УДК: 619:616-078:57.083.33:636.52/.58

МЕТОДИ СТАБІЛІЗАЦІЇ АНТИВИДОВОГО ІМУНОПЕРОКСИДАЗНОГО КОН'ЮГАТУ ПРОТИ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ G КУРЕЙ

Стегній Б. Т., Музика Д. В., Усова Л. П.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Коломієць Ю. В.
Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

У статті наведені результати вивчення впливу різних хімічних речовин-стабілізаторів пероксидази та температурних режимів зберігання на якість кон'югатів. Встановлено, що додавання в якості стабілізатору гліцеролу до 50 % призводить до підвищення рівня фонового забарвлення у 10,6 разів у порівнянні з контролем; додавання 0,01 % мертиоляту – до зниження чутливості реакції; зберігання кон'югату у 0,1 М фосфатному буфері pH 7,5 з 0,15 М хлориду натрію за температури 4 °С призводить до зниження активності кон'югату через 5 місяців. Найкращі результати отримано при використанні стабілізатору пероксидази виробництва KPL (США): активність кон'югату наприкінці досліджень становила 83,8 % від вихідних показників. Оптимальним методом стабілізації кон'югату нами визнано використання стабілізатору пероксидази виробництва KPL та зберігання за температури 4 °С.

Ключові слова: *пероксидаза, кон'югат, стабілізатор пероксидази*

Чутливість тест-систем ІФА значною мірою залежить від кон'югатів білок–фермент, у яких білок зберігає імунологічну активність і не відбувається інактивація ферменту. Однак, зазвичай, зберігання розчинів білків (у тому числі кон'югатів антитіл з пероксидазою), супроводжуються їх денатурацією, що призводить до втрати каталітичної активності ферменту та зменшення здатності антитіл зв'язуватись із антигенами [1].

Виробництво антивидових імунопероксидазних кон'югатів включає отримання імунологічно чистих Ig G, контролювання їх чистоти, проведення ними імунізації тварин, одержання антивидових антитіл і здійснення їх кон'югації з ензимом [2]. Оскільки процес отримання кон'югату є складним і довготривалим, а за рахунок високої активності для постановки однієї реакції використовується незначна його кількість, є актуальним правильний вибір умов зберігання . За літературними даними типовими стабілізаторами для кон'югатів з пероксидазою є 0,1 М фосфатний буфер pH 6,5 з 0,15 М хлориду натрію, 5 % БСА, 0,5 мг/мл цитохром С, 0,002 % гентаміцина сульфат і 0,0035 % хлоргексидин або 0,01 % мертиолят, гліцерол до 50 %. Зберігати кон'югати рекомендовано за температури (2–8) °С або замороженими (бажано, за мінус 70 °С) [3]. Також є комерційні розчини-стабілізатори пероксидази, зокрема, виробництва фірми KPL (США). Виробник гарантує збереження до 90 % початкової активності кон'югату протягом місяця та до 75 % – протягом року за температури (2–8) °С [4].

Метою досліджень було вивчення впливу різних хімічних речовин-стабілізаторів пероксидази та температурних режимів зберігання на якість кон'югатів.

Матеріали та методи. Дослідження проводили з використанням імунопероксидазного кон'югату проти Ig G курей власного виробництва та комерційного препарату виробництва НДІЕМ ім. Гамалеї (Росія). У своїй роботі для зберігання кон'югату ми застосовували наступні методи: внесення гліцеролу до 50 % та зберігання за температури мінус 20 °С; додавання 0,01 % мертиоляту та зберігання за температури 4 °С; розчинення ліофільно висушеного кон'югату у 0,1 М фосфатному буфері pH 7,5 з 0,15 М хлориду натрію та подальше зберігання за температури 4 °С; розчинення ліофільно висушеного кон'югату у стабілізаторі пероксидази виробництва KPL та подальше зберігання за температури (2–8) °С.

Результати досліджень. Активність кон'югатів проти Ig G курей, що зберігались за різних умов, досліджували в реакції ІФА за оптичною щільністю позитивної та негативної контрольних сироваток. В якості консервантів кон'югату власного виробництва застосовували гліцерол до 50 % та 0,01 % мертиолят (таблиця 1).

Таблиця 1 – Активність імунопероксидазних кон'югатів проти Ig G курей при додаванні гліцеролу та мертиоляту

Оптична щільність	Консервант	
	Гліцерол до 50 %	0,01% мертиолят
Позитивних контролів (M±m)	1,311±0,046	0,318±0,026
Негативних контролів (M±m)	0,626±0,049	0,092±0,004
Фонового забарвлення при внесенні кон'югату (M±m)	0,467±0,070	-
Фонового забарвлення без кон'югату (M±m)	0,044±0,003	-

Примітка: - не визначали

При використанні в якості консерванту 0,01 % мертиоляту відзначали низькі показники оптичної щільності позитивної контрольної сироватки (0,318±0,026), що свідчило про зниження чутливості реакції. Різниця між середніми значеннями оптичної щільності позитивної та негативної сироватки становила 0,226 при мінімально припустимому значенні цього показника – (0,450–0,500). Співвідношення позитивної та негативної сироваток (S/P співвідношення) становило (1,495±0,075), тоді як оптимальним є (3–5).

При додаванні до імунопероксидазного кон'югату проти Ig G курей 50 % гліцеролу спостерігали високий рівень фонового забарвлення у лунках з кон'югатом (0,467±0,070), що у 10,6 разів перевищує фонове забарвлення у лунках без кон'югату (0,044±0,003). Оптична щільність негативного контролю була вища за максимально припустиму (0,150) і становила (0,626±0,049).

Таким чином, за даними, наведеними у таблиці 1, робимо висновок про непридатність 50 % гліцеролу та 0,01 % мертиоляту в якості стабілізаторів кон'югату за наших умов постановки ІФА.

У наступних дослідах використовували комерційний антивидовий кон'югат проти Ig G курей, виробництва НДІЕМ ім. Гамалеї (робоче розведення 1:6000), який зберігали у 0,1 М фосфатному буфері pH 7,5 та у стабілізаторі пероксидази виробництва фірми KPL (США) за температури 4 °С. При постановці ІФА спостерігали за зміною його активності за показниками оптичної щільності позитивної та негативної контрольних сироваток. Результати спостережень наведені в таблицях 2 та 3.

Таблиця 2 – Активність імунопероксидазного кон'югату проти Ig G курей (НДІЕМ ім. Гамалеї), при зберіганні у 0,1 М фосфатному буфері pH 7,5 за температури 4 °С

Термін зберігання, місяці	Оптична щільність	
	Позитивних контролів (n=4) M±m	Негативних контролів (n=4) M±m
на початок дослідження	0,508±0,029	0,063±0,001
2	0,527±0,016	0,081±0,002
3	0,550±0,002	0,056±0,009
4	0,516±0,028	0,039±0,007
5	0,286±0,002	0,043±0,003

За результатами досліджень, наведеними у таблиці 2, видно, що активність імунопероксидазного кон'югату при зберіганні у 0,1 М фосфатному буфері pH 7,5 за температури 4 °С залишалася на одному рівні (показники оптичної щільності позитивних контрольних сироваток становили від 0,508 до 0,550) протягом чотирьох місяців. На п'ятий місяць від початку досліджень спостерігалось різке зниження показників оптичної щільності позитивних контрольних сироваток (у середньому в 1,84 рази) у порівнянні з попередніми результатами, що свідчить про зниження активності кон'югату. Таким чином, за результатами досліджень встановлено, що зберігання імунопероксидазного кон'югату у 0,1 М фосфатному буфері pH 7,5 за температури 4 °С протягом 4 місяців не впливає на його активність. При більш довготривалому зберіганні кон'югату за таких умов відбувається зниження його активності, що може призводити до хибних результатів ІФА або, навіть, до відсутності забарвлення при внесенні субстрату. У випадку, коли доводиться використовувати кон'югат, що зберігався більш тривалий час, необхідно проводити визначення його активності.

Таблиця 3 – Активність імунопероксидазного кон'югату проти Ig G курей (НДІЕМ ім. Гамалеї), при зберіганні у стабілізаторі пероксидази KPL (США) за температури 4 °С

Термін зберігання, місяці	Оптична щільність	
	Позитивних контролів (n=6) M±m	Негативних контролів (n=6) M±m
на початок дослідження	0,564±0,057	0,084±0,008
2	0,550±0,042	0,085±0,005
3	0,481±0,036	0,111±0,009
4	0,441±0,021	0,087±0,003
5	0,495±0,036	0,078±0,003

При зберіганні розчину кон'югату у стабілізаторі пероксидази виробництва KPL за температури 4 °С (таблиця 3) протягом двох місяців активність його становила 97,5 % від початкової (показники оптичної щільності позитивних контрольних сироваток

0,550±0,042). Протягом подальшого терміну спостережень рівень активності кон'югату коливався у межах 78,2–87,8 % і становив у середньому 83,8 % від вихідних показників.

Таким чином, нами встановлено, що використання стабілізатору пероксидази виробництва KPL (США) для зберігання імунопероксидазних кон'югатів забезпечує високий рівень їх активності протягом п'яти місяців (термін спостережень).

Висновки. 1. Встановлено, що додавання в якості стабілізатору гліцеролу до 50 % призводить до підвищення рівня фонового забарвлення у 10,6 разів у порівнянні з контролем; додавання 0,01 % мертиоляту – до зниження чутливості реакції; зберігання кон'югату у 0,1 М фосфатному буфері рН 7,5 з 0,15 М хлориду натрію за температури 4 °С призводило до зниження активності кон'югату через 5 місяців.

2. При використанні стабілізатору пероксидази виробництва KPL (США) активність кон'югату наприкінці досліджень становила 83,8 % від вихідних показників.

3. Оптимальним методом стабілізації кон'югату визнано використання стабілізатору пероксидази виробництва KPL та зберігання за температури 4 °С.

Список літератури

1. Guire P. Stability issues for protein-based in vitro diagnostic products[Text] / P.Guire // IVD Technology. – 1999. – V5. N2. – P68-71.
2. Фримель Г. Иммунологические методы. [Текст] – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
3. Теория и практика иммуноферментного анализа [Текст] / А.М. Егоров, О.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Высшая школа, 1991. – 288 с.
4. Stabilization of Peroxidase Conjugates in HRP Stabilizer. Technical Service Report [Electronic resourse] – Electronic data. — Mode of access: World Wide Web: https://www.kpl.com/catalog/productdetail.cfm?Catalog_ID=1&Category_ID=261&Product_ID=591 (viewed on December 25, 2015). – Title from the screen.

METHODS OF ANTISPECIFIC IMMUNOPEROXIDASE CONJUGATE STABILIZATION AGAINST CHICKENS' IMMUNOGLOBULINS G

Stegniy B. T., Muzyka D. V., Usova L. P.
National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Kolomiets Yu. V.
National University of Pharmasy, Kharkiv, Ukraine

Objective: studies of different chemical substances-stabilizers of peroxidase and temperature regimes of storage on conjugates' quality.Materials and methods: glycerol making up to 50% and storage at the temperature -20 °C; addition of 0,01% of thiomersal and storage at the temperature 4°C; dilution of freeze-dried conjugate in 0,1 M phosphate buffer pH 7,5 with 0,15 M sodium chloride and storage at the temperature 4°C; dilution of freeze-dried conjugate in peroxidase stabilizer manufactured by KPL and storage at the temperature 4°C. Використовували own manufactured immunoperoxidase conjugate against chicken Ig G has been used as well as commercial product manufactured by Gamaleya RIEM (Russia).

Conclusions. It has been found that addition of glycerol as a stabilizer up to 50 % leads to increasing of background staining 10,6 times in comparison with control; addition of 0,01% thiomersal –to decrease of reaction sensibility; conjugate storage at the temperature 4°C in 0,1 M phosphate buffer pH 7,5 with 0,15 M sodium chloride resulted decreasing of conjugate activity 5 months later. The best results were obtained using peroxidase stabilizer manufactured by KPL: conjugate activity in the end af studies reached 83,8% from baseline. Using peroxidase stabilizer manufactured by KPL and storage at the temperature 4°C has been acknowledged by us as an optimal method.

Keywords: *peroxidase, conjugate, peroxidase stabilizer*