

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут молекулярної біології та генетики

На правах рукопису

ПАНАСЮК
Тетяна Леонідівна

**ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИГЕН-АНТИТІЛО ВЗАЄМОДІЇ
ПРИ ВИКОРИСТАННІ БІОАФІННИХ ТА БІОМІМІЧНИХ
ПОЛІМЕРІВ**

03.00.03 – молекулярна біологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 1997



00752327 (Q)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у

інформації Інституту молекулярної біології та генетики НАН України
(м.Київ).

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Г.В.Єльська

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
М.Я. Співак
доктор хімічних наук,
Ю.В.Танчук

Провідна установа:

Київський Університет ім. Тараса Шевченка
кафедра мікробіології та загальної
іммунологіїЗахист дисертації відбудеться 22 квітня 1997 р. о 10⁰⁰ год. на
засіданні спеціалізованої ради Д 01.86.01 Інституту молекулярної біології
та генетики НАН України за адресою: 252143, м.Київ-143, вул.
Заболотного, 150.Автореферат дисертації розіслано 21 березня 1997 р.Вчений секретар
Спеціалізованої Ради
кандидат біологічних наук

Лукаш Л.Л.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Молекулярне розпізнання є однією із сучасних проблем у цілому ряді наукових галузей, що включають молекулярну біологію, біохімію, фізику тощо. Класичним і найбільш вивченим прикладом є розпізнання субстрату відповідним ферментом. В останні десятиріччя поряд з продовженням робіт у цьому напрямку отримали широке розповсюдження дослідження по вивченню механізмів молекулярного розпізнання при взаємодії антиген-антитіло та рецептор-ліганд. Вивчення взаємодії компонентів імунохімічних реакцій має особливе значення оскільки ця реакція знайшла широке застосування не тільки при фундаментальних дослідженнях, а й при діагностиці різноманітних захворювань за рахунок високої специфічності та селективності природних антитіл, які виробляються практично до всіх речовин, що мають не одну антигенну детермінанту. Методи, що використовуються для реєстрації імунореакції працюють та потребують складного і дорогоцінного обладнання [Tijssen P., 1983]. Багато лабораторій світу працюють над проблемою їх спрощення, що особливо важливо при масовому скринінгу. Одним з перспективних підходів вважається створення імуносенсорів. Більшість таких пристроїв базується на непрямій діагностиці антиген-антитіло взаємодії, де один із компонентів імунореакції мічений [Shmid R.D., 1988]. Саме ця мітка і генерує безпосередньо (електрохімічно-активна) чи при додатковій хімічній реакції (ферментна) сигнал. Така реєстрація має як певні переваги, так і свої недоліки. Великий інтерес викликає завдання створення методів та пристроїв для прямої реєстрації компонентів імунологічної реакції. Але за рахунок малих змін у результаті цієї взаємодії такий підхід не отримав широкого розповсюдження. Вирішення цієї задачі можливо через гармонійне поєднання фізико-хімічних властивостей

СВІДІВКА
ІВ. В. Стефаніка
АН України

полімерних плівок, електродів тощо з високою специфічністю антиген-антитіло взаємодії.

Поряд з природними рецепторними структурами (фермент, антитіло тощо), які використовуються при вивченні молекулярного розпізнання, великий інтерес викликає створення, так званих, біомімічних полімерів, що здатні до моделювання рецепторної функції білків [Wulff G., 1995]. Перевагами такого підходу, перш за все, є їх висока стабільність та можливість створення структур з високою афінністю практично до будь-якої речовини. Так, використовуючи методи хімічного конструювання полімерних матеріалів можна отримати полімерні структури, що здатні до імітації активного центру антитіл. Проте ці дослідження знаходяться на початковому етапі розвитку.

Отже, актуальним є розробка підходів експресної реєстрації антиген-антитіло взаємодії, використовуючи властивості біоафінних полімерних плівок та мембран, що імітують активний центр антитіл специфічних до гаптенів.

Мета та задачі дослідження. Метою даної роботи була розробка підходів реєстрації антиген-антитіло взаємодії на основі процесу формування сенсорного відгуку при застосуванні біоафінних та біомімічних мембран.

Основними завданнями роботи були:

1) Пошук біосумісних полімерів та умов формування пористих мембран з метою подальшого використання їх для реєстрації антиген-антитіло взаємодії.

2) Вивчення шляхів іммобілізації антитіл на поверхні отриманих полімерів.

3) Розробка підходів аналізу імунохімічних реакцій за допомогою гідрофільних та гідрофобних мембран.

4) Вивчення можливого механізму формування сенсорного відгуку, що індукується при Ag-At взаємодії на поверхні полімерних плівок.

5) Вивчення шляхів отримання біомімічних мембран, що моделюють рецепторну структуру антитіл.

6) Аналіз природи субстратної специфічності полімерів, сформованих матричною полімеризацією на основі вивчення їх сенсорного відгуку.

Наукова новизна та практична цінність роботи

В роботі вперше:

- проведено дослідження можливостей використання біоафінних мембран для детекції компонентів імунної реакції, один з яких фіксований в пористій структурі полімеру.

- запропоновано спосіб регуляції топохімії процесу іммобілізації антитіл (антигенів), який надав можливість підвищити чутливість аналізу за рахунок локалізації проходження імунореакції саме в порах мембрани.

- використано пористу поверхню полімерних гідрофільних та гідрофобних плівок як основу чутливого елемента при реєстрації антиген-антитіло взаємодії; створено лабораторну модель імуного сенсору на основі зазначених вище біоафінних матеріалів.

- вивчено шляхи отримання полімерів, що імітують рецепторну структуру антитіл, на основі фотополімеризуючих композицій; створено лабораторну модель матричного сенсору для визначення концентрації L-Phe-OEt.

Практична цінність роботи полягає у тому, що отримані в ній результати свідчать про принципову можливість створення макетів та промислових варіантів імуних сенсорів прямої дії для визначення концентрацій різноманітних антигенів як у медичній практиці, так і при проведенні екологічного моніторингу

навколишнього середовища, зокрема, для аналізу γ -глобулінів, гербіцидів тощо у водних та фізіологічних розчинах. Вони можуть бути основою при розробці та налагодженні промислового випуску вимірювальних приладів для біохімічної діагностики.

Апробація роботи. Результати досліджень доповідались на 9-й міжнародній конференції по СНІДу (Берлін, Німеччина, 1993), ICOM (Хайдельберг, Німеччина, 1993), спільній робочій нараді "Німеччина-СНД" (Мюнстер, Німеччина, 1993), 7-ому міжнародному симпозіумі "Синтетичні мембрани в науці та промисловості" (Тюбінген, Німеччина, 1994), конференції "Євросенсори VIII" (Тулузи, Франція, 1994), симпозіумі "Євромембрани '95" (Басс, Англія, 1995). Прийняті тези на 3-й міжнародний симпозіум "Євромембрани '97" (Твенте, Голландія, 23-27 червня, 1997).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 11 робіт у вітчизняних та іноземних журналах.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, еспериментальної частини, яка включає виклад результатів та обговорення з використанням 29 ілюстрацій та 5 таблиць, висновків, а також списку літератури, який складається із 153 публікацій.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В роботі використовували такі реактиви: метил-п-толуолсульфонат-1-циклогексил-3-(2-морфоліно-4-етил)карбодіімід, Твін-20, Твін-80, 25 % розчин глутарового альдегіду (ГА) ("Serva", Німеччина); сироватковий альбумін бика (БСА) та імуноглобулін G кроля (IgG) (ДІАМ Лтд., Москва, Росія), антитіла кози

проти імуноглобуліну G кроля (анти-IgG), пероксидазний коньюгат антитіл кози проти імуноглобуліну G кроля (Sigma, США); поліакрилонітрильна (ПАН-100) та полівінілхлоридна мембрани (ПВХ) від "Хімволокно" (Санкт-Петербург, Росія); акрилонітрил (АН), акрилова кислота (АК), диметилформамід (ДМФА) виробництва заводу хімічних реактивів м. Шостки (Україна), гліциділметакрилат (ГМА) Інституту мономерів для синтетичного каучука (м. Ярославль, Росія), олігоуретанакрилат (Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України).

Формування мембран здійснювали відливкою з полімерного розчину, який потім при формуванні мокрим способом осаджували в рідинах (нерозчинниках), або висушували на повітрі при формуванні мембран сухим способом.

Розділюючі характеристики мембран встановлювали за швидкостями трансмембранного потоку при переході від низьких до більш високих робочих тисків із застосуванням ультрафільтраційної комірки.

Для створення біоафінних полімерів використовували три способи іммобілізації антитіл на їх поверхню: ацилювання в присутності карбодііміду (карбодіімідний спосіб), глутаральдегідний спосіб та іммобілізацію за рахунок адсорбційної взаємодії білка і полімера-носія.

Для оцінки ефективності іммобілізації імуноглобулінів на поверхні полімерних мембран проводили метод прямого твердофазного імуноферментного аналізу з використанням полімерних мембран як твердої фази.

Кондуктометричні вимірювання проводили в електрохімічній клітині, яка була розділена синтетичною полімерною мембраною. В одну з комірок клітини вводили речовину, що тестується (IgG, тріазин, L-Phe-OEt, тощо) в різних концентраціях. Взаємодія цих речовин з модифікованою поверхнею полімерної мембрани викликала зміну її електропровідності. Неспецифічний вихідний сигнал,

контролювали завдяки проведення вимірювань з неспецифічним білком (БСА).
Всі виміри проводили при кімнатній температурі та перемішуванні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Незважаючи на широкий спектр запропанованих методів реєстрації антиген-антитіло взаємодії лишається велика потреба в їх спрощенні. Так, одним із шляхів її вирішення може бути створення датчиків в яких компоненти імунореакції могли б навіпряму тестуватися. Труднощі, що пов'язані з їх конструюванням, в основному, обумовлені малими електрохімічними змінами, що мають місце в процесі антиген-антитіло взаємодії, а відповідно і з проблемами їх реєстрації [Aizawa M., 1994]. Майже в усіх роботах де була представлена їх дія при поясненні можливих механізмів виникнення сенсорного відгуку, так чи інакше, автори спиралися на прояв ефекту Доннана, чи приводили пояснення у рамках теорії мембранного потенціалу пористих мембран з фіксованими електричними зарядами Теорелла, Мейєра та Сівєрса (модель-ТМС) [Helfferich F., 1962; Kobatake Y., 1978]. Саме неможливість впливу цих ефектів на зміну електропровідності імуносенсору на основі польового транзистору поставила під сумнів подальшу імовірність його використання [Schasfoort R.B.M., 1990a].

При розробці шляхів створення безміточних імуносенсорів важливо враховувати їх специфіку. Реєстрація антиген-антитіло взаємодії сенсорами такого типу прямо детектується поверхнею перетворювача. Тому логічно, що на процес утворення сигналу може впливати спосіб іммобілізації одного з компонентів імунореакції, характеристики підложки та перетворювача, метод реєстрації. Так, при конструюванні сенсору на основі полімерної мембрани значну роль має відігравати її заряд, розмір пор тощо.

В роботі розглядається можливість реєстрації антиген-антитіло реакції використовуючи нові підходи у створенні біоафінних мембран у поєднанні з кондуктометричним типом вимірювання. Також пропонується метод локалізації антиген-антитіло реакції в поровій структурі мембрани. За цієї умови малі електрохімічні зміни, спричинені цією реакцією, можуть бути зафіксовані пристроєм за рахунок існування та в деяких місцях навіть перекивання подвійних електричних шарів.

1. Розробка кондуктометричного методу реєстрації антиген-антитіло взаємодії на основі біоафінних полімерів

1.1. Імуносенсиори на основі гідрофільних полімерних матеріалів

Для встановлення ролі окремих факторів у механізмі формування сенсорного відгуку були проведені дослідження на полімерних мембранах з різними характеристиками пористої структури, густини поверхневого заряду, гідрофільно-гідрофобних властивостей тощо. Як полімери, що утворюють напівпроникні мембрани, були обрані співполімери акрилонітрилу. Вони характеризуються чудовими плівкоутворюючими властивостями. Акрилонітрил співполімеризується з широким спектром винільних та акрилових мономерів, що дозволяє регулювати молекулярну структуру мембраноутворюючої плівки. Співполімери акрилонітрилу легко обробляються за розчинною технологією з можливістю отримання як пористих (з різним розміром пор) так і непористих мембран.

В таблиці 1 наведені характеристики серії мембран із співполімеру акрилонітрилу з акриловою кислотою, що були одержані мокрим способом. Зміна умов формування дозволила одержати мембрани з різними продуктивностями і

затримуючими здатностями. Отже, ці мембрани мають різні морфологічні характеристики.

Із збільшенням процентного вмісту полімеру у відливному розчині утворюються більш тонкопористі мембрани, які характеризуються більшою густиною поверхневого заряду.

Таблиця 1

Умови формування та характеристики мембран із співполімеру акрилонітрила з акриловою кислотою.

Плівка	Співполімер	Масова доля полімеру, %	Ніж, мм	Осаджувальна ванна	Об'ємний потік води, при 0.2 МПа,	Коефіцієнт затримки БСА при 0,1 МПа
M1	АН-АК	18	0.3	ДВ	110	0.89
M2	АН-АК	18	0.2	ДВ	180	0.94
M3	АН-АК	16	0.3	ДВ	180	0.75

АН-АК = акрилонітрил з акриловою кислотою, ДВ= дистильована вода.

При цьому мембрана, що одержана з більш тонкого шару відливного розчину (M3) є більш тонкопористою (більша затримуюча здатність). Крім того, для цієї мембрани можна очікувати більшу асиметричність пористої структури по її товщині. Очевидно така мембрана має більш тонкий поверхневий селективний шар, що забезпечує більшу продуктивність, незважаючи на менший розмір пор. Такі результати є наслідком впливу орієнтуючої дії підкладки на процес формування. Для всіх одержаних мембран спостерігався сенсорний відгук при антиген-антитіло реакції. Модельною парою білків, що використовували в подальших експериментах були взяті γ -імуноглобуліни кроля (IgG) та антитіла

кози проти IgG кроля (анти-IgG). Характер зміни електропровідності системи від концентрації антигену був аналогічним для всіх мембран (Рис.1), але абсолютні

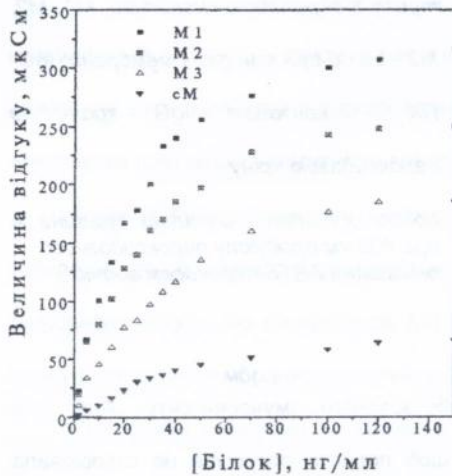


Рис.1. Залежність сенсорного відгуку від концентрації специфічного (IgG) та неспецифічного білку (BCA) при використанні анти-IgG вміщуючих мембран на основі співполімеру акрилонітрилу з акриловою кислотою. Умови вимірювання: 25 мМ Na-фосфатному буфері, pH=7,5.

значення відгуку залежали від типу мембрани. Враховуючи, що молекулярна структура цих мембран однакова, відмінності в значеннях електропровідності можуть бути викликані впливом пористої структури на процес іммобілізації, проходження імунної реакції та на електроповерхневі характеристики самої мембрани.

Ефективність іммобілізації та проходження імунореакції на такій мембрані контролювали імуноферментним аналізом (Рис.2). Мембрани з малими та великими розмірами пор (M2, M3) проявляють меншу ефективність при імунній реакції. Для широких пор характерне зменшення внутрішньої поверхні, і як наслідок кількість зв'язаного антитіла для таких мембран зменшується. Зменшення розміру пор мембрани забезпечує більш розвинуту поверхню, що

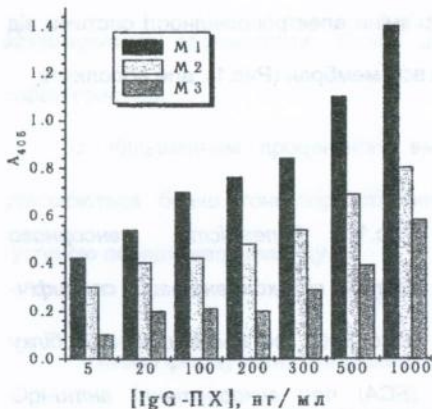


Рис.2. ELISA-тест для визначення сорбційної ефективності мембран, отриманих із співполімеру акрилонітрилу з акриловою кислотою; M1, M2, M3 - анти-IgG вміщуючі мембрани; IgG-ПХ - кон'югат IgG кроля з пероксидазою хрину.

по осі ординат - оптична густина A_{405} при 405 нм продукту пероксидазного окиснення ABTS перекисем водню.

дозволяє збільшувати кількість іммобілізованого імунореагенту. Але для проходження імунної реакції важливо, щоб пориста структура не створювала стеричних перешкод для транспорту імунореагенту. Очевидно, цей фактор і викликає зменшення ефективності імунної реакції на найбільш тонкопористій мембрані.

В наведеному прикладі спостерігаються симбадні зміни ефективності імунної реакції і абсолютного значення відгуку від пористої структури мембрани. Отже, вплив пористої структури може бути пояснений в межах впливу на ефективність імунної реакції. Але, безумовно, певну роль повинен відігравати і вплив пористої структури на електроповерхневі характеристики мембрани. Так, зменшення розміру пор веде до збільшення товщини подвійного електричного шару, що в свою чергу впливає на підвищення електропровідних властивостей такої мембрани.

1.2. Імуносенсиори на основі гідрофобних полімерних матеріалів.

З метою вивчення можливості одержання сенсорного відгуку на незарядженій матриці, а разом з тим і спрощення процесу іммобілізації антитіл нами були взяті мембрани з гідрофобними властивостями. Це означає, що таким мембранам притаманна відсутність поверхневого заряду.

В роботі були використані полімери на основі полівінілхлориду. Виходячи з попередніх даних, пориста структура має значний вплив на характер та величину сенсорного відгуку, що генерується. Ми використовували найбільш тонкопористі полівінілхлоридні мембрани з класу мікрофільтраційних з розміром пор 0,1 мкм.

Гідрофобні мембрани не змочуються водою, але при обробці в розчині з поверхнево-активними речовинами гідрофілізація відбувається пошарово, від поверхневих шарів, до внутрішніх. Такі особливості гідрофілізації можна використати для одержання мембран з гідрофільною поверхнею та гідрофобними порами, що може дозволити регулювання толохімії процесу іммобілізації. При іммобілізації білкових молекул на таких мембранах білок зв'язується виключно внутрішньою гідрофобною поверхнею пор, а не на поверхні мембрани. Отже, білкові молекули після іммобілізації знаходяться тільки в порах мембрани.

Як поверхнево-активна речовина використовувався Твін-80. Це неіоногенна сполука, отже, її адсорбція на поверхні не призводить до формування поверхневого заряду. За допомогою імуноферментного аналізу було проведено вивчення характеру сорбції IgG кроля модифікованими полівінілхлоридними мембранами (Рис.4). Встановлено, що сорбційна ефективність поверхні

полівінілхлоридної мембрани змінюється в залежності від часу її обробки в 0.1% розчині Твін-80.

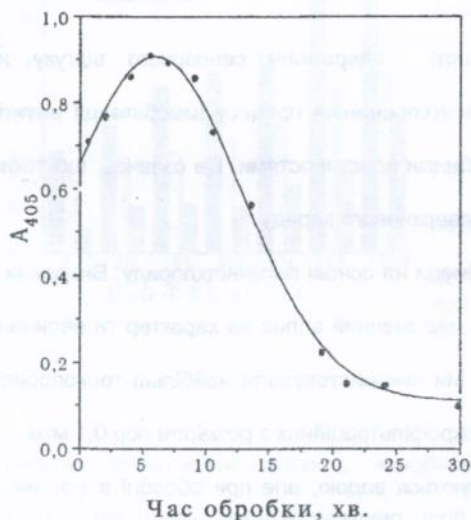


Рис.4. ELISA-тест для визначення зміни сорбційної ефективності ПВХ мембран в процесі обробки їх 0.1% розчином Твіну-80. Вихідна концентрація антитіл кози проти IgG кроля становила 0.5 мг/мл; розв'язання кон'югату IgG кроля з пероксидазою хрину було 1 : 3000.

по осі ординат - оптична густина A при 405 нм продукту пероксидазного окислення ABTS перекисем водню.

В перші хвилини витримки мембрани у зазначеному розчині ПАР ефективність сорбції на її поверхні може порівнюватись із сорбцією на поверхні полістирольного планшету. При подальшій обробці, коли розчин із антитілами має можливість вже проникати і іммобілізуватися в поровій структурі мембрани, за рахунок гідрофілізації її поверхні сорбційна ефективність такої мембрани підвищується. Максимум спостерігається в межах 7-8 хв обробки і потім швидко спадає досягаючи практично фонові величини сорбції після 25-30 хв обробки. Тут можна констатувати факт повної гідрофілізації поверхні. Таким чином, для використання гідрофобної поверхні пор необхідно проводити обробку полівінілхлоридної мембрани у 0,1% розчині Твін-80 не більше 10 хв.

Оптимальний час витримки ПВХ мембрани у розчині Твіну-80 був встановлений також і незалежно від даних імуноферментного аналізу. Під час

обробки абсолютно сухої гідрофобної пористої мембрани розчином поверхнево активної речовини гідрофілізація загальної поверхні відбувається поступово. Спочатку гідрофілізується зовнішня поверхня мембрани, а потім - поверхня її пор. Якщо суха ПВХ мембрана практично не електропровідна у буферному розчині, то в процесі витримки її в розчині Твіну-80 електропровідність її збільшується. На протязі перших 10 хв. вона змінюється повільно, а при часі обробки 25-30 хв вирівнюється з електропровідністю буферного розчину. Аналізуючи дані імуноферментного аналізу та зміни електропровідності гідрофобної ПВХ мембрани було встановлено, що 7-8 хв. витримки її у розчині Твін-80 є оптимальним часом.

Так, іммобілізацію антитіл ми проводили на попередньо обробленій ПАР мембрані і для підтвердження доцільності цього етапу на необробленій. З Рис. 5

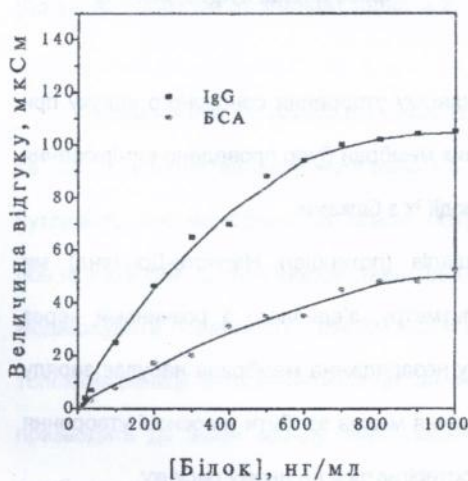


Рис.5. Залежність сенсорного відгуку від концентрації специфічного (IgG) та неспецифічного білку (БСА) при використанні анти-IgG вміщуючої ПВХ мембрани (необробленої). Умови вимірювання: 25 мМ Натрієвий фосфатний буфер, рН=7,5.

та Рис 6 видно, що оброблена мембрана відрізняється більшою чутливістю (5нг/мл) та величиною відгуку. Час вимірювання становив 4-6 хв. Неспецифічний

сигнал, однак, більший по відношенню до неспецифічного на гідрофільних мембранах, але, не дивлячись на це, він суттєво відрізняється від специфічного сигналу.

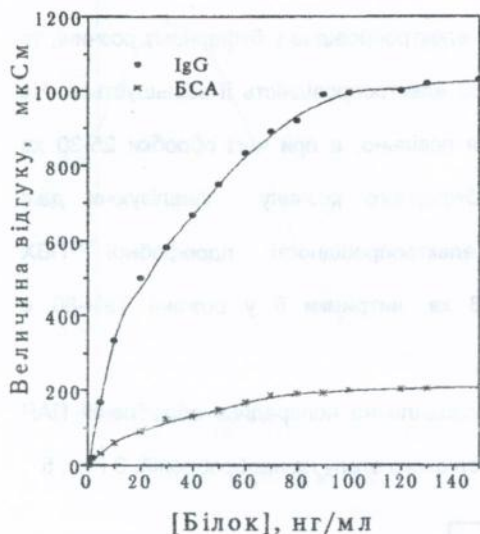


Рис. 6. Залежність сенсорного відгуку від концентрації специфічного (IgG) та неспецифічного білку (БСА) при використанні анти-IgG вміщуючої ПВХ мембрани, обробленої 0.1% розчином Твіну-80 на протязі 7 хв. Умови вимірювання: 25 мМ Натрієвий фосфатний буфер, pH=7,5.

Для встановлення можливого механізму утворення сенсорного відгуку при використанні пористої поверхні полімерних мембран було проведено вимірювання мембранного потенціалу до і після взаємодії їх з білками.

Так, рівноважну різницю потенціалів (потенціал Нернста-Доннана) ми встановлювали за допомогою нановольтметра, з'єданого з розчинами через електроди. З Рис. 7 видно, що напочатку незаряджена мембрана набуває заряду в процесі обробки її білками. Це заключення можна зробити на основі утворення та зміни мембранного потенціалу, що спостерігається на цьому рисунку.

Для встановлення величини електричного заряду, що створює мембранний потенціал, можна скористатися відомою формулою, згідно з якою заряд конденсатору дорівнює добутку його ємності на напругу. Приймавши мембранний

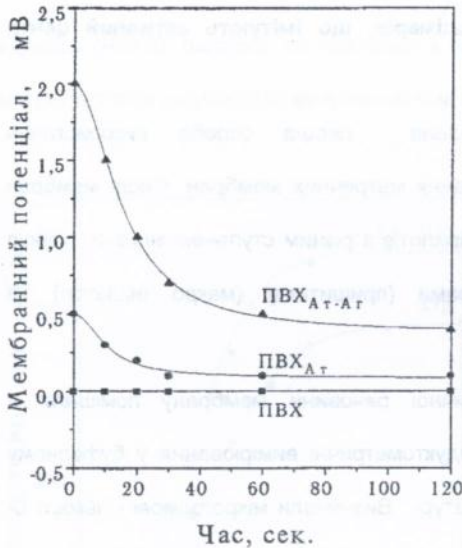


Рис.7. Зміна мембранного потенціалу ПВХ мембрани: ПВХ - необробленої мембрани, ПВХ_{Am} - ПВХ мембрани з іммобілізованими анти-IgG, ПВХ_{Am-Az} - анти-IgG вміщуючої ПВХ мембрани після взаємодії з IgG.

потенціал рівним 2 мВ ($2 \cdot 10^{-3}$ В), а ємність мембрани - 1 мкФсм⁻² (10^{-6} Ф · см⁻²) [Котык А., 1980], ми отримуємо заряд $\approx 2 \cdot 10^{-9}$ Кл см⁻².

Таким чином, на основі отриманих даних можна зробити висновок про те, що в нашому випадку мембрани на основі полівінілхлориду мають більшу чутливість ніж мембрани на основі похідних поліакрилонітрилу. Можливо, це пов'язано з тим, що при використанні гідروفобної мембрани ми маємо можливість модифікувати поверхню Твін-80, частково не торкаючи пори. В цьому випадку толохімія реакції антиген-антитіло встановлена і проходить в поровій структурі. Це призводить до зміни заряду, який локалізований в порі. На відміну від цього, мембрана на основі співполімеру акрилонітрилу з акриловою кислотою заряджена і на фоні значного заряду самої мембрани внесок зміни поверхневого заряду в результаті реакції антиген-антитіло виявляється менше ніж у випадку незарядженої гідروفобної мембрани.

2. Розробка сенсорів на основі полімерів, що імітують активний центр антитіл

В нашій роботі була зроблена перша спроба використання олігоуретанових матеріалів для отримання матричних мембран. Серія мембран була отримана на основі олігоуретанакрилатів з різним ступенем зшивки, різною товщиною та різними фотоініціаторами (пришитими (макро ініціатор) та непришитими до олігомеру).

Так, добре відмиту від матричної речовини мембрану поміщали в електрохімічну комірку. Проводили кондуктометричні вимірювання у буферному розчині (рН=7.5) при кімнатній температурі. Визначали мікрограмові кількості L-Phe-OEt та інших амінокислот і фіксували зміни, що відбувалися у вимірювальній системі.

Вивчаючи характер сенсорного відгуку на L-Phe-OEt, при використанні олігоуретанових мембран із слабким та середнім ступенями зшивки, було відмічено, що неспецифічний відгук у разі використання Trp навіть був більшим за специфічний (на введення L-Phe-OEt). Це можна пояснити гнучкістю полімерних ланцюгів, що особливо виявляється у місцях формування специфічних каверн. При вимиванні з таких каверн молекул формувачів за рахунок своєї гнучкості полімер швидко "забуває" їх, що імовірно і призводить до великого неспецифічного сигналу.

В подальших експериментах вже із максимально зшитою олігоуретанакрилатною мембраною було помічено, що при використанні непришитого ініціатору фотополімеризації, незважаючи на багато кращі відгуки ніж при використанні попередньо описаних мембран, високої селективності досягти не

вдалося (Рис.8). Імовірно це пов'язано з тим, що ініціатор вимиваючись разом з матрицею стає додатковим матричним компонентом.

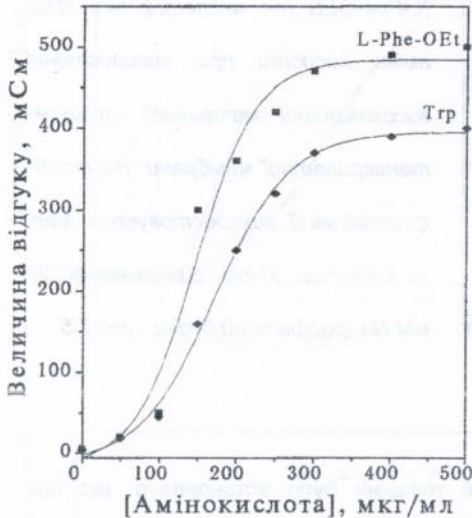


Рис.8. Залежність сенсорного відгуку від концентрації специфічної (L-Phe-OEt) та неспецифічної (Тгр) амінокислоти при використанні високозшитої матричної олигоуретанакрилатної мембрани. Фотоініціація здійснювалась у присутності непришитої ініціатору. Умови вимірювання: 25 мМ Na-фосфатний буфер, pH=7,5.

Тому, при вимірюванні величини відгуку на введення L-Phe-OEt та Тгр, як неспецифічної амінокислоти, мав місце досить значний неспецифічний відгук за рахунок похибки, яку вносив вимитий ініціатор.

При роботі з полімером в якому під час процесу фотополімеризації використовувався макро ініціатор була досягнута досить велика селективність (Рис.9). У цьому випадку ініціатор не вимивався з утвореного полімеру і не вносив похибки при вимірюванні. В такому разі неспецифічний відгук у значній мірі відрізнявся від специфічного.

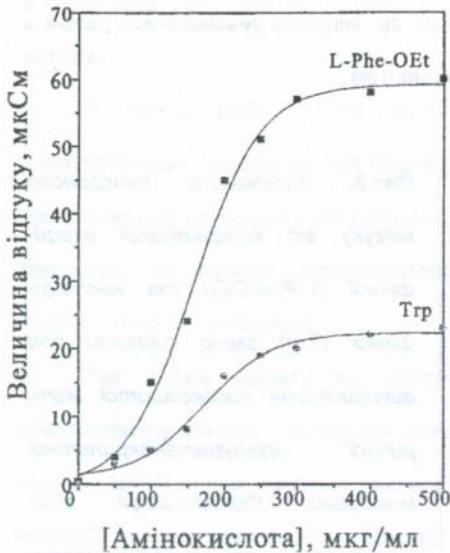


Рис.9. Залежність сенсорного відгуку від концентрації специфічної (L-Phe-OEt) та неспецифічної (Trp) аміно кислоти при використанні високочистої матричної олігоуретанакрилатної мембрани. На стадії фотоініціації використовували макро ініціатор. Умови вимірювання: 25 мМ Na-фосфатний буфер, pH=7,5.

Використовуючи мембрани різної товщини було встановлено, що при товщині 0,5 мм вдається підвищити швидкість вимірювання. Так із 16 - 18 хв., що затрачувались на вимірювання сенсорного відгуку при використанні олігоуретанової мембрани товщиною 1мм, вдалося перейти до 8 - 10 хв. при 0,5мм мембрані. Це легко пояснюється дифузійною природою мембранного транспорту через такі мембрани. Час проходження матричної речовини і відповідно час вимірювання сенсорного відгуку тим менший чим менша товщина мембрани.

Механізми сенсорних відгуків матричних мембран обговорюються зараз в літературі [Sellergren B., 1993; Piletsky S.A., 1995]. Проте остаточно не доведено, які саме процеси відбуваються під час взаємодії речовини матриці з відповідною кавернею полімеру. З метою наблизитись до найбільш точного пояснення цього механізму нами була проведена спроба виміру мембранного потенціалу матричної олігоуретанакрилатної мембрани. Для цього була використана клітина,

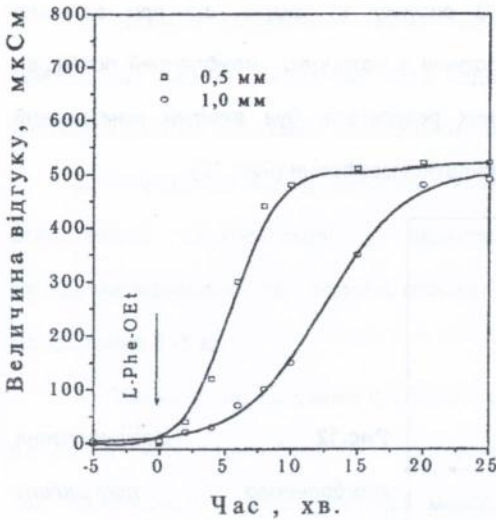


Рис.10. Залежність швидкості розвитку сенсорного відгуку на введення *L-Phe-OEt* в розчин від товщини матричної олігоуретанакрилатної мембрани. На стадії фотоініціації використовували макро ініціатор. Умови вимірювання: 25 мМ *Na*-фосфатний буфер, $pH=7,5$.

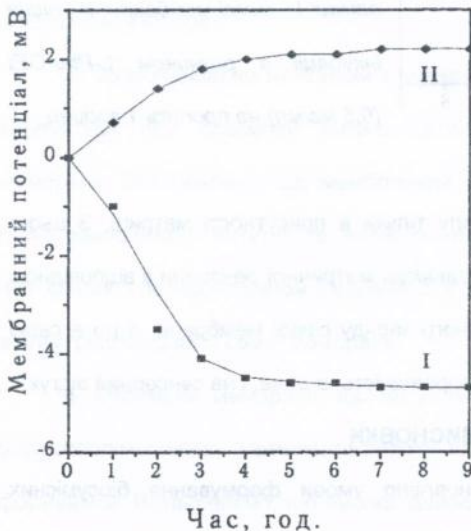


Рис.11. Встановлення мембранного потенціалу матричної до *L-Phe-OEt* олігоуретанової плівки: I - відмитой від матриці; II - після інкубації з розчином *L-Phe-OEt* (0,5 мг/мл) на протязі 1 години.

яку мембрана ділила на дві комірки. Перепад концентрацій електроліту був 15 та 1,5 мМ *KCl*. Мембранний потенціал вимірювали у відмитой від матричної речовини мембрани та після взаємодії останньої з надлишком *L*-

Phe-OEt на протязі 1 години. З рисунку 11 видно, що при витримці олігоуретанакрилатної мембрани в розчині з матрицею мембранний потенціал змінюється. Для контролю отриманих результатів був вимірян мембранний потенціал нематричної олігоуретанакрилатної мембрани (Рис. 12),

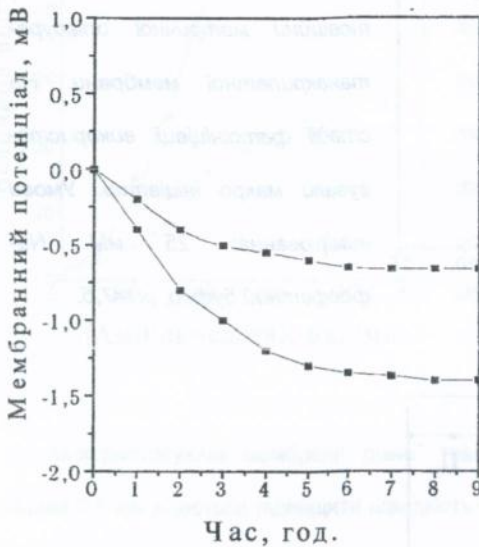


Рис.12. Встановлення мембранного потенціалу нематричної олігоуретанакрилатної мембрани (0,5 мг/мл) на протязі 1 години.

що підтвердило ефект зміни потенціалу тільки в присутності матриці. З цього можна зробити заключення, що після взаємодії матричної речовини з відповідною каверною змінюється величина загального заряду самої мембрани, а це в свою чергу не може не вплинути на її електропровідність, а отже, і на сенсорний відгук.

ВИСНОВКИ

1. Проведено пошук та встановлено умови формування біосумісних гідрофільних та гідрофобних плівок з різними фізико-хімічними властивостями. Продемонстрована можливість використання їх пористої структури при реєстрації антиген-антитіло взаємодії.

2. Вперше розроблено новий спосіб регулювання топохімії процесу іммобілізації антитіл (антигенів), який надав можливість підвищити чутливість аналізу за рахунок локалізації проходження імунореакції саме в порах мембрани.

3. Розроблено метод реєстрації компонентів імунних реакцій на основі співполімерів акрилонітрилу з акриловою кислотою, акрилонітрилу з гліциділметакрилатом та полівінілхлориду з чутливістю 5 нг/мл і часом вимірювання 3 -5 хв.

4. Показано, що основним фактором, що впливає на величину сенсорного відгуку при використанні біоафінних полімерів була їх зарядженість та розмір пор. Так, тонкопористі полівінілхлоридні мембрани характеризуються підвищеною здатністю до зміни електропровідності під час антиген-антитіло реакції, що відбувається в порах.

5. Запропановано можливий механізм формування сенсорного відгуку, що індукується при взаємодії антиген-антитіло реакції на поверхні пористої мембрани. Встановлено, що мембранний потенціал ПВХ мембрани змінюється після іммобілізації антитіл та після реакції з відповідним антигеном. Процес пов'язаний з перерозподілом загального заряду, який спричинює виникнення змін в електропровідності самої мембрани.

6. Отримано мембрани, що імітують активний центр антитіла, на основі блок-сополімеризації метилметакрилату та олігоуретану в присутності молекулоформувачів. Встановлено, що висока зшивка та використання макроініціатору на першій стадії процесу є необхідними умовами високої селективності та стабільності матричних олігоуретанакрилатних мембран, а значить і сенсору на їх основі.

7. Показано дивовижну аналогічність у характері відгуку мембран, що містять білки-рецептори (антитіла, D1-білок тощо), та мембран, що моделюють рецепторну структуру. Переваги цих двох підходів можна успішно застосовувати для отримання біоафінних мембран з метою подальшого їх використання в сенсорній технології.

Список робіт, опублікованих за темою дисертації

1. Starodub N., Piletsky S., Panasyuk T. A new approach for express registration of specific antibodies // Proc. of the "IX International Conference on AIDS", Berlin. - 1993.-P.256.
2. Starodub N.F.,Panasyuk T.L., Piletsky S.A. A new membrane sensor for detection of binding reactins // Abstract of ICOM, Heidelberg. - 1993. - P. 9.4.
3. Piletsky S.A.,Parhometz Yu.P.,Lavryk N.V., Panasyuk T.L., El'skaya A.V. Sensors for low weight organic molecules based on molecular imprinting technique // Sensors & Actuators: B.Chemical. - 1994. - V.19, No.1-3. - P.629-631.
4. S.A.Piletsky,Yu.P.Parhometz,N.V.Lavryk, T.L.Panasyuk, A.V.El'skaya. Template sensors// CIS-German workshop biosensors, Munster, 1993. - P.24.
5. Panasyuk T.L., Piletsky S., Nigmatullin R., Bryk M. Immunoresponseive membrane based on acrylonitrile copolymers// Preprints of 7th International Symposium on "Synthetic Membranes in Science and Industry", Tubingen. - 1994. - P.458-461.
6. S.Piletsky, N.Lavryk, T.Panasyuk, Y.Parhometz. Molecular imprinting technique for pesticides detection// Abstract of Eurosensors VIII Conference, Toulouse. - 1994. - P.383.
7. S.Piletsky, A.El'skaya, T.Panasyuk. A new method for thrombin inhibitors assay// Abstract of Eurosensors VIII Conference,Toulouse. - 1994. - P.377.

8. T.Panasyuk, S.Piletsky, R. Nigmatullin, M.Bryk. Methacrylic membranes and their application for the detection of binding reaction// Abstract of Euroensors VIII Conference, Toulouse. - 1994. - P.379.
9. T.L.Panasyuk, S.Piletsky, R.Nigmatullin, M.Bryk.Using of acrylonitrile membranes for elaboration of immunosensor// Proceedings of "Euromembrane'95", Bath. - 1995. - Vo.II - P.394-398.
10. Панасюк Т.Л., Нігматуллін Р.Р., Пілецький С.А., Брик М.Т. Мембрани в сенсорній технології // Функціональні матеріали. - 1995. - Т.2, N3. - С. 322-327.
11. Piletsky S.A., Piletskaya E.V., Yano K., Kugimiya A., Elgersma A., Levi R., Kahlow U., Takeuchi T., Panasyuk T.L., El'skaya A.V., Karube I. A biomimetic receptor system for sialic acid based on molecular imprinting// Analit. Letter. - 1996. - V. 29, N2. - P.157-170.

АНОТАЦІЯ

Panasyuk T.L. Investigation of antigen-antibody interaction using of bioaffinity and biomimetic membranes.

Thesis for a degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, Special Option - Molecular Biology, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 1997.

The thesis contains the results on investigation of the antigen-antibody interaction based on bioaffinity polymeric films and biomimetic membranes. The registration of immunoreagents carried out using of modified acrylonitrile or polyvinyl chloride polymers and imprinted olygourethane membranes. Such polymeric materials able to change its ions permeability during immunochemical reaction. They are responsible for both molecular recognition and signal generation.

The electrical conductivity of the system with the Ab-bound membrane increases in the presence of Ag allowing to detect its concentration. The sufficient sensitivity (5ng/ml for bioaffinity and 50 µg/m for biomimetic membranes) and response time (3-5 min. and 6-10 min. correspondingly) were achieved.

Панасюк Т.Л. Исследование антиген-антитело взаимодействия при использовании биоаффинных и биомимических мембран.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 1997.

В диссертационной работе представлены результаты исследования антиген-антитело взаимодействия при использовании свойств биоаффинных полимерных плёнок и мембран, имитирующих активный центр антител специфичных к гаптенам. Регистрацию компонентов иммунной реакции проводили с применением модифицированного акрилонитрильного или поливинилхлоридного полимера и матричной олигоуретановой мембраны. Такие полимерные материалы способны изменять свою электропроводность в процессе иммунохимической реакции. Они отвечают как за молекулярное распознавание, так и за генерацию сигнала.

Электропроводность системы с антитело-содержащей мембраной увеличивалась в присутствии антигена, что и позволяло определять его концентрацию. Была достигнута достаточно высокая чувствительность анализа (5 нг/мл для биоаффинных и 50 мкг/мл для биомимичных мембран) и время отклика (3-5 мин. и 6 - 10 мин. соответственно).

Ключові слова: антиген-антитело взаємодія, біоафінні полімери, біомімічні мембрани, імуносенсор, кондуктометричний метод.

Підписано до друку 17.03.97р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.
Наклад 100. Зам. 87.

435570

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86

AB 37.304