012. — № 4. — С. 29–32.
2. Vyzova N. A. Immunochromatographic assay with photometric detection for rapid determination of the herbicide atrazine and other triazines in foodstuffs // J. AOAC Int. — 2010. — Vol. 93, № 1. — P. 36–43.

3. Byzova N. A. Pretreatment-free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin and its application to the control of milk and dairy products // *Anal. Chim. Acta* / — 2011. — Vol. 701, № 2. — P. 209–217.
4. Delmulle B. S. Development of an immunoassay-based lateral flow dipstick for the rapid detection of aflatoxin B1 in pig feed // *J Agric. Food Chem.* — 2005. — Vol. 53, № 9. — P. 3364–3368.
5. Hauck T. S. Nanotechnology diagnostics for infectious diseases prevalent in developing countries // *Adv. Drug Del. Rev.* — 2010. — Vol. 62, № 4–5. — P. 438–448.
6. Kurganov B.I. Criterion for Hill equation validity for description of biosensor calibration curves // *Anal. Chim. Acta.* — 2001. — Vol. 427, № 1.— P. 11–19.
7. Liškova M. Conjugation reactions in the preparations of quantum dot-based immunoluminescent probes for analysis of proteins by capillary electrophoresis // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2011. — Vol. 400, № 2— P. 369–379.
8. Tothill I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis // *Seminars in Cell & Devel. Biol.* — 2009. — Vol. 20, № 1. — P. 55–62.
9. Wong R., Tse H. Lateral flow immunoassay. — N.Y.: Humana Press. — 2009. — 223 p.

*Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы», государственный контракт от 12 июля 2011 г. № 16.512.11.2229).*

*Авторы статьи выражают благодарность А. И. Мартынову и М. Н. Санкову (Институт иммунологии ФМБА России, Москва) за предоставленные пробы сывороток крови пациентов с аллергическими заболеваниями и полезное обсуждение результатов.*

#### **Рецензенты:**

Ерёмин Сергей Александрович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимических методов анализа кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Московский государственный университет, г. Москва.

Венгеров Юрий Юзефович, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник Института биохимии им. А. Н. Баха РАН, г. Москва.