

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КОЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ КЛЕТОК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА С
ПОМОЩЬЮ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ БИОЧИПОВ**

А.В. Шиликин¹, Н.Г. Овчинина¹, С.С. Бессмельцев²

¹ ГОУ ВПО Ижевская государственная медицинская академия, г. Ижевск

e- mail: Shishkin_lab@mail.ru

² Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, г. Санкт- Петербург

e-mail: bsshem@hotmail.com

Резюме.

Анализ с помощью иммунологических биочипов позволяет одновременно определять на разных клетках множество поверхностных антигенов. Однако на каждой отдельно взятой клетке может быть определен только один антиген по факту ее связывания в том или ином участке биочипа с иммобилизованными антителами. Для определения коэкспрессии нескольких антигенов ранее использовали дополнительную обработку биочипа флуоресцентно мечеными антителами.

В данной работе показана возможность использования для этой цели антител, конъюгированных с молекулами фермента. Такой подход имеет преимущества для проведения дополнительного морфологического исследования связанных с биочипом клеток.

Ключевые слова: иммунологические биочипы, определение поверхностных антигенов клеток, иммуноцитохимическое исследование клеток, морфологическое исследование клеток

**THE USE IMMUNE ENZYME ASSAY FOR DEFINITION OF CELL COEXPRESSION
ANTIGENES AT CARRYING OUT OF THE ANALYSIS BY MEANS OF
IMMUNOLOGICAL BIOCHIPS**

¹ *Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk*

² *Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St- Petersburg*

¹A.V. Shishkin, ¹N.G. Ovchinina, ²S.S. Bessmeltsev

Summary to the article

The analysis by means of immunological biochips allows to define simultaneously on different cells of superficial antigens. However on each separately taken cell only one antigen upon its linkage in this or that site of the biochip with immobilised antibodies can be defined only. For definition coexpression of several antigens earlier used the additional processing of the biochip with stained antibodies.

In the present work possibility of use for this purpose of antibodies, linked with enzyme molecules is shown. Such approach has advantages to carrying out of additional morphological research of the cells connected with the biochip.

Key words: *immunological biochips, surface cell antigens, immunomorphological cell analysis.*

Введение.

Иммунологическое исследование клеток с использованием биочипов [1-11] является весьма перспективным направлением иммунодиагностики. Анализ с помощью биочипа позволяет одновременно определять (на разных клетках) множество поверхностных антигенов.

Как правило, иммунологические биочипы, предназначенные для исследования клеток, имеют достаточно похожее устройство. Они представляют собой подложку, на которой в строго определенных участках (пятнах) иммобилизованы молекулы антител, специфичных к поверхностным антигенам клеток. В процессе проведения анализа биочип инкубируют с суспензией клеток, которые оседают на поверхность биочипа. Клетки, имеющие на своей поверхности молекулы определяемых антигенов, связываются в области участков с иммобилизованными антителами. Не связавшиеся клетки устраняют при последующей отмывке. Если инкубация биочипа с клеточной суспензией выполнялась без перемешивания, то плотность заполнения пятен связавшимися клетками оказывается прямо пропорциональна содержанию в исследуемом образце клеток, имеющих соответствующие антигены. Число антигенов одновременно определяемых на разных клетках может достигать нескольких десятков или сотен [1-11].

Однако на каждой отдельно взятой клетке (по факту ее связывания в том или ином пятне биочипа) может быть определен только один антиген. Для определения коэкспрессии антигенов в работах [2,6,9,10,11] использовалась обработка, связавшихся с биочипом клеток флуоресцентно- мечеными антителами. При использовании меченных антител, специфичных к одному антигену, на каждой окрасившейся клетке определялось два антигена, поскольку еще один антиген определялся по факту связывания этой клетки в

пятне биочипа. Для определения коэкспрессии большого количества антигенов может быть использована обработка связанных с биочипом клеток несколькими антителами, специфичными к разным антигенам и конъюгированных с разными флуорохромными метками.

Также представляется возможным использование для данной цели антител, конъюгированных с молекулами ферментов. Безусловно, проведение такого анализа будет являться более длительным и трудоемким по сравнению с использованием флуоресцентно меченных антител. Но при этом становится возможным выполнение дополнительного окрашивания исследуемых клеток различными красителями для проведения их морфологического исследования. Кроме того, для проведения подобного исследования не потребуется люминесцентный микроскоп, который имеется не в каждой клинической лаборатории. Поэтому возможность использования иммуноферментного метода для определения коэкспрессии антигенов способствовала бы более широкому внедрению в практику анализа с использованием иммунологических биочипов.

Цель данной работы – продемонстрировать возможность использования такого подхода при проведении исследования клеток с помощью иммунологических биочипов.

Материалы и методы.

Изготовление биочипов.

Для изготовления биочипов были взяты подложки из поливинилхлорида. Использовались мышинные моноклональные антитела (IgG), специфичные к следующим поверхностным антигенам лейкоцитов человека: CD3, CD4, CD5, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD45, CD56 (ООО «Сорбент», Россия).

Капли растворов антител объемом 0,25 мкл наносили на подложки в заранее отмеченные участки. Далее подложки помещали в камеру со 100% влажностью и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего высушивали на воздухе и замораживали при -26°C в герметичных контейнерах с осушителем. При таком хранении биочипы не теряли своих свойств, по меньшей мере, в течение 12 месяцев.

Устройство биочипа показано на рис. 1

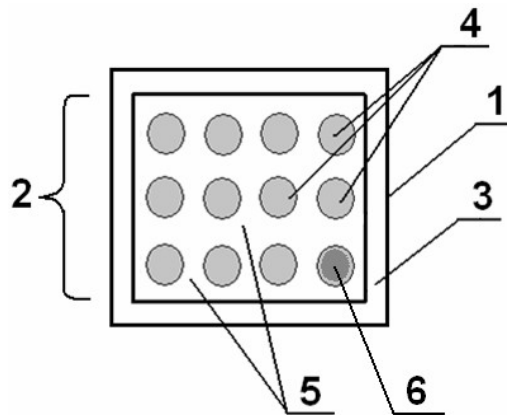


Рис. 1. Устройство биочипа.

Примечание. 1) подложка; 2) рабочая (функциональная) область биочипа; 3) край подложки; 4) тестовые участки (пятна) с иммобилизованными антителами; 5) фоновые участки подложки, не содержащие иммобилизованных антител; 6) контрольный участок.

Получение клеточной суспензии.

Лейкоциты были выделены из периферической крови путем центрифугирования в растворе фиколла и урографина с плотностью 1077 г/л. Полученные клетки ресуспензировали в растворе, содержащем 0,1% сухого молока, 20% (по объему) инактивированной нагреванием человеческой сыворотки и 1,5мМ ЭДТА в PBS.

Подготовка биочипа к проведению анализа.

После разморозки биочип закрепляли в кювете, ополаскивали 1% раствором BSA в буфере PBS, затем проводили трехкратную отмывку 0,05% раствором детергента Tween-20 на шейкере. После этого биочип инкубировали с 1% раствором BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 часа при перемешивании на шейкере. Затем вновь проводили трехкратную отмывку 0,05% раствором детергента Tween-20 и ополаскивали биочип буфером для удаления следов детергента.

Инкубация биочипа с клеточной суспензией и его отмывка.

В кювету с биочипом вносили клеточную суспензию и инкубировали в течение 60 минут без какого-либо перемешивания. Концентрация клеток и объем суспензии подбирались таким образом, чтобы при оседании клеток происходило полное заполнение ими поверхности биочипа. После завершения инкубации биочипы несколько раз ополаскивали PBS для устранения клеток, не связавшихся в участках с иммобилизованными антителами. Качество отмывки оценивали при помощи стереомикроскопа МБС-1. Отмывка считалась выполненной качественно, если клетки отсутствовали в участках подложки, не содержащих иммобилизованных антител.

Дополнительное определение антигенов на связавшихся клетках с помощью антител, конъюгированных с ферментом. EnVision-метод.

Сразу же после завершения отмывки со стенок кюветы осторожно удаляли капли жидкости, не касаясь поверхности биочипа. Осуществляли фиксацию биочипа со связанными клетками 1 % раствором формальдегида в этаноле.

Биочип инкубировали с 3% раствором перекиси водорода в течение 10 минут, затем дважды в течение 5 минут отмывали буфером, состоящим из трис-(оксиметил)-аминометана и его солянокислой соли (TBS). Далее в течение 20 минут инкубировали биочип с раствором неиммунной сыворотки для блокирования неспецифического связывания антител. Удаляли избыток сыворотки и в течение 40 минут биочип инкубировали с раствором первичных антител. После завершения инкубации биочип ополаскивали буфером и дважды отмывали TBS (по 5 минут). Затем удаляли остаток жидкости и добавляли реагент EnVision, представляющий собой макромолекулы полимера, конъюгированные с молекулами вторичных антител и молекулами фермента. В течение 40 минут проводили инкубацию. Затем биочип ополаскивали буфером и дважды отмывали TBS (по 5 минут), а затем инкубировали в течение 5-10 минут с раствором 3-диаминобензидина тетрахлорида (ДАБ) без доступа света. Отмывали биочип дистиллированной водой и высушивали. Осуществляли дополнительное окрашивание клеток гематоксилином. Затем биочип ополаскивали дистиллированной водой и высушивали.

Приготовление из биочипа долговременного препарата для микроскопического исследования.

Биочип заключали в композицию для приготовления долговременных микропрепаратов «Shandon-Mount» («Thermo-electron corporation», США) между тщательно обезжиренными предметным и покровным стеклами. При этом рабочая поверхность биочипа должна быть обращена в сторону покровного стекла. Препарат помещали под пресс до затвердевания композиции.

Считывание и обработка результата.

Каждое пятно биочипа фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата установленного на микроскопе. Проводили определение общей плотности связывания клеток – отношения количества клеток связанных в определенном участке к площади поверхности данного участка. Для этого на микрофотографии каждого пятна биочипа выбирали участки, соответствующие областям размерами 100 x 100 мкм, и определяли в них общее число клеток. Определение количества клеток проводилось не менее, чем в 3-4

таких участках: в центре каждого пятна, на краю пятна и между ними. Полученные значения усредняли.

Для удобства использования полученных результатов, значения общей плотности заполнения поверхности пятен связавшимися клетками выражали в процентах. За 100% принималась средняя общая плотность связывания клеток в области пятен с антителами анти-CD45. Исходя из этого, осуществлялся пересчет в проценты плотности связывания клеток в области других пятен. Ранее было показано [11], что при проведении инкубации биочипа с клеточной суспензией без перемешивания, получаемые значения плотности связывания клеток в области тестовых участков биочипа оказываются пропорциональны фактическому содержанию в образце клеток, имеющих соответствующие антигены).

Точно также определяли плотность связывания клеток, окрашенных продуктом реакции, и выражали ее в процентах. За 100% также принимали среднюю общую плотность связывания клеток в области пятна с антителами анти-CD45.

Проведение контрольного исследования методом проточной цитофлуориметрии.

Для проверки результатов исследования, выполненного с использованием биочипов, был проведен дополнительный анализ с использованием проточной цитофлуориметрии. Данное исследование выполнялось на проточном цитофлуориметре «FACSCanto II» («Becton Dickinson», США) с использованием антител, специфичных к антигенам CD3, CD5, CD16, CD19, CD45.

С помощью биочипов были исследованы клетки здорового человека и больного хроническим В-клеточным лимфоцитарным лейкозом (В-ХЛЛ). На связавшиеся с биочипом клетках была определена коэкспрессия антигенов CD19 с использованием технологии EnVision. Дополнительно осуществлялось докрашивание клеток гематоксилином. Из биочипов были приготовлены долговременные микропрепараты для микроскопического исследования.

Результаты.

На рис. 2 и 3 приводятся результаты определения общего содержания клеток, экспрессирующих каждый из обнаруженных антигенов, а также результаты определения содержания CD19+ клеток в каждой из этих субпопуляций

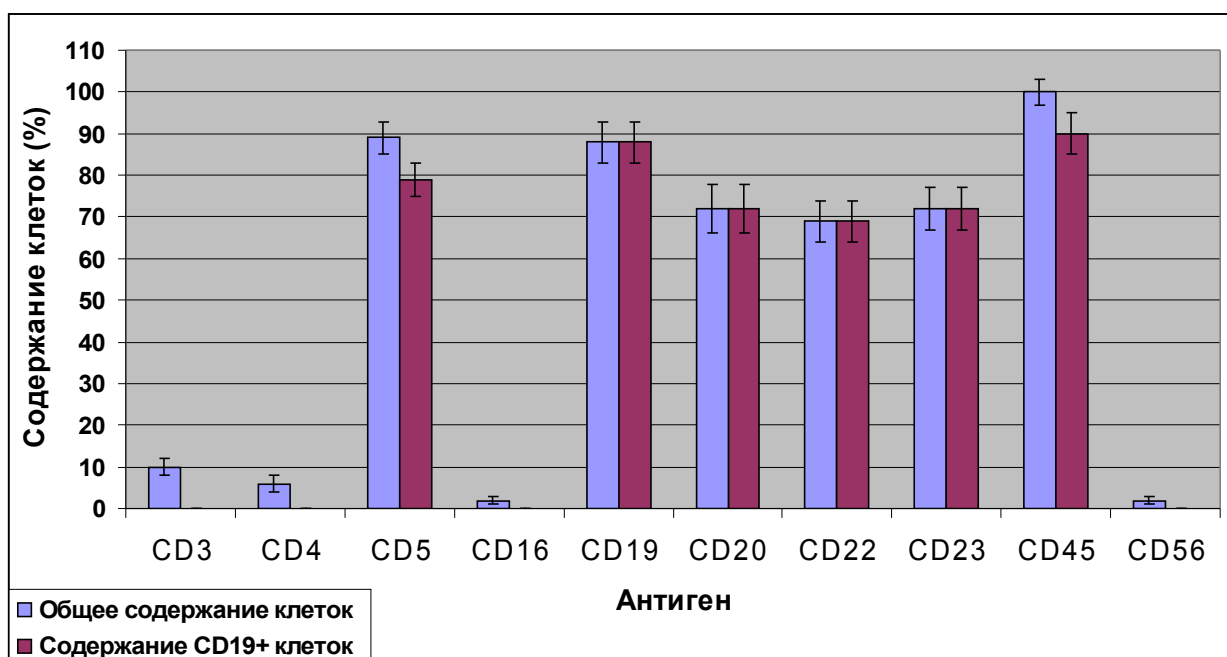


Рис. 2. Результат исследования клеток больного В-ХЛЛ с помощью биочипа. Для определения коэкспрессии антигена CD19 на связавшихся с биочипом клетках выполнено дополнительное иммуноцитохимическое исследование с использованием En Vision технологии.

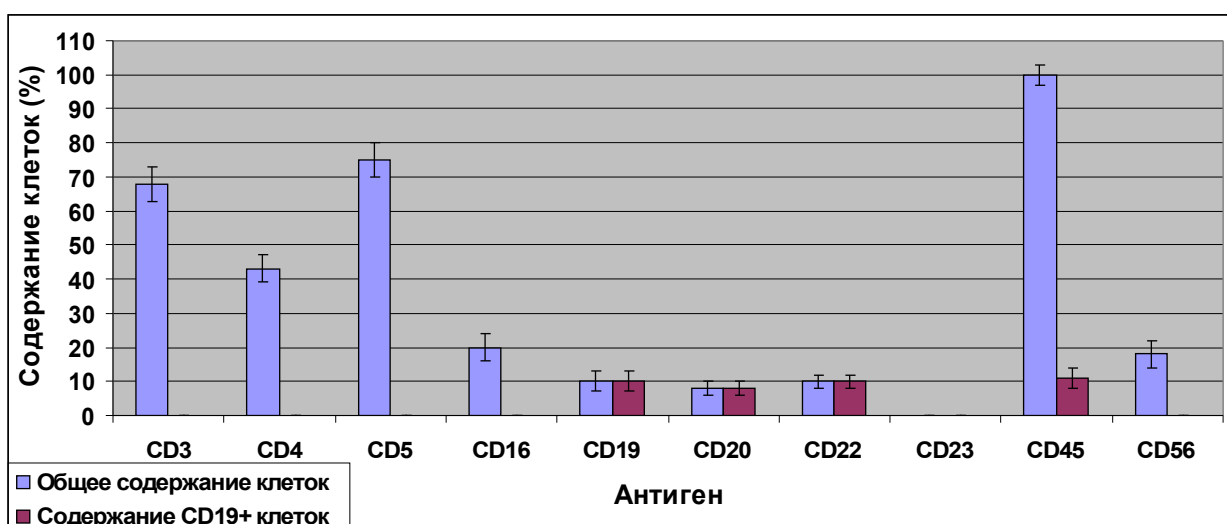


Рис. 3 Результат исследования клеток здорового человека с помощью биочипа. Для определения коэкспрессии антигена CD19 на связавшихся с биочипом клетках выполнено дополнительное иммуноцитохимическое исследование с использованием En Vision технологии.

При исследовании клеток здорового человека была определена коэкспрессия антигенов CD19/CD20, CD19/CD22, CD19/CD45, что является нормой. CD23+ клетки в данном образце обнаружены не были.

При исследовании клеток больного В-ХЛЛ отмечалось высокое содержание CD5+, CD19+, CD20+, CD22+, а также CD23+ клеток. Помимо коэкспрессии антигенов CD19/CD20, CD19/CD22, CD19/CD45 определялась коэкспрессия антигенов CD5/CD19 и CD19/CD23. Наличие коэкспрессии CD5/CD19 является характерным признаком В-ХЛЛ.

Для проверки результатов, полученных с использованием биочипов, было проведено исследование образцов крови тех же людей методом проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты приводятся на рис. 4 и 5

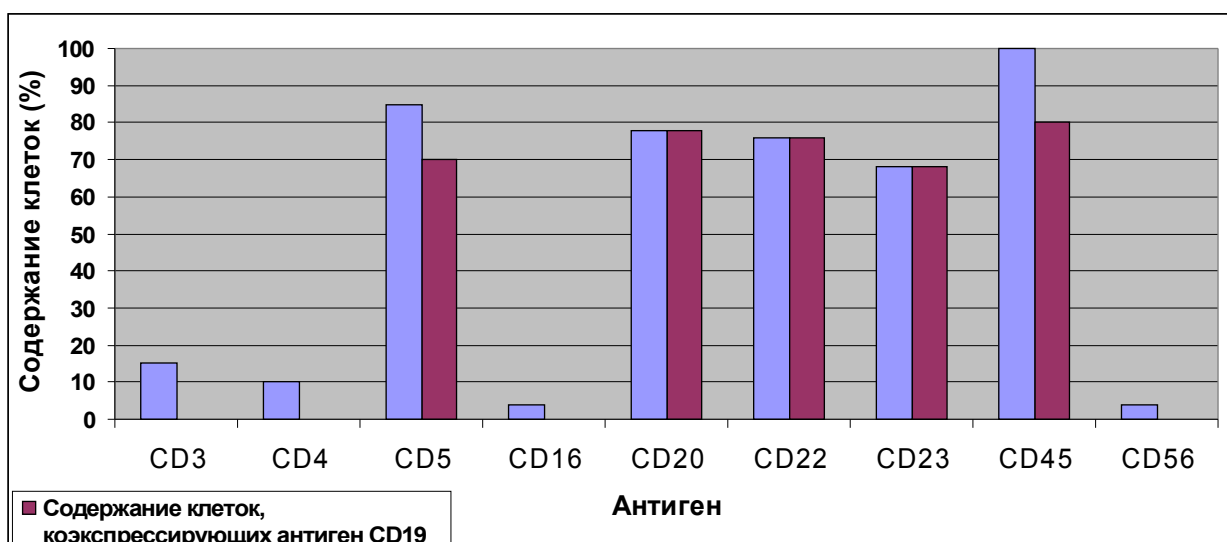


Рис. 4 Результат исследования клеток больного В-ХЛЛ методом проточной цитофлуориметрии.

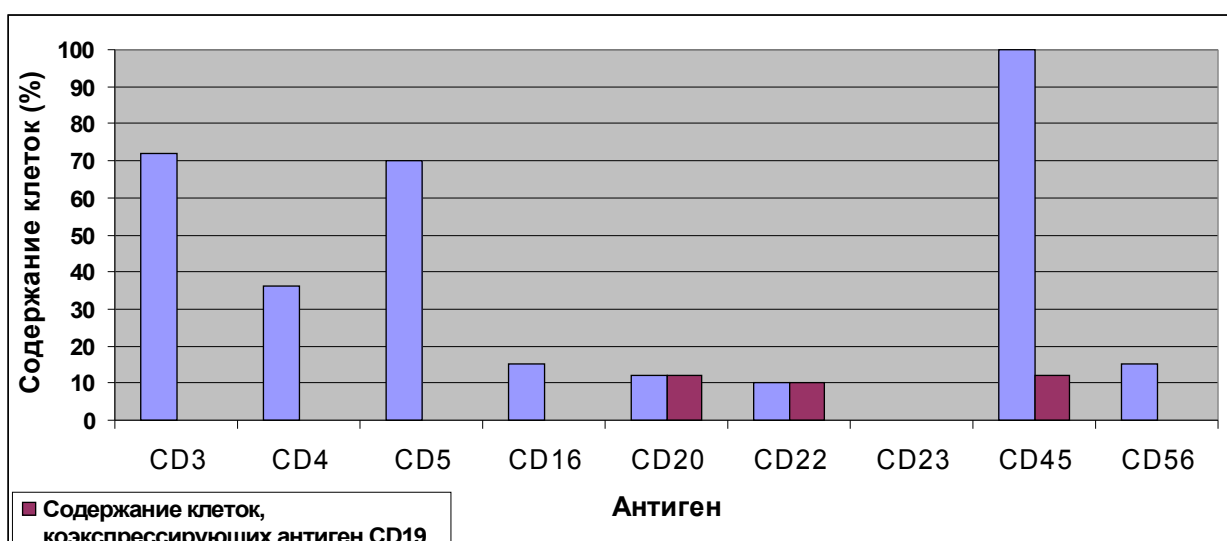


Рис. 5 Результат исследования клеток здорового человека методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты, полученные с использованием биочипов хорошо соответствовали данным полученным, методом проточной цитофлуориметрии.

При микроскопическом исследовании биочипов четко определялось окрашивание мембран клеток продуктом реакции. Это подтверждает поверхностную локализацию антигена CD19. Дополнительное окрашивание связавшихся с биочипом клеток гематоксилином позволило хорошо визуализировать ядра. По своей морфологии клетки, показанные на рис. 6, соответствуют зрелым лимфоцитам.

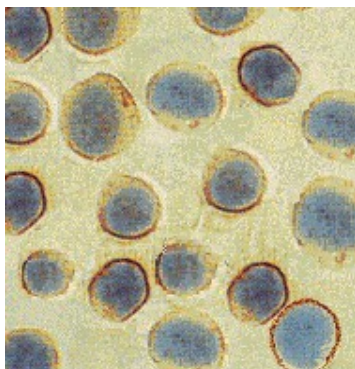


Рис. 6. Микрофотографии клеток больного В-ХЛЛ, связавшихся на биочипе в области пятна с антителами специфичными к антигену CD23. Ядра клеток докрашены гематоксилином. Увеличение в 800 раз

Иммуноцитохимическим методом на данных клетках дополнительно определена экспрессия антигена CD19. Характер окраски клеток продуктом реакции свидетельствует о поверхностной локализации антигена CD19. Обнаруживается коэкспрессия CD19/CD23.

Обсуждение.

Таким образом, использование данного подхода позволяет проводить определение коэкспрессии антигенов и оценку многих морфологических признаков тех же самых клеток. Преимуществом также является возможность приготовления из обработанного таким образом биочипа долговременного препарата, отсутствие необходимости использования люминесцентного микроскопа. Необходимо заметить, что иммунологическое исследование цитологических препаратов с использованием антител,

конъюгированных с ферментной меткой, используется многими лабораториями. В перспективе возможно внедрение в практику некоторых из них анализа с использованием биочипов, дополненного определением коэкспрессии антигенов данным способом.

В представленной работе была использована EnVision технология, отличающаяся высокой чувствительностью. Однако, в принципе, для проведения подобного дополнительного исследования может быть применена практически любая из известных иммуноцитохимических методик. Нами было выполнено дополнительное определение антигена CD19, имеющего на клетках поверхностную локализацию. В то же время представляется возможным использование такого подхода для дополнительного определения ядерных и цитоплазматических антигенов у связанных с биочипом клеток.

Таким образом, нами показана возможность определения коэкспрессии антигенов на связанных с биочипом клетках с использованием EnVision технологии. Используемый подход наряду с определением коэкспрессии антигенов позволяет проводить дополнительное окрашивание клеток и более качественно выполнять их морфологическое исследование.

Литература

1. Belov L, de la Vega O, dos Remedios C.G. et al. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray//Cancer research. - 2001. - Vol. 61. - P. 4483-4489.
2. Belov L., Huang P., Barber N. et al. Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray //Proteomics. - 2003. - Vol. 3. - P. 2147-2154.
3. Belov L., Huang P., Chrisp J.S. et al. Screening microarrays of novel monoclonal antibodies for binding to T-, B- and myeloid leukaemia cells B// Journal of Immunological Methods. - 2005. - Vol. 305-P. 10-19.
4. White S.L., Belov L., Barber N. et al. Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate//Leukemia Research. - 2005. - Vol. 29. - P. 1141-1151.
5. Campbell C.J., O'Looney N., ChongKwan M. et al. A cell interaction microarray for blood phenotyping// Anal. Chem. - 2006. - Vol. 78. - P. 1930-1938.
6. Ellmark P., Belov L., Huang P. et al. Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers// Proteomics. - 2006. - Vol. 6. - P. 1791-1802.

7. Woolfson A., Stebbing J., Tom B. et al. Conservation of unique cell-surface CD antigen mosaics in HIV-1-infected individuals// Blood. - 2005. - Vol. 106. - P. 1003-1007.
8. Liu A.Y. Differential Expression of Cell Surface Molecules in Prostate Cancer Cells// Cancer Research.-2000.-Vol.60.-P.3429-3434.
9. Ko I.K., Kato K. & Iwata H. Antibody microarray for correlating cell phenotype with surface marker //Biomaterials. - 2005. - Vol. 26. - P. 687-696.
10. А.В. Шишкин, И.И. Шмырев, С.А. Кузнецова и др. Иммунологические биочипы для параллельного определения поверхностных антигенов и морфологического исследования клеток// Биологические мембраны. - 2008. - №4. - С. 277-284.
11. Шишкин А.В. Иммунологические биочипы для исследования клеток. Собственный опыт разработки. Некоторые новые подходы к проведению анализа//LAP Lambert Academic Publishing & Co. KG, 2010 – 158 с.