

А. Ю. Колосова, С. А. Еремин, Е. М. Гаврилова, А. М. Егоров

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛЮОРОИММУНОАНАЛИЗ ПРОГЕСТЕРОНА

Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова

В клинической химии определение прогестерона (П) используется для выявления возможности самопроизвольных абортов и контроля за лекарственной терапией при лечении бесплодия, а также как показатель овуляции. В ветеринарии определение П широко применяют для контроля овариального цикла и оценки репродуктивного статуса крупного рогатого скота [2, 8].

Несмотря на высокую чувствительность и специфичность радиоиммунологического и иммуноферментного анализа (ИФА) П [4, 6, 7, 10, 12, 14], эти методы обладают такими недостатками, как значительное время проведения анализа (2—3 ч), многостадийность, использование радиоактивных изотопов. Многие методики включают стадию длительной подготовки образцов (экстракция, очистка из образца) и операции разделения свободных и связанных с антителами компонентов.

Быстрым и надежным методом определения П является безразделительный (гомогенный) поляризационный флюороиммуноанализ (ПФИА). Принцип ПФИА, описанный ранее в ряде обзоров [1, 5], основан на конкурентном взаимодействии определяемого антигена и трейсера (антиген, меченный флюоресцентной меткой) с ограниченным числом центров связывания антител. Поляризация флюоресценции меченого антигена в растворе имеет небольшое значение и существенно возрастает при образовании иммунного комплекса: чем выше концентрация определяемого антигена в пробе, тем в большей степени меченый антиген в реакционной смеси будет в свободном состоянии и ниже значение поляризации флюоресценции. Данный метод анализа не требует стадии разделения компонентов иммунной реакции и позволяет определять концентрацию антигена в течение нескольких минут. К преимуществам ПФИА следует также отнести простоту выполнения анализа, отсутствие длительной подготовки проб, стабильность меченых реагентов и антител при длительном хранении, хорошую точность и воспроизводимость результатов.

В настоящей работе предлагается методика безразделительного определения П методом ПФИА на приборе TDx фирмы «Abbott» (США) с использованием поликлональных антител к конъюгатам 3-карбоксиметил оксима прогестерона (3-СМО-Prog) и 11 α -гемисукцината прогестерона (11 α -HS-Prog) с белком-носителем.

Материалы и методы

Реактивы: 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид, этилендиаминфлюоресцин, N-гидроксисукцинимид, N,N-диметилформамид, 3-СМО-Prog, бычий γ -глобулин, азид натрия, стероидные гормоны: П, 11 α -гидроксипрогестерон, кортизол, тестостерон, деоксикортикостерон, кортикостерон («Sigma», США).

Буферы и стандарты. Использовали 0,1 М боратный буфер с 0,1 % азидом натрия и 0,1 % бычьим γ -глобулином

(буфер TDx, pH 7,4). Стандартные растворы гормонов готовили растворением точных навесок веществ (10 мг) в 10 мл метанола. Из полученных матричных растворов (1 мг/мл) при разбавлении буфером TDx были приготовлены растворы гормонов нужной концентрации. Далее при проведении анализа из этих растворов готовили путем двукратного разведения стандарты с необходимой концентрацией соответствующих гормонов.

Измерение поляризации флюоресценции проводили с помощью автоматизированного поляризационного флюориметра TDx-анализатора фирмы «Abbott Laboratories» (США) в полуавтоматическом режиме по программе «Photo Check» (возбуждения — 485 нм, ширина волны возбуждения — 8 нм, эмиссия — 525—550 нм, детектор — фотоумножитель, источник света — вольфрам-галогеновая лампа, 50 Вт). Загрузка карусели одного анализа от 1 до 10 образцов. Время полного анализа при полной загрузке карусели 5—7 мин. Объем реакционной смеси в кювете 1 мл.

Поликлональные антитела. Специфичные к П поликлональные антитела получены при иммунизации кроликов. Поликлональные антитела П (1—8) различных циклов иммунизации получены в НПП «Иммунотех» (Москва) к конъюгату 3-СМО-Prog с бычьим сывороточным альбумином (BSA), поликлональные антитела Lot 0422-3 и Lot 418 получены конъюгатам 3-СМО-Prog и (11 α -HS-Prog) соответственно с гемоцианином моллюска (KLH) и предоставлены фирмой ILS (Англия). Поликлональные антитела Ab-Prog получены к конъюгату 11 α -HS-Prog с BSA в Институте ветеринарии Брно (Чехо-Словакия).

Синтез трейсера 3-СМО-Prog, меченного флюоресцеином (3-СМО-Prog-EDF). Синтез проводили карбодимидным методом по аналогии со способом, описанным в работе [11] для синтеза 3-карбоксиметил оксима кортизола, меченного флюоресцеином. К раствору 8 мг (20 мкмоль) 3-СМО-Prog в 1 мл диметилформамида добавляли 4 мг (40 мкмоль) N-гидроксисукцинимид и 8 мг (40 мкмоль) карбодимид. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 1 ч и добавляли суспензию 10 мг (20 мкмоль) этилендиаминфлюоресцина в 3 мл диметилформамида. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали 2 дня при 4 °С, затем добавляли метанол и отгоняли в вакууме органический растворитель. Остаток растворяли в 0,5 мл метанола и хроматографировали на силикагельных пластинках для тонкослойной хроматографии («Silufol», ЧСФР) в системе этилацетат — метанол —

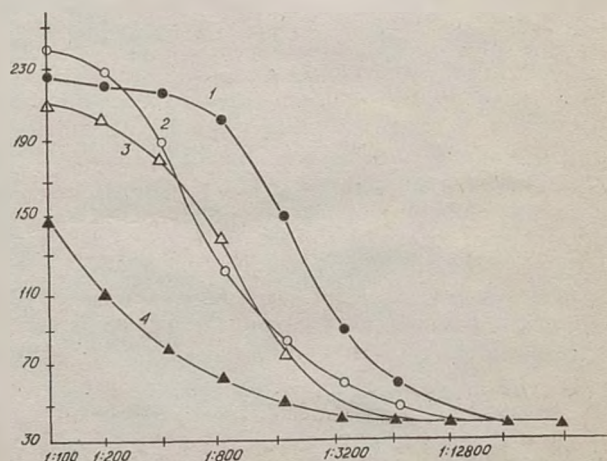


Рис. 1. График титрования поликлональных антисывороток. Антисыворотки: 1 — Lot 0422-3; 2 — П-8; 3 — Lot 418; 4 — нормальная сыворотка.

По оси ординат (здесь и на рис. 2) — поляризация флюоресценции (в мР); по оси абсцисс — разведение антисыворотки.

Антитела	Иммуноген	Титр антител (обратная величина)
Lot 0422-3 (Англия)	3-СМО-Prog-KLH	1300
П-7 (14.11.91)	3-СМО-Prog-BSA	800
П-7 (18.09.91)	3-СМО-Prog-BSA	800
Lot 418 (Англия)	11 α -HS-Prog-KLH	700
П-8 (14.11.91)	3-СМО-Prog-BSA	600
П-1 (14.11.91)	3-СМО-Prog-BSA	340
П-7 (20.02.92)	3-СМО-Prog-BSA	300
П-5 (14.11.91)	3-СМО-Prog-BSA	300
Ab-Prog (Чехословакия)	11 α -HS-Prog-BSA	300
П-4 (14.11.91)	3-СМО-Prog-BSA	280

уксусная кислота в соотношении 90:10:1 (по объему). Из полученных с пластинок основных желтых полос с различными R_f экстрагировали каждое вещество в 2 мл метанола. Растворы разбавляли буфером TDx до нужной концентрации. Трейсер 3-СМО-Prog-EDF имел $R_f=0,9$.

Определение концентрации раствора трейсера проводили спектрофотометрически (спектрофотометр «Бескман DU-6B», США) при 492 нм (коэффициент экстинкции флуоресцеина 6,78 л/Мхсм). Для этого в кювете для спектрофотометра 50 мкл одного из полученных растворов разбавляли 2 мл буфера и измеряли оптическую плотность полученного раствора. Раствор трейсера разбавляли до концентрации 15,5 нмоль/л и использовали в анализе, описанном ниже.

Определение титра антисывороток. Титры антисывороток определяли методом поляризации флуоресценции. В 10 кювет стандартной карусели прибора разливали по 0,5 мл буфера. В 1-ю кювету добавляли 0,5 мл антисыворотки в соответствующем начальном разведении, а в следующие вносили по 0,5 мл полученного раствора до 9-й кюветы включительно. Затем во все кюветы добавляли по 0,5 мл раствора трейсера в концентрации 15,5 нмоль/л, после чего измеряли поляризацию флуоресценции по программе «Photo Check».

Анализ П методом ПФИА. В стеклянную кювету к 50 мкл стандарта П добавляли 0,5 мл раствора трейсера в концентрации 15,5 нмоль/л и 0,5 мл антисыворотки в рабочем разведении. Загружали 10 кювет в карусель для выполнения теста «Photo Check» и измеряли поляризацию флуоресценции в полуавтоматическом режиме.

Результаты и их обсуждение

В результате синтеза трейсера и его очистки методом ТСХ с полученной хроматограммы были собраны продукты реакции с R_f 0,15, 0,7, 0,75, 0,9. Изучение связывания этих компонентов со специфическими антителами методом ПФИА показало, что трейсер со значением $R_f=0,9$ обладает более высоким специфическим связыванием, вследствие чего он был выбран для дальнейших исследований.

Изучение связывающей способности поликлональных антисывороток проводили методом ПФИА, сравнивая их титры при 70 % связывания меченого антигена (рис. 1). Результаты, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что титр антисывороток (интегральная характеристика, определяемая концентрацией и аффинностью антител) зависит от количества циклов иммунизации, структуры иммуногена и его качества, а также от индивидуальных особенностей иммунной системы животного. Из имеющихся антисывороток в их оптимальном разведении, установленном в результате экспериментов, лучшими были П-7,8 (14.11.91), Lot 0422-3 в разведении 1600 и Lot 418 в разведении 1:320.

Для оптимизации метода ПФИА П варьировали объем образца, концентрацию трейсера

и степень разведения антисыворотки. Концентрация меченого антигена была близка к минимально детектируемой на используемом приборе. Концентрация трейсера должна обеспечивать значение интенсивности флуоресценции порядка 2000—3000 усл. ед. В данном анализе эта концентрация составила 15,5 нмоль/л. Она позволяла получить воспроизводимые калибровочные графики при экономном расходовании реагентов. Калибровочные кривые ПФИА П с использованием различных поликлональных антисывороток представлены на рис. 2. Разработанный метод анализа является гомогенным, равновесие в системе устанавливается практически сразу после смешения реагентов. Диапазон определяемых данным методом концентраций П составил от 1 до 1000 нг/мл.

С целью изучения влияния структуры иммуногена на результаты анализа было исследовано поведение в анализе поликлональных антител, полученных к конъюгатам 3-СМО-Prog-KLH (гомологичный анализ) и 11 α -HS-Prog-KLH (гетерологичный анализ). Структуры этих иммуногенов изображены на рис. 3. Как правило, антитела вырабатываются на антигенную детерминанту, фрагмент белка-носителя и на химическую «ножку», соединяющую между собой гаптен и бе-

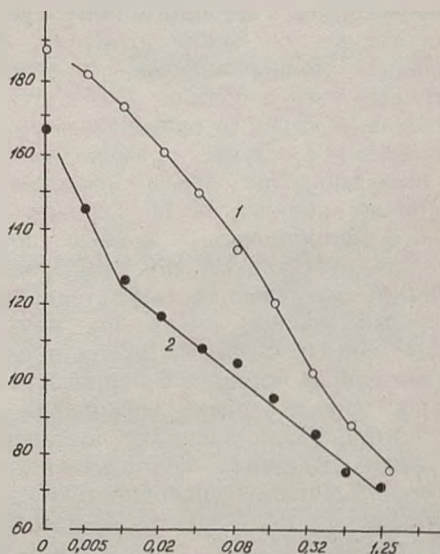


Рис. 2. Калибровочные графики для ПФИА П.

1 — гомологичный анализ (антисыворотка Lot 0422-3, разведение 1:600); 2 — гетерологичный анализ (антисыворотка Lot 418, разведение 1:320). По ос абсцисс — концентрация прогестерона (в мкг/мл).

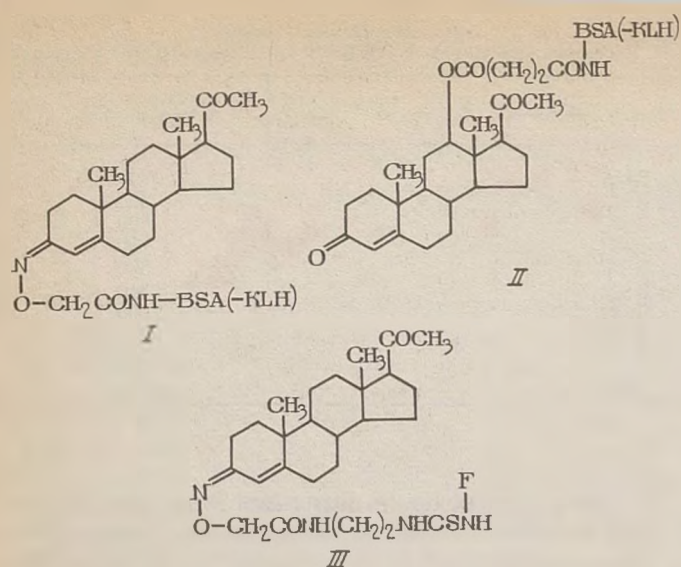


Рис. 3. Структуры иммуногенов (I, II) и трейсера (III), используемых при определении П методом ПФИА.

I — 3-СМО-Прог-BSA (-KLH); II — 11α-НС-Прог-BSA (-KLH); III — 3-СМО-Прог-EDF; F — флюоресценин.

лок-носитель [3]. В предлагаемой работе исследовались иммуногены, один из которых (3-СМО-Прог-KLH, см. рис. 1, 2) является гомологичным по своей структуре используемому в анализе трейсеру (3-СМО-Прог-EDF, см. 2, III), а другой (11α-НС-Прог-KLH, см. рис. 2, II) — гетерологичным ему как по месту присоединения белка-носителя, так и по структуре химической «ножки». Калибровочные графики для гомологичного (антисыворотка Lot 0422-3, разведение 1:600) и гетерологичного (антисыворотка Lot 418, разведение 1:320) ПФИА П приведены на рис. 2. На данном рисунке видно, что при гетерологичном анализе достигается более высокая чувствительность по сравнению с гомологичным. Это согласуется с данными литературы, полученными для ИФА П [9, 10]. Этот факт можно объяснить следующим образом. Поликлональная антисыворотка, полученная к иммуногену, гетерологичному трейсеру по своей структуре, содержит антитела, обладающие меньшей специфичностью к трейсеру, чем гомологичные ему антитела. Из этого следует, что вытеснение меченого гаптена немеченым происходит лучше в случае применения гетерологичной антисыворотки, что и позволяет определять меньшие количества П. Следует отметить также, что калибровочные кривые, полученные в результате двух данных анализов, различны по своей форме. Зависимость, характеризующая гетерологичный анализ, имеет вид двух пересекающихся прямых с разным углом наклона. Это свидетельствует о наличии в используемой поликлональной антисыворотке нескольких субпопуляций антител, различающихся по своей аффинности. Высокоаффинная субпопуляция обладает большей связывающей способностью по отношению к определяемому веществу, чем низкоаффинная, что определяет вид данной калибровочной зависимости.

Выполнив 10 повторных измерений нулевого стандарта и используя метод расчета D. Rodbarg [13], при 95 % уровне достоверности мы нашли,

что минимальная определяемая концентрация П составила 7 нг/мл для анализа с использованием лучшей антисыворотки отечественного производства (П-8, 14.11.91), 1,6 и 0,8 нг/мл при использовании антисывороток английского производства Lot 0422-3 (гомологичный анализ) и Lot 418 (гетерологичный анализ) соответственно. Полученные значения уступают по величине чувствительности аналогичным величинам для гетерогенных методов анализа П, но последние два значения достаточны для определения необходимых минимальных концентраций П, содержащихся в организме.

Для оценки воспроизводимости результатов анализа использовали 3 промежуточных стандарта, содержащих 0,01, 0,08 и 0,625 мкг/мл П. Измеряли поляризацию флюоресценции для каждого из них 5 раз и рассчитывали по калибровочной кривой средние значения определяемых концентраций и их коэффициенты вариации, которые составили 11, 5,4 и 4,3 % соответственно. Коэффициенты вариации концентраций тех же стандартов по результатам трех анализов в разные дни равны 12,2, 8,1 и 6,7 % соответственно. Для определения правильности разработанной методики был проведен тест на линейность, который заключался в последовательном разбавлении буфером стандарта с высоким содержанием П (2,5 мкг/мл) в 2, 4 и 8 раз и последующем измерении поляризации флюоресценции в 5 повторах для каждого разбавления. Затем по калибровочной кривой рассчитывали средние значения концентраций П, соответствующие каждому разбавлению, и находили отношение найденной таким образом концентрации к рассчитанной из концентрации исходного стандарта. Полученные результаты выражали в виде среднего процента аналитического открытия, который в данном методе составил 95, 100, 100 % для каждого последовательного двукратного разбавления контрольного образца соответственно. Данные аналитические характеристики были определены для калибровочной зависимости, полученной с использованием антисыворотки Lot 0422-3 (гомологичный анализ).

Определяя специфичность анализа методом поляризации флюоресценции, мы исследовали перекрестные реакции с родственными П веществами, также принадлежащими к классу стероидных гормонов. Расчет производили при 50 % вытеснении меченого антигена. Максимальный процент перекрестного реагирования для родственного П соединения — 11α-гидроксипрогестеро-

Таблица 2

Перекрестные реакции (в %) различных стероидных гормонов при определении П методом ПФИА

Реагент	% перекрестного реагирования
П	100
11α-Гидроксипрогестерон	15
Тестостерон	0,6
Кортизол	<0,1
Кортикостерон	<0,1
Деоксикортикостерон (21-гидроксипрогестерон)	1,8

на — составляет 15 % (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высокой специфичности анализа с использованием данных антител (Lot 0422-3), что позволяет определять П в присутствии других стероидных гормонов.

В заключение следует отметить, что предложенный метод ПФИА прост, быстр и надежен. Он может быть использован для разработки методики ПФИА определения концентрации П в различных биологических объектах.

Выводы

1. Синтезирован и очищен конъюгат 3-СМО-Prog, меченный флюоресцеином, который может быть использован в качестве трейсера для ПФИА П.

2. Разработаны и оптимизированы условия проведения ПФИА П в полуавтоматическом режиме на ТDx-анализаторе фирмы «Abbot» (США). Анализ 10 образцов занимает 5—7 мин; диапазон определяемых концентраций П составляет 1—1000 нг/мл. Определены следующие аналитические характеристики ПФИА П: чувствительность, воспроизводимость, линейность, специфичность.

3. Изучено влияние структуры иммуногена на результаты ПФИА П. Показано, что нижний предел обнаружения П методом ПФИА с применением антител, полученных к иммуногену 11 α -HS-Prog-KLH, ниже (0,8 нг/мл), чем с использованием антител, полученных к иммуногену 3-СМО-Prog-KLH (1,6 нг/мл).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бекбергенов Б. М., Житников В. Т. // Антибиотики и химиотер.— 1988.— Т. 33, № 1.— С. 72—76.
2. Новые методы иммуноанализа / Тертон М., Бангхем Д. Р., Колкотт К. А. и др.; Пер. с англ.— М., 1991.
3. Теория и практика иммуноферментного анализа / Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М.— М., 1991.

4. Bourque J., Sulon J., Demey-Ponsart E. et al. // Clin. Chem.— 1986.— Vol. 32, N 6.— P. 948—951.
5. Dandliker W. B., Schapiro H. C., Meduski J. W. et al. // Immunochemistry.— 1964.— Vol. 1.— P. 165—191.
6. Dray F., Andrieu J.-M., Renaud F. // Biochim. biophys. Acta.— 1975.— Vol. 403.— P. 131—136.
7. Joice B. J., Gracham F. R., Farmey D. R. // Steroids.— 1977.— Vol. 29, N 5.— P. 761—767.
8. Methods of Enzymatic Analysis.— 3-d Ed / Ed. H. U. Bergmeyer.— Weinheim, 1985.— Vol. 8.— P. 212—222.
9. Mitsuima M., Kambegawa A., Okinaga S., Arai K. // J. Steroid Biochem.— 1987.— Vol. 28, N 1.— P. 83—88.
10. Munro C., Stabenfeldt G. // J. Endocr.— 1984.— Vol. 101.— P. 41—49.
11. Pourfarzaneh M., White G. W., Landon J., Smith D. S. // Clin. Chem.— 1980.— Vol. 26, N 6.— P. 730—733.
12. Prakash B. S., Meyer H. H. D., Schallenberger E., van de Wiel D. F. M. // J. Steroid Biochem.— 1987.— Vol. 28, N 6.— P. 623—627.
13. Rodbard D. // Analyt. Biochem.— 1978.— Vol. 90.— P. 1—12.
14. Sauer M. J., Foulkes J. A., Cookson A. D. // Steroids.— 1981.— Vol. 38, N 1.— P. 45—53.

Получена 24.11.93

A. Yu. Kolosova, S. A. Yeregin, Ye. M. Gavrilo娃, A. M. Yegorov — POLARIZATION FLUOROIMMUNOASSAYS OF PROGESTERONE

Summary. A quick reliable homogenous polarization fluoroimmunoassay (PFIA) of progesterone was developed. The assay is carried out with Abbott TDx (USA) polarization fluorometer and it takes 5-7 min to analyze 10 samples by this method. The range of progesterone concentrations determined is 1 to 1000 ng/ml. Fluorescein labeled progesterone-3-carboxymethyloxime which was used as tracer (labeled antigen) during analysis has been synthesized and purified. Two types of PFIA were developed: one making use of rabbit antiserum to progesterone-3-carboxymethyloxime conjugated with bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH), in the other antiserum to progesterone-11-hemisuccinate-BSA (or KLH) is used. Different combinations of the tracer and antibodies were used. The sensitivity of heterologous PFIA (with antibodies to immunogen heterologous to tracer by structure) was higher than that of homologous PFIA. The test is sufficiently sensitive and specific. The method is particularly valuable for determination of progesterone in model solutions (using buffer standards).

◆ ОБЗОРЫ

© В. Н. БАБИЧЕВ, 1994

УДК 616.43/.45-008.6-053.67-07

В. Н. Бабичев

НЕЙРОЭНДОКРИННЫЙ КОНТРОЛЬ ПРОЦЕССОВ ПУБЕРТАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА И ПРИМАТОВ

Лаборатория физиологии эндокринной системы (руководитель — проф. В. Н. Бабичев) Эндокринологического научного центра (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Попытки специалистов определить понятие «пубертация» до настоящего времени не закончились, и сам процесс не конкретизирован. В настоящее время пубертация рассматривается как период становления, в течение которого формируются сексуальная чувствительность, развиваются вторичные половые признаки, впервые появляется менструация у самок. Насколько это сочетание признаков является полным и может быть широко использовано как профессионалами, так и неспециалистами, покажет будущее. Однако, несомненно, что процесс пубертации — явление временное и включает в себя как рост, так и дифференциацию. У человека и приматов нормальный процесс пубертации происходит в период роста и за-

канчивается после полной дифференциации. Особенностью полового развития у приматов является наличие значительного интервала между моментом рождения и началом пубертационного процесса, начало сперматогенеза или овариального цикла у них наступает во втором десятилетии жизни.

Процесс пубертации у приматов измеряется несколькими годами и характеризуется каскадом морфологических, физиологических и поведенческих процессов, повышением овариальной и тестикулярной активности. Некоторые биологические изменения протекают дискретно и могут быть оценены количественно в этой фазе развития, другие — менее очевидны и их оценка более сложна. Однако большинство