

РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОНЬЮГАЦИИ АНТИТЕЛ С R-ФИКОЭРИТРИНОМ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МУЛЬТИПЛЕКСНОМ АНАЛИЗЕ

Кобзев Д.В.^{1,2}, Татарец А.Л.², Огурцов А.Н.¹

¹Национальный технический университет

«Харьковский политехнический институт»,

²ГНУ «НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины»,

г. Харьков

Разнообразие клеточных популяций, находящихся в крови человека, наиболее эффективно анализируется с помощью мультиплексных технологий с использованием иммунологических методов. Они включают наборы конъюгатов антител с различными флуоресцентными маркерами для адресного распознавания отдельных молекул в клетках.

Благодаря своим спектральным свойствам (узкой полосе флуоресценции, значительному коэффициенту экстинкции ($1.96 \times 10^6 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) и высокому квантовому выходу ($\sim 90\%$)), пигмент красных водорослей, R-фикоэритрин (R-PE), остается одним из наиболее ярких флуоресцентных маркеров в медико-биологических исследованиях. Однако большой молекулярный вес R-PE и наличие большого количества amino и карбоксильных групп вызывает сложности в получении конъюгатов с одинаковым уровнем яркости и аффинности.

С целью определения оптимальных условий связывания R-PE с антителами нами был выбран модельный объект — иммуноглобулин G (IgG), который тиолировали 2-иминотиолоном (ИТ). В молекулы R-PE вводили малеимидные группы с помощью SMCC. Проводилось варьирование как концентраций белков, так и кросс-линкеров, их молярных соотношений и времени протекания соответствующих реакций. Определили, что тиолирование

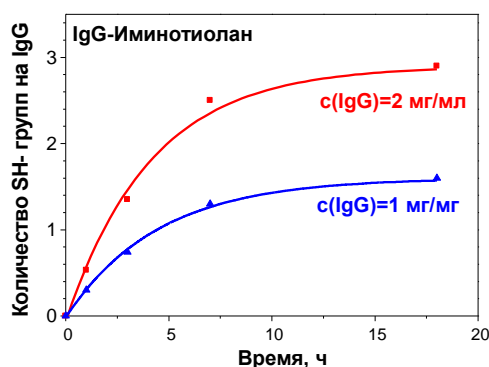


Рис. 1 – Изменение количества тиольных групп на IgG при тиолировании иминотиолоном в зависимости от времени реакции

IgG лучше проводить при концентрации 1 мг/мл и 5-ти кратном молярном избытке ИТ в течение 7 часов (рис. 1), что дает возможность модифицировать каждую молекулу IgG тиольными группами. Тогда дальнейшее взаимодействие с малеимидированным при помощи SMCC R-PE позволяет получать конъюгаты с молярным соотношением R-PE:IgG от 1:1 до 2:1 и избежать получения белковых агрегатов.

Результаты модельных экспериментов были использованы для получения конъюгата *anti-CD4-R-PE*.

Проверка активности, специфичности и яркости конъюгата *anti-CD4-R-PE* по сравнению со стандартным коммерческим образцом, проведенная методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, показала, что полученный конъюгат не уступает по специфичности и сопоставим по яркости со стандартным коммерческим образцом.