

ИММУНОФЕРМЕНТ ТАҲЛИЛДА ҚАТТИҚ ФАЗАЛИ ТАШУВЧИГА АНТИГЕН БИРИКТИРИШ УЧУН ФАОЛ РЕАКЦИЯ АҲАМИЯТИНИ БАҲОЛАШ



Рўзметов Фахраддин Нурматович¹, Нуралиев Неккадам Абдуллаевич²

1 - Хоразм вилояти болалар кўп тармоқли тиббиёт маркази, Ўзбекистон Республикаси, Урганч ш.;

2 – Бухоро давлат тиббиёт институти, Ўзбекистон Республикаси, Бухоро ш.

ОЦЕНКА ЗНАЧЕНИЯ АКТИВНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ФИКСАЦИИ АНТИГЕНА НА ТВЕРДОФАЗНЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Рўзметов Фахраддин Нурматович¹, Нуралиев Неккадам Абдуллаевич²

1 - Детский многопрофильный медицинский центр Хорезмской области, Республика Узбекистан, г. Ургенч.;

2 - Бухарский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Бухара

EVALUATION OF THE VALUE OF ACTIVE REACTION FOR FIXING ANTIGEN ON A SOLID-PHASE CARRIER FOR ENZYME IMMUNE ANALYSIS

Ruzmetov Fakhraddin Nurmatovich¹, Nuraliev Nekkadam Abdullaevich²

1 - Children's multidisciplinary medical center of Khorezm region, Republic of Uzbekistan, Urgench;

2 - Bukhara State Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Bukhara

e-mail: duschanboy.sapaev@mail.ru

Резюме. Тадқиқот мақсади. Тажрибада 96 чуқурчали полистирол пластиетларга микроорганизмлар антигенларини бириктириши даражасига муҳит рН таъсирини баҳолашдир. Аниқланишича, қаттиқ фазали ташувчини танлаш ва унга антигенни бириктириши учун антигенлар адсорбцияси даражасига тўғридан-тўғри таъсир қилувчи муҳит рН уни ҳисобга олиш зарур.

Калит сўзлар: Иммунофермент таҳлил, қаттиқ фазали ташувчи, буфер муҳит, оқсил антигенлари.

Abstract. The aim of the study was to evaluate the effect of medium pH on the degree of microorganism antigen fixation on polystyrene 96-well plates in the experiment. It has been established that when choosing a solid-phase carrier and fixing an antigen on it, it is necessary to take into account the pH of the media, which directly affect the degree of adsorption of loaded antigens.

Keywords: ELISA, solid-phase carrier, buffer medium, protein antigens.

Кириш. Иммунофермент таҳлил (ИФТ) – антигенларни сифат жиҳатидан аниқлаш ва микродорий ўлчашнинг лаборатор иммунологик усули бўлиб ҳисобланади [1, 2]. ИФТ усули ўтган юз йилликнинг 70-йилларида Швецияда Engvall ва Perlmann, van Weemen ҳамда Schuur ва ҳаммуалифлари томонидан АКШда таклиф қилинган [3, 4].

Иммунофермент таҳлилининг моҳияти антитананинг ва кўзгатувчи антигенининг специфик ўзаро таъсиридан иборат бўлиб, кейинчалик ҳосил бўлган комплексга конъюгатнинг кўшилиши кузатилади (энзим нишонланган турга қарши одам IgM, IgG, IgA

иммуноглобулинлари). Фермент хромоген субстратнинг парчаланишига олиб келади ва визуал ёки фотометрик тарзда аниқланадиган рангли маҳсулот ҳосил қилади. Реакция натижаларини рўйхатга олиш маълум бир тўлқин узунлигида вертикал нузли махсус фотометрларда амалга оширилади. Натижа оптик зичлик бирликларида ифодаланади [1, 5].

Ўрнатишнинг кўплаб вариантлари мавжуд, улардан гетероген қаттиқ фазали ИФТ (indirect ELISA) энг юқори амалий аҳамиятга эга бўлди. Кўпчилик коммерция ташхисот тўпламларида қаттиқ фаза сифатида 96-чуқурчали планшетлар ишлатилади [5, 6, 7].

Жадвал 1. Тажрибада комплексли микроб антигени олинган, микроорганизмларнинг культуралари.

Штаммлар	Регистрация рақами №	Олиниш манбаи
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	003778/155	Копрокультура
<i>Enterococcus faecalis</i>	003460/ «СВ»	Уринокультура
<i>Staphylococcus aureus</i>	003994/ Wood - 46	Гемокультура
<i>Staphylococcus aureus</i>	003702 /14-В	Биликультура
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	003063 \306	Суяклардаги йиринг
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	004145 /МЗ-87	Бурун шиллик қавати
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	000691/691	Копрокультура
<i>Escherichia coli</i>	002673/477	Копрокультура
<i>Candida albicans</i>	/7	Танглай шиллик қавати

Кўзгатувчи антигенини 96-чуқурчали планшетларига фиксацияси кўплаб омилларга боғлиқ бўлиб, уларнинг асосийларидан бири буфер муҳитининг (рН) фаол реакцияси бўлиб ҳисобланади.

Шу муносабат билан тадқиқотнинг мақсади тажрибада 96-чуқурчали полистиролли планшетларга микроорганизмлар антигенини фиксация қилиш даражасига муҳитнинг фаол реакцияси (рН) таъсирини баҳолаш бўлди.

Материал ва усуллар. Тажрибада антигенларни олиш мақсадида грамм-мусбат кокклар, грамм-манфий бактериялар, *Candida* sp. Таққослаш мақсадида антигенлар *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ва *Candida albicans* (1-жадвал)дан олинган. Микроорганизмлар культуралари ЎзР ССВ ЭМЮК “одам инфекциалари микроорганизмлари”дан олинган.

Штаммларни инактивацияланган бактериал субстанциялар кўринишида микроб танаси 10^9 тана/ml концентрацияси миқдорда, 30 минут давомида 80°C гача қиздирилган ҳолда ишлатилган. Ушбу режим оксилларнинг тузилишини сақлаб қолиш, бактериал суспензияни зарарсизлантириш имконини беради. Тажрибада антитаналар сифатида куёнларнинг IgGлари ишлатилган

Натижалар ва муҳокама. Антигенларни Буавен бўйича – комплекс микроб антигени бўлиб, учхлосирка кислота ёрдамида микроорганизмлар суткалик экмасининг экстракцияси йўли билан ажратилган.

Маълумки, антигенларни юклаш мақсадида натрий-карбонатли (0,05 моль/л, рН 9,0), боратли (0,05 мль/л, рН 8,0) ва трис-НСl (0,05 моль/л, рН 8,0) буферланган физиологик эритма (рН 7,2-7,5) ишлатилади. Уларнинг рН қийматари ва ион кучи ўзгариши мумкин [6].

Экспериментал синов-тизимлари яратиш учун полистиролли 96-чуқурчали планшетнинг чуқурчаларига рН $9,7\pm 0,1$ бўлган, 0,1М Na-бикарбонат буферига 1,0 мкг антиген қўшилиб 4°C ҳароратда 16 соат давомида қолдирилди. Микроб антигени фиксацияси тугаганидан сўнг, буферни 0,01М Na-фосфатли буфер ёрдамида (рН

$7,3\pm 0,1$) 0,15М NaCl ва 0,1% Твин-20 билан ювиш йўли орқали тозаланган. Натижалар иммуноферментли планшет анализаторида «Stat Fax-300» (АҚШ) ёрдамида 492нм тўлқин узунлигида спектрофотометрик тарзда ҳисобланди.

Оксил антигенлари фаол реакциянинг юқори қийматларида (рН), уларнинг заряди манфий ва максимал катталиқда бўлганда, қаттиқ фаза ташувчисига интенсив равишда адсорбцияланган Шу билан бирга, ИФТнинг кейинги босқичларини амалга оширишда иммун реагентларнинг ўзаро таъсири рН физиологик қийматларида оптимал бўлган. Антиген юкланган синов-ланшетларини иммун реагентлар билан инкубация қилишда буфер муҳитнинг рН қийматининг сезиларли пасайиши унинг десорбциясига олиб келиши аниқланди.

Экспериментал синов-тизимини яратиш мақсадида тажрибада қўлланиладиган қаттиқ фазали ташувчи (96-чуқурчали полистиролли планшет): иммобилизацияланадиган реактивга нисбатан юқори боғлаш қобилиятига эга бўлиши керак; реагентни оз миқдорда десорбциялаш хусусияти; носпецифик боғланишнинг паст даражасига эга бўлиши; қайта тикланадиган хусусиятга эга бўлиши керак [5]. Биз томонимиздан тажриба учун ушбу талабларга жавоб берадиган тест-планшетлар танлаб олинди.

Юзани тозалаш усулига кўра, ҳозирги вақтда пассив адсорбция учун ишлатиладиган полистирол ташувчилар 3 турга бўлинади: Х типини - заряд индекси 1, сирт характеристикаси, кутбсиз гидрофоб, IgG боғланиши ўртача; Y типини - заряд индекси 12, сирт характеристикаси, кутбли гидрофоб, IgG боғланиш самарали; Z типини, заряд индекси 200, юза характеристикаси кутбли гидрофил, IgG боғланиш самарасиз.

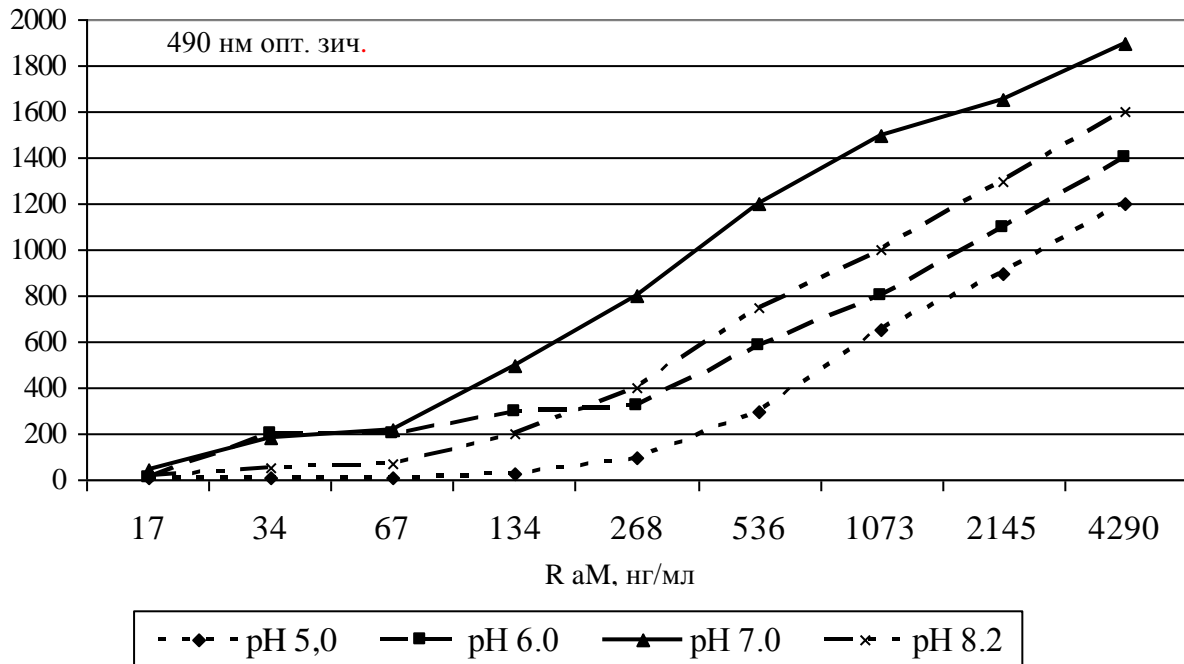
Тажрибада ҳар уччала типдаги ташувчи текширилди. Ташувчиларнинг Х ва Y типларининг кўрсаткичлари бир хил бўлганлиги туфайли биз фақат Х ва Z ташувчиларининг маълумотларини тақдим этамиз. рН муҳитининг оксилларни Х ва Z полистироллари билан боғланишига таъсири мос равишда 1 ва 2 жадвалларда кўрсатилган.

Гидрофоб юзага эга бўлган X полистиролининг сорбция хусусияти эритманинг рН ва ион кучи билан кучли боғлиқликка эга (1-расм).

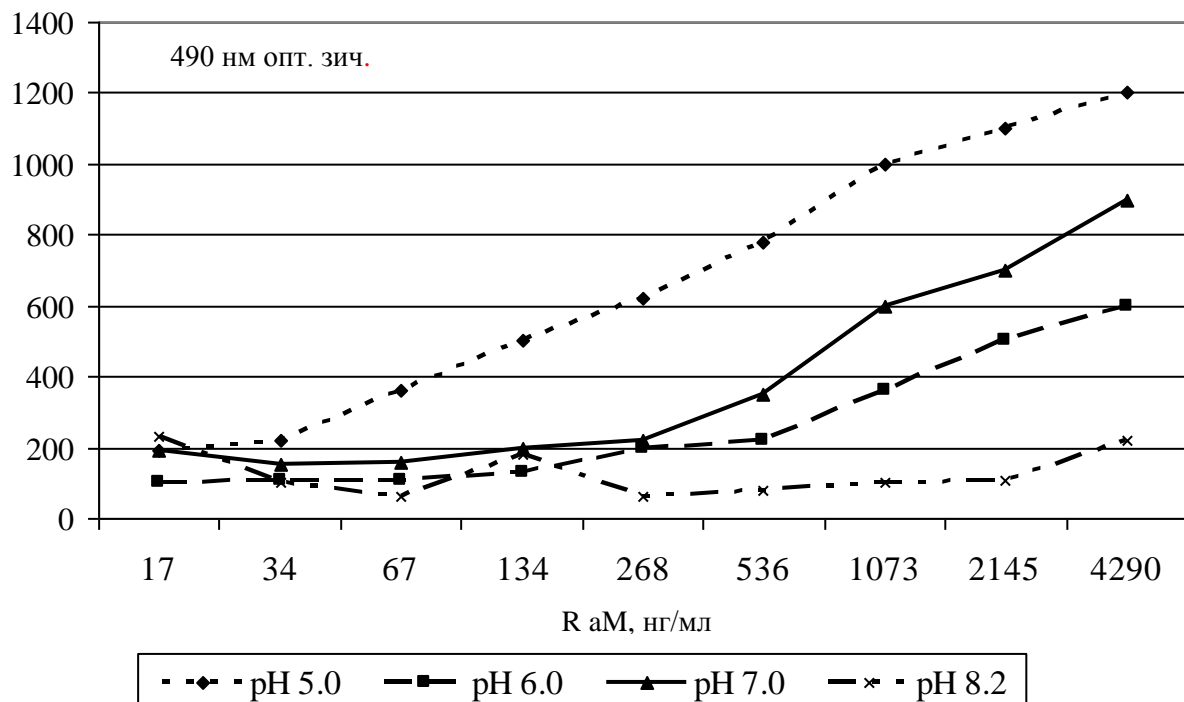
Тажрибада оптимал натижалар оксилнинг изоэлектрик нуқтасига мос келадиган паст рНли буфер эритмаси ва Z типдаги ташувчи ишлатилганда олинган (2-расм).

Тажрибада фойдаланилган микроорганизмалар штаммларининг оксил антигенлари 4⁰С ҳароратда 14 соат давомида адсорбцияланган. Тест-планшетда иммун

комплекслар боғлангандан сўнг, бошқа иммун реагентларнинг фиксацияланган антигенга носпецифик боғланишининг олдини олиш мақсадида таҳлилнинг кейинги босқичларида қаттиқ фазали ташувчидаги бўш жойларни блоклаш амалга оширилди. Ҳар хил оксиллар ва ноионли детергентлардан фойдаланилган – буқа зардоби альбуминининг 1%ли эритмаси, 0.5%ли желатин эритмаси, 5%ли нормал зардоб эритмаси, 0,05-0,5%ли тритон X-100 ва Твин-20 каби эритмалар.



Расм 1. Антитаналарнинг X типдаги полистиролга боғланишида рНнинг таъсири



Расм 2. Антитаналарнинг Z типдаги полистиролга боғланишида рНнинг таъсири

Ишлатилган блокловчи воситалар ва иммун реагентлар адсорбцияланган антиген билан бир хил буфер эритмада эритилди. Олинган иммун адсорбентлар 4^0C да хароратда иммун реагентларнинг специфик фаоллигини йўқотмасдан узок вақт (8 ой давомида) сақланди. Уларнинг десорбциясини олдини олиш мақсадида 0,02% натрий азидин сақловчи блокловчи эритмани кўшилди. Натрий азидин еркаламбирнинг пероксидазаси ингибитори бўлганлиги сабабли, экспериментал тест-планшетлар бу фермент билан конъюгацияланган иммун реагент билан инкубация қилишдан олдин натрий азидиннинг таъсирини тўхтатиш учун буфер эритмаси билан ювилган.

Адсорбцияланган иммун реагентининг синов субстратлари ва ИФТнинг турли босқичларида реагентлар билан тажрибада инкубация қилиш муддати ва шартлари эмпирик тарзда танланган.

Хулосалар:

1. Каттиқ фазали ташувчини танлашда (96-чуқурчали полистирол планшет) ва унга антигенни фиксация қилишда, юкланган антигенларнинг адсорбция даражасига бевосита таъсир қилувчи буфер муҳитининг рН қийматини ҳисобга олиш керак.

2. Тажрибада микроб антигенларини фиксация қилиш бўйича оптимал натижалар манфий зарядланган Z типидagi кутбли гидрофил полистиролда, фаоллиги паст реакцияга эга (рН) буфер эритмасидан фойдаланган ҳолда олинган.

Адабиётлар:

1. Егоров А.М., Осипов А.П. Теория и практика иммуноферментного анализа. - Москва, Высшая школа, 1991. - 186 с.
2. Манжос М.В., Шкадов С.А., Никишин А.В. Иммуноферментный метод определения специфических антител в слюне больных полинозом // Клиническая лабораторная диагностика. - Москва, 2006. - №5. - С.44-45.

3. Авазова Д.Э., Онгарбаев А.Б., Мусабаев Э.И. Создание референтной панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к ВИЧ 1/2 для определения качества ИФА тест-систем, используемых в Республике Узбекистан // Журнал теоретической и клинической медицины. - Ташкент, 2005. - №2. - С.79-83.

4. Колосова А.Ю., Блинцов А.Н., Самсонова Ж.В., Егоров А.М. Разработка твердофазного иммуноферментного анализа гентамицина в сыворотке крови человека // Антибиотики и химиотерапия. - Москва, 1998. - №2. - С.9-13.

5. Таранов А.Г. Диагностические тест-системы: радиоиммунный и иммуноферментный методы диагностики. - Новосибирск: Изд-во НГУ, 2000. - 260 с.

6. Павлов С.Б. Иммуноферментный анализ. Интерпретация результатов // Клиническая антибиотикотерапия. - Москва, 2000. - №1. - С.16-18.

7. Флуер Ф.С., Прохоров В.Я., Веснина А.Ф., Акатов А.К. Иммуноферментная тест-система для определения стафилококкового энтеротоксина типа С // Журнал микробиологии. - Москва, 2002. - №6. - С.65-68.

ОЦЕНКА ЗНАЧЕНИЯ АКТИВНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ФИКСАЦИИ АНТИГЕНА НА ТВЕРДОФАЗНЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Рузметов Ф.Н., Нуралиев Н.А.

Резюме. Целью исследования было оценка влияния рН среды на степень фиксации антигена микроорганизмов на полистироловые 96-ти луночные планшеты в эксперименте. Установлено, что при выборе твердофазного носителя и фиксации на нем антигена нужно учитывать рН сред, которые непосредственно влияют на степень адсорбции нагруженных антигенов.

Ключевые слова: Иммуноферментный анализ, твердофазный носитель, буферная среда, белковые антигены.