

НОВЫЙ МЕТОД, БАЗИРУЮЩИЙСЯ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕННЫХ МАЖОРНЫХ БЕЛКОВ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ, СПОСОБСТВУЕТ УМЕНЬШЕНИЮ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО СИГНАЛА В ИММУНОАНАЛИЗЕ

Горяйнова О.С., Хан Е.О., Иванова Т.И., Тиллиб С.В.

ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Ахиллесовой пятой иммуноанализа является порой недооцениваемая проблема его восприимчивости к различным интерференциям (помехам, вмешательствам в анализ). Присутствие в пробе пациента мешающих веществ может привести к ошибочному результату теста, следствием чего может стать неправильная диагностика и катастрофические последствия для пациента, поэтому следует уделять особое внимание выявлению возможных интерференций в используемых тест-системах и при возможности разрабатывать и применять методы их преодоления.

Особенно остро вопрос борьбы с интерференциями стоит в случае иммуноанализа биомаркеров в плазме или сыворотке крови человека. Для уменьшения возможных интерференций желательно было бы иметь возможность специфичной и адаптируемой предобработки препаратов крови для конкретного анализируемого маркерного белка, для конкретной тест-системы. Мы предполагаем, что такую предобработку можно сделать с помощью комбинирования иммуносорбентов, базирующихся на использовании особых однодоменных антител (нанотел). Нанотела — рекомбинантные белки, производные однодоменных антиген-узнающих вариабельных фрагментов особых антител, состоящих из димера укороченных тяжелых цепей при полном отсутствии легких цепей. Такие особые антитела присутствуют в норме, наряду с обычными антителами, у представителей семейства *Camelidae* (Верблюдовые) и у некоторых видов хрящевых рыб. Особые свойства нанотел могут обеспечить определенные преимущества при их использовании по сравнению с антителами традиционной структуры и их производными. В данной работе впервые показано, что иммуносорбенты на основе определенной комбинации используемых в качестве лигандов однодоменных антител, способных специфически связывать (и удалять) конкретные мажорные белки крови человека, могут быть подобраны для заданного маркерного антигена крови таким образом, что будут эффективным инструментом предобработки крови с целью уменьшения возможных эффектов интерференции и повышения чувствительности при диагностическом иммуноферментном анализе «сэндвич»-типа. Новый метод предобработки плазмы крови продемонстрирован на примере препаратов плазмы крови (в разведении 1:40) двух пациентов. Ранее разработанная модельная система детекции белка лактоферрина была использована для анализа образцов плазмы крови. Показано, что можно существенно повысить соотношение суммарного детектируемого сигнала к неспецифическому фону, связанному с интерфе-

Адрес для переписки:

*Тиллиб Сергей Владимирович
ФГБУН «Институт биологии гена»
Российской академии наук
119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, 34/5.
Тел.: 8 (499) 135-22-01.
E-mail: tillib@genebiology.ru*

Address for correspondence:

*Tillib Sergei V.
Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences
119334, Russian Federation, Moscow, Vavilov str., 34/5.
Phone: 7 (499) 135-22-01.
E-mail: tillib@genebiology.ru*

Образец цитирования:

*О.С. Горяйнова, Е.О. Хан, Т.И. Иванова, С.В. Тиллиб
«Новый метод, базирующийся на использовании
иммобилизованных однодоменных антител
для удаления определенных мажорных белков из плазмы
крови, способствует уменьшению неспецифического
сигнала в иммуноанализе» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 567-575.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-567-575
© Горяйнова О.С. и соавт., 2019*

For citation:

*O.S. Goryainova, E.O. Khan, T.I. Ivanova, S.V. Tillib
“A new method based on the use of immobilized single-domain
antibodies to remove certain major proteins from blood plasma
helps to reduce nonspecific signal in an immunoassay”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 3, pp. 567-575.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-567-575*

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-567-5765

ренциями, за счет сильного уменьшения этого фона путем аффинного удаления (с помощью соответствующих иммобилизованных однодоменных антител) из препаратов плазмы крови фракции трех мажорных белков: фибриногена, иммуноглобулинов класса G, альфа-2-макроглобулина.

Ключевые слова: однодоменные антитела, иммуносорбенты, предобработка плазмы крови, иммуноанализ

A NEW METHOD BASED ON THE USE OF IMMOBILIZED SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES TO REMOVE CERTAIN MAJOR PROTEINS FROM BLOOD PLASMA HELPS TO REDUCE NONSPECIFIC SIGNAL IN AN IMMUNOASSAY

Goryainova O.S., Khan E.O., Ivanova T.I., Tillib S.V.

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. A generally underestimated problem of immunoassays is its susceptibility to various interferences, being the Achilles heel of these assays (interventions in the analysis). The presence of interfering substances in the patient's specimen can cause erroneous test sample result, which may lead to incorrect diagnosis and catastrophic consequences for the patient. Hence, one should pay particular attention to identifying possible interferences in the test systems used and, when possible, develop and apply methods to overcome them. The issue of avoiding interference is particularly important for immunoassays of biomarkers in human plasma or serum. In order to reduce possible interferences, it would be desirable to have an opportunity of specific and adaptable pretreatment of blood samples for a specifically assayed marker protein, as applied to a specific test system. We assume that such pretreatment may be done by combining the immunosorbents based on the use of special single-domain antibodies (nanobodies).

The nanobodies are recombinant proteins, derivatives of single-domain antigen-recognizing variable fragments of specific antibodies, consisting of a dimer of truncated heavy chains in the complete absence of light chains. Such specific antibodies are detectable in the normal samples taken from members of the *Camelidae* family (Camelids), and in some species of cartilaginous fishes, along with the common antibodies. The special properties of nanobodies can provide certain advantages in their use, compared with antibodies of traditional structure and their derivatives.

In this paper, we have shown for the first time, that the immunosorbents based on certain combination of single-domain antibodies used as ligands able for specifically binding and removal of specific high-abundance human blood proteins, may be selected for a given marker blood antigen in such a way that they will be an effective tool for blood pretreatment, aiming to reduce possible effects of interference and increased sensitivity in the diagnostic "sandwich" enzyme immunoassay. A new method of plasma pretreatment is demonstrated with human plasma samples (at a dilution of 1:40) of two patients. A previously developed model system for detection of lactoferrin protein was used to analyze plasma samples. It is shown that a significantly increased ratio of total detected signal to the nonspecific background signal could be obtained after drastic reduction of this background by affinity removal of 3 major protein fractions, i.e., fibrinogen, IgG alpha-2-macroglobulin from blood plasma samples, using appropriate immobilized single domain antibodies.

Keywords: single-domain antibodies, immunosorbents, blood plasma pre-treatment, immunoassay

Введение

Иммуноанализ (ИА), в частности одна из наиболее популярных его разновидностей — «сэндвич»-иммуноферментный анализ (ИФА), является важной высокочувствительной технологией определения анализируемого вещества (аналита) в составе биологической жидкости в современных клинических и исследовательских лабораториях. В основе этого метода находится специфическое связывание антителом

(лигандом) детектируемого вещества (антигена, аналита). Ахиллесовой пятой ИА является порой недооцениваемая проблема его восприимчивости к различным интерференциям (помехам, вмешательствам в анализ). Присутствие в пробе пациента мешающих веществ может привести к ошибочному результату теста, либо ложноположительному, либо ложноотрицательному. Интерференции (помехи) могут быть как зависимыми, так и не зависимыми от конкретного

аналита. Интерференции, связанные с составом (с так называемым «матриksom») антигенсодержащего образца, например, с разными степенями гемолиза (разрушением оболочки эритроцитов с высвобождением гемоглобина), с желтухой (повышенным содержанием в крови билирубина), с липемией (повышенным содержанием в крови нейтральных жиров, триглицеридов и липопротеинов), с воздействием антикоагулянтов, с особенностями отбора и хранения образцов и другими, носят общий характер и не зависят от концентрации анализита. Анализит-зависимые интерференции в ИА обычно вызваны взаимодействием компонентов в образце с одним или несколькими реагентами на основе антител к исследуемому анализиту. Причиной таких интерференций могут быть довольно часто присутствующие в плазме крови пациентов гетерофильные антитела, человеческие антитела против животных, аутоантитела к анализиту, ревматоидный фактор, связывающие белки и другие молекулы. Величина эффекта интерференции зависит от концентрации мешающего вещества, но не обязательно прямо пропорционально. Интерференции могут приводить к противоречивым результатам с использованием разных систем анализа. Ошибка тестирования, связанная с интерференцией, может быть клинически значимой и может привести к неправильной диагностике и катастрофическим последствиям для пациента, поэтому следует уделять особое внимание выявлению возможных интерференций в используемых тест-системах и при возможности разрабатывать и применять методы их преодоления [4, 12].

Особенно остро вопрос борьбы с интерференциями стоит в случае иммуноанализа биомаркеров в плазме или сыворотке крови человека. Для уменьшения возможных интерференций желательным было бы иметь возможность специфичной и адаптируемой предобработки препаратов крови для конкретного анализируемого маркерного белка, для конкретной тест-системы. Мы предполагаем, что такую предобработку можно сделать с помощью комбинирования иммуносорбентов, базирующихся на использовании особых однодоменных антител (нанотел – nanobodies). Нанотела – рекомбинантные белки, производные однодоменных антиген-узнающих переменных фрагментов особых антител, состоящих из димера укороченных тяжелых цепей при полном отсутствии легких цепей. Такие особые антитела присутствуют в норме, наряду с обычными антителами, у представителей семейства *Camelidae* (Верблюдовые) и у некоторых видов хрящевых рыб. Особые свойства нанотел могут обеспечить определенные преимущества при их

использовании по сравнению с антителами традиционной структуры и их производными [2, 5, 6, 8, 9, 10]. Так, малый размер облегчает всевозможные генно-инженерные модификации последовательностей, кодирующих исходно получаемые нанотела. Высокая растворимость, стабильность, способность к быстрой ренатурации нанотел делают возможным их повторное или многократное использование в иммобилизованной форме в различных иммуносорбентах без заметной потери активности. Нанотела способны формировать необычные паратопы и узнавать необычные для классических антител уникальные нативные эпитопы (преимущественно конформационные эпитопы), что может приводить к особо высокой специфичности узнавания. Нанотела состоят только из одного антиген-узнающего домена, не имеют константных Fc-участков классических антител, которые часто бывают мишенями гетерофильных интерферирующих антител в исследуемых образцах крови. Наконец, наличие эффективной процедуры генерирования и отбора, простота наработки однодоменных антител позволяют сделать технологию их получения экономичной.

Мы ранее разработали эффективную процедуру последовательного многостадийного генерирования однодоменных антител к различным мажорным белкам плазмы крови [1]. Эффективность разработанного метода была продемонстрирована на примере получения нанотел к белкам, наиболее богато представленным в протеоме плазмы крови, таким как сывороточный альбумин (Alb), различные классы иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM), альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$), фибриноген (Fg). Отобранные однодоменные антитела использовали в качестве лигандов при создании новых иммуносорбентов (материалов с иммобилизованными антителами), с помощью которых возможно специфическое извлечение из плазмы крови соответствующих мажорных белков и ассоциированных с ними молекул. В результате проведенного исследования были получены новые уникальные инструменты для предобработки препаратов крови и выделения специфических белков и субпротеомов, ассоциированных с определенными мажорными плазматическими белками. В данной работе мы демонстрируем примеры практического применения таких иммуносорбентов на основе нанотел для уменьшения влияния интерференций на результат ИА.

Мы используем в качестве модельной системы детекцию белка лактоферрина в образце плазмы крови человека, используя ранее полученную нами пару нанотел, узнающих непрерываю-

щиеся эпитопы белка лактоферрина [11]. Лактоферрин (LF) представляет собой гликопротеин с высокой функциональной универсальностью, который содержится в большинстве жидкостей организма (в том числе и в крови, где его концентрация в норме примерно 1 мкг/мл). LF является иммуномодулирующим фактором, который важен как для врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. Он обладает антимикробной активностью против паразитов, грибов и вирусов, а также обладает регенеративными свойствами на тканевом уровне и антиканцерогенной активностью. Все эти свойства определяют высокий терапевтический потенциал LF, который пока мало используется [7].

Целью исследования в данной работе была демонстрация того, что иммуносорбенты на основе определенной комбинации однодоменных антител (нанотел), способных специфически связывать (и удалять) конкретные мажорные белки крови человека, могут быть подобраны для заданного маркерного антигена крови таким образом, что будут эффективным инструментом предобработки крови с целью уменьшения интерференции (неспецифического фонового сигнала) и повышения чувствительности при диагностическом иммуноферментном анализе.

Материалы и методы

Плазма периферической крови двух здоровых доноров получена из Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. В качестве коагулянта использован гепарин (50 ед./мл).

Наработанные форматированные нанотела пришивали к CNBr-активированной Сефарозе 4В (GE Healthcare Life Sciences), согласно рекомендациям производителя и как описано ранее [1, 11]. Таким образом, получали новые иммуносорбенты (иммуноаффинные колонки), специфичность которых определялась свойствами иммобилизованного нанотела. Такие иммуносорбенты с иммобилизованными отобранными нанотелами использовали для специфического истощения плазмы крови. Эти эксперименты проводили по описанным ранее методикам [1, 11].

20 мкл плазмы крови развели в 20 раз в стандартном солевом растворе PBS (400 мкл). Разбавленную плазму последовательно пропускали через 1 или 3 иммуносорбента, полученных в результате пришивки наноантител к CNBr-активированной сефарозе 4В (GE Healthcare Life Sciences): иммуносорбенты с иммобилизованными однодоменными антителами к фибриногену, Ig G, α -2-макроглобулину (3 разные колонки).

Объем каждой колонки составлял примерно 0,15 мл, и к ней было пришито примерно 0,25 мг нанотел (1,7 мг/мл). В каждом случае собирали проскок и промывку (суммарный объем 800 мкл). Отобрали аликвоту проскока (истощенной плазмы) и элюатов (связавшийся белок элюировали раствором 0,1 М глицин-HCl, pH 2,7, и нейтрализовали раствором 1 М Трис) для проверки качества истощения методом электрофореза в 5-19%-ном градиентном полиакриламидном геле. Полученный препарат плазмы, разведенный в 40 раз, использовали для иммуноанализа.

Имуноферментный анализ в «сэндвич»-формате проводили, как описано ранее [11] с небольшими модификациями. Нанотело LF6 в концентрации 2 мкг/мл пассивно иммобилизовали в лунках иммунологического планшета (NuncMaxisorp) в 100 мкл PBS в течение ночи при 4 °С. После промывки в PBS (три смены) лунки блокировали в 5% сыворотке верблюда (ранее нами полученной перед началом иммунизации верблюда) в 1% казеиновом блокирующем буфере (Sigma) в течение 2 часов. После промывки с PBS (три смены) в лунки вносили препараты разбавленной плазмы, к которой добавляли до 5% сыворотки верблюда, и инкубировали при перемешивании в течение 1 часа. Затем трижды проводили промывку в PBS с 0.05% Tween-20 (PBT). В качестве вторичных антител использовали биотинилированное нанотело LF5. Биотинилирование проводили с помощью препарата Biotin-XX (Sigma) согласно протоколу фирмы. Биотинилированное нанотело LF5 в концентрации 100 нг/мл в казеиновом блокирующем буфере добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 часа. Проводили трижды промывку в PBT, после чего добавляли раствор (100 нг/мл) конъюгата стрептавидина и пероксидазы хрена (Calbiochem, США) в казеиновом блокирующем буфере и инкубировали в течение 1 часа. Проводили трижды промывку в PBT (пять смен) и затем в PBS (2 смены), после чего определяли активность пероксидазы, используя ABTS (Sigma) в качестве хромогенного субстрата. Оптическую плотность (OD) измеряли при 405 нм с помощью Microplate Reader Mul-tiscan EX (Labsystems).

Результаты

Ранее мы и соавторы показали, что полученные однодоменные антитела к лактоферрину человека (LF5 и LF6) могут быть использованы для количественной детекции лактоферрина в формате «сэндвич»-иммуноферментного анализа [11]. Два указанных нанотела узнают неперекрывающиеся эпитопы лактоферрина человека: LF6 используется как иммобилизованное якорное антитело,

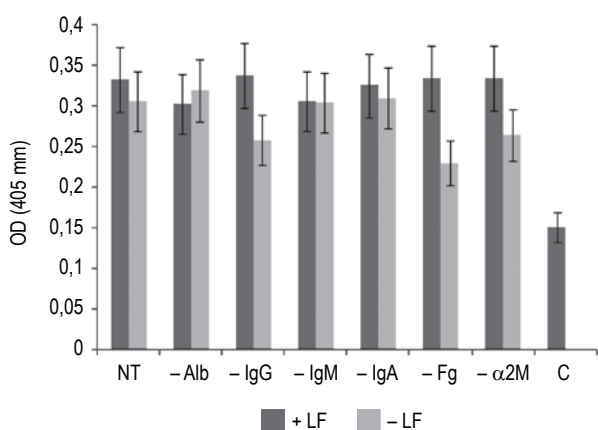


Рисунок 1. Анализ возможности уменьшения интерференции (неспецифического фона) при детекции LF в плазме крови человека (в разведении 1:40) методом иммуноферментного анализа с помощью удаления определенного мажорного белка крови

Примечание. Анализировали препараты плазмы без предобработки (NT) и шесть других, в которых был удален (-) один из белков: сывороточный альбумин (Alb), IgG, IgM, IgA, фибриноген (Fg) или альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$), как указано в подписях в нижней части рисунка. Анализировались препараты как без удаления (темный столбец, +LF), так и после удаления (светлый столбец, - LF) детектируемого антигена (LF) с помощью преадсорбции препарата плазмы крови в лунке с иммобилизованным нанотелом (LF6), связывающим LF. В контрольной лунке (C) не добавляли плазму крови человека, а остальные процедуры были те же, что в остальных лунках. Приведены усредненные результаты экспериментов, выполненных в трех повторах. Отрезки отражают диапазон разброса получаемых результатов.

Figure 1. Analysis of the possibility to reduce the interference (non-specific background) by removing a specific major blood protein in the detection of LF in human blood plasma (at a dilution of 1:40) by enzyme immunoassay

Note. The plasma samples were analyzed without pretreatment (NT) and six others, in which one of the following proteins was removed: serum albumin (Alb), IgG, IgM, IgA, fibrinogen (Fg) or alpha-2-macroglobulin ($\alpha 2M$), as indicated in the captions at the bottom of the figure. The preparations were analyzed both without removal (dark column) and after removal (light column) of the being detected antigen (LF) using pre-subtraction of the blood plasma preparation in the well with the immobilized nanobodies (LF6) binding the LF. In the control well (C), there was no human blood plasma added. The averaged results of experiments performed in triplicate are given. The vertical segments reflect the range of the results obtained.

а биотинилированное нанотело LF5 используется как детектирующее нанотело (наряду с последующим добавлением конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена и завершающим этапом – пероксидаза-зависимой колориметрической реакцией). В такой постановке линейную корреляцию зависимости величины поглощения от концентрации LF наблюдали для концентраций LF в диапазоне от 6 до 150 нг/мл (0,3-5 нМ).

По литературным данным, концентрация LF в крови в норме составляет примерно 1 мкг/мл. Таким образом, препарат плазмы крови в разведении 1:100-1:10 (с предполагаемой концентрацией LF 10-100 нг/мл) может быть потенциально использован для детекции LF в данной модельной тест-системе. В данной работе мы использовали препарат плазмы крови, разведенный в 40 раз. Производные плазмы после предобработок доводили до такого же разведения относительно исходного препарата. Для контроля неспецифического фона, не связанного с LF и являющегося результатом потенциально возможных интерференций, мы специфически удаляли LF из образца плазмы с помощью иммобилизованных нанотел (LF6). Эту процедуру проводили тремя способами: а) путем пропускания разведенного (1:10) препарата плазмы крови через колонку с иммобилизованным LF6; б) с помощью предварительной инкубации образца разбавленной плазмы в лунке иммунологического планшета с иммобилизованным LF6; в) путем добавления в раствор анализируемого образца того же «якорного» LF6 в концентрации примерно 2 мкг/мл и прединкубации для связывания/блокирования LF. Эффективность «удаления»/блокирования связывания LF в случае всех трех указанных предобработок было примерно одинаковым, так что далее мы использовали два последних варианта как более удобные.

Мы использовали отдельно шесть разных иммуносорбентов, полученных на основе шести ранее полученных и охарактеризованных нанотел, специфически связывающих один из 6 мажорных белков крови: сывороточный альбумин (Alb), IgG, IgM, IgA, фибриноген (Fg) или альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$). При пропускании препарата плазмы крови через эти иммуносорбенты мы можем специфически удалять определенный мажорный белок и, возможно, какие-то другие компоненты, которые потенциально могут быть связаны в крови с этим мажорным белком. В экспериментах, результаты которых отражены на рисунке 1, мы использовали препараты плазмы крови, разведенные в 40 раз, полученные до и после описанных выше предобработок. В нижней части рисунка указаны названия образцов: без предобработки (NT) и шесть других, в которых было проведено удаление одного из мажорных вариантов белков крови. В каждом случае анализировались препараты как без удаления (темный столбец), так и после удаления (светлый столбец) детектируемого антигена (LF).

Из полученных результатов видно, что в исходном препарате плазмы крови (без предобработки) в данной модельной тест-системе досто-

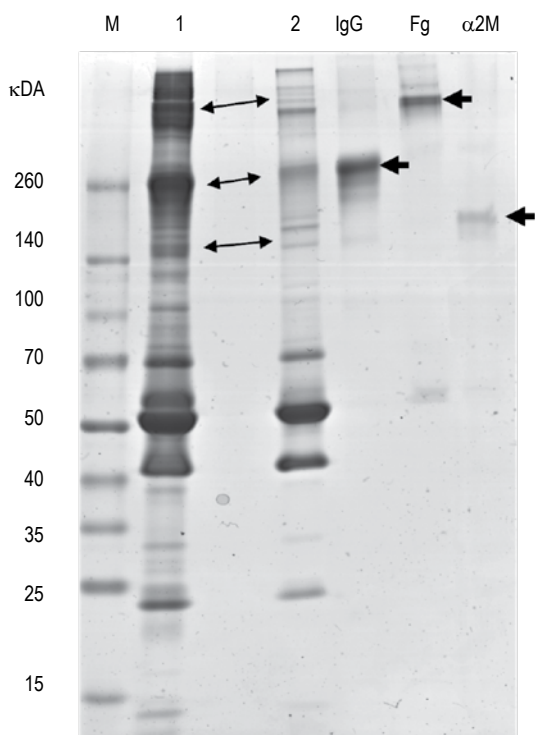


Рисунок 2. Иммуносорбенты на основе полученных однодоменных антител позволяют специфически истощать плазму крови

Примечание. Электрофоретический анализ (в градиентном 5-19%-ном SDS-полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях) белков плазмы крови до (1) и после (2) специфических истощений, в которых удаляли мажорные белки Fg, IgG, и α 2M. Стрелками указаны положения истощаемых белков. М – смесь маркерных белков (Spectra BR, Thermo Scientific). Исследовали образцы, эквивалентные примерно 0,5 мкл плазмы крови, и элюаты связавшихся белков, эквивалентные 1 мкл плазмы крови.

Figure 2. Immunosorbents with cross-linked single-domain antibodies obtained allow specific depletion of blood plasma
Note. Electrophoretic analysis (in a gradient 5-19% SDS-polyacrylamide gel under non-reducing conditions) of plasma proteins before (1) and after (2) specific depletions, in which major Fg, IgG, and α 2M proteins were removed. The arrows indicate the positions of the depleted proteins. M is a mixture of marker proteins (Spectra BR, Thermo Scientific). Samples quantitatively corresponding to approximately 0.5 μ l of blood plasma and eluates of bound proteins corresponding to 1 μ l of blood plasma were examined.

верная детекция LF невозможна: детектируемые сигналы до и после удаления этого белка отличаются лишь незначительно, и области разброса этих сигналов практически перекрываются. Предобработка плазмы крови, заключающаяся в иммуноаффинном удалении определенного мажорного компонента крови, приводит к желаемому эффекту только в трех из шести исследуемых вариантов: в случае удаления IgG, Fg и α 2M.

С целью усилить обнаруженный эффект мы решили провести предобработку плазмы крови, удалив последовательно на трех соответствующих иммуносорбентах все три этих компонента: IgG, Fg и α 2M.

На рисунке 2 приведены результаты фракционирования исходного (1) и предобработанного (2) препаратов плазмы крови, а также связавшихся с колонками, а затем элюированных белков, в градиентном 5-19% SDS-полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях. Можно видеть, что в результате предобработки заметно истощился материал, движущийся в районах геля, соответствующих истощаемым белкам.

В экспериментах, результаты которых представлены на рисунке 3, для детекции LF использовали образцы плазмы крови, полученные от двух разных пациентов (P1 и P2). В каждом случае параллельно проводили аналогичные процедуры предобработки и анализа.

Из представленных результатов можно видеть, что проведенные предобработки не привели к уменьшению сигналов детекции LF, детектируемая концентрация которого в обоих образцах примерно одинакова. При этом наблюдается выраженный эффект предобработки, удаляющей три мажорных белка из плазмы крови, который четко виден при сравнении относительного уменьшения интерференционных (фоновых, но связанных с составом плазмы) сигналов при блокировании связывания LF с иммобилизованным в лунке нанотелом LF6, сравнение серых столбиков в случае контрольного эксперимента (P') и эксперимента, в котором выявлена доля сигнала (величина уменьшения сигнала), связанная с собственно детекцией LF (P''). На рисунке 3Б этот эффект уменьшения доли интерференционного фона (в процентах) от величины суммарного сигнала виден лучше. При вычитании величины контроля, не связанного с плазмой крови, можно оценить как весьма существенное уменьшение интерференции (как доли фона от суммарного сигнала, в %) в случае обоих образцов.

Таким образом, в данной работе на примере конкретной модельной тест-системы (детекции лактоферрина в плазме крови человека), основанной на методе «сэндвич»-ИФА, было продемонстрировано то, что иммуносорбенты на основе определенной комбинации однодоменных антител (нанотел), способных специфически связывать и удалять конкретные белки крови человека, могут быть подобраны для заданного маркерного антигена крови таким образом, что будут эффективным инструментом предобработки крови с целью уменьшения неспецифическо-

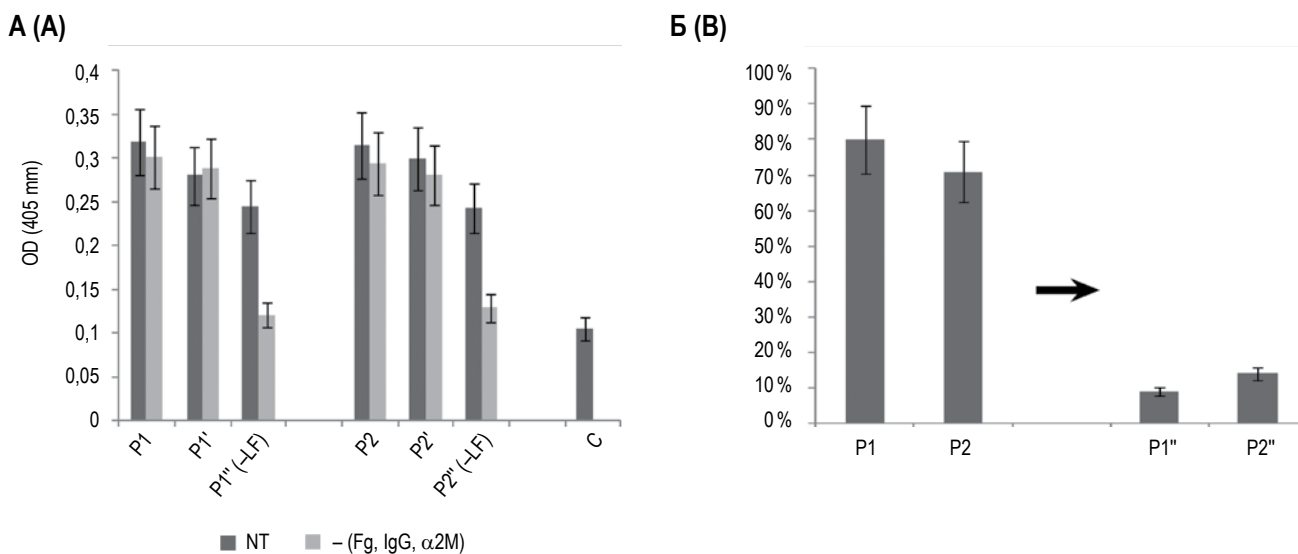


Рисунок 3. Уменьшение неспецифического фона в ИФА (детекция LF) в результате предобработки плазмы крови, заключающейся в иммуноаффинном удалении фибриногена (Fg), иммуноглобулинов класса G (IgG) и α-2-макроглобулина (α2M)

Примечание. Иммуносорбенты на основе однодоменных антител к указанным белкам были использованы для их удаления при предобработке плазмы крови человека. Новый метод предобработки плазмы крови продемонстрирован на примере препаратов плазмы крови (в разведении 1:40) двух пациентов (P1 и P2). (А) Результат ИФА для исходных (темный столбец, NT) и предобработанных (светлый столбец, – (Fg, IgG, α2M)) препаратов плазмы. Примерно за 1 час до проведения эксперимента к некоторым препаратам плазмы добавляли нанотела, связывающие LF, идентичные якорным LF6 (P1'' и P2''), или контрольные нанотела, не узнающие LF (P1' и P2'). Контрольная лунка (C) отличалась только тем, что в нее препарат плазмы человека не добавляли. (Б) При вычитании величины контроля, не связанного с плазмой крови, можно оценить достигаемое уменьшение интерференции при предложенном варианте предобработки плазмы крови. Видно существенное уменьшение интерференции (как доли фона от суммарного сигнала, в %) в случае обоих образцов. Приведены усредненные результаты экспериментов, выполненных в трех повторах. Отрезки отражают диапазон разброса получаемых результатов.

Figure 3. Reduction of non-specific background in ELISA (LF detection) as a result of plasma pretreatment, consisting in immunoaffinity removal of fibrinogen (Fg), class G immunoglobulins (IgG) and α-2-macroglobulin (α2M)

Note. Immunosorbents based on single-domain antibodies to these proteins were used to remove them in the preprocess of human blood plasma pretreatment. A new method of blood plasma pretreatment is demonstrated on two plasma samples (at a dilution of 1:40) of two patients (P1 and P2). (A) The result of the ELISA for the non-treated plasma (dark column, NT) and pretreated (light column) plasma samples. Approximately 1 hour before the experiment, nanobodies binding LF, identical to anchor LF6 (in case of samples P1'' and P2''), or control nanobody, which did not recognize LF (samples P1' and P2'), were added to some plasma samples. The control well (C) differed only in that no human plasma sample was added to it. (B) By subtracting the amount of control not related to the blood plasma, it is possible to estimate the achievable decrease in the interference with the proposed variant of the plasma blood pretreatment. One can see a significant decrease in interference (as a fraction of the background from the total signal, in %) in the case of both samples. The averaged results of experiments performed in triplicate are given. The vertical segments reflect the range of the results obtained.

го фонового сигнала и повышения чувствительности при диагностическом иммуноанализе.

Обсуждение

В данной работе продемонстрирован большой потенциал использования однодоменных антител (нанотел) для предобработки препаратов плазмы (или сыворотки) крови с целью повышения эффективности иммуноанализа биомаркеров. Мы предполагаем, что приведенный частный случай может отражать достаточно универсальный характер данного подхода для улучшения других тест-систем иммуноанализа для количественного анализа самых разных биомаркеров.

В исследуемой тест-системе детекции белка лактоферрина мы выявили всего три компонента (из имеющегося в наличии пока весьма ограниченного набора инструментов на основе нанотел), удаление которых не приводило к потерям анализируемого вещества, но заметно снижало интерференционный фон. Каждый из этих трех компонентов согласно имеющимся литературным данным, очевидно, может приводить к интерференциям при анализе самых разных биомаркеров в крови. Так, удаление из плазмы крови иммуноглобулинов класса G, очевидно, может уменьшить потенциальные интерференции, связанные с гетерофильными антителами, аутоанти-

телами к анализу, антителами против иммуноглобулинов животных и др. [4].

Фибриноген – один из наименее растворимых и легко преципитирующих мажорных белковых компонентов плазмы. Было показано повышенное сродство фибриногена к иммобилизованным в высокой плотности иммуноглобулинам классов G и A [3]. Очевидно, что удаление этого белка уменьшит вероятность коагуляции или нежелательных агрегаций, а также уменьшит фон, связанный со сродством фибриногена к иммобилизованным антителам.

Альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$) – многофункциональный белок-носитель, связывающий и инактивирующий различные протеазы, связывающий также различные пептиды, ростовые факторы, цитокины, потенциально и некоторые биомаркеры. Конформация этого белка очень чувствительна к различным воздействиям, например, к замораживанию и лиофилизации [13]. Мы хранили образцы плазмы замороженными в аликвотах. При их разморозке $\alpha 2M$ мог изменяться, приобретая способность к повышенной агрегации, при этом теряя способность связывать и инактивировать протеазы. Очевидно, что его удаление из плазмы до ее заморозки (если при этом не удалится исследуемый биомаркер) может способствовать уменьшению интерференций в ИА и удалению нежелательных ассоциированных с этим белком протеаз.

Для лучшего результата предложенную предобработку следует проводить на свежеполученных образцах плазмы крови до ее заморозки.

Мы хотим отметить еще один факт, важный для контроля интерференций любой конкретной тест-системы. Желательно иметь возможность блокировки связывания анализируемого вещества (аналита, биомаркера) в образце биологической жидкости с иммобилизованным якорным антителом, чтобы видеть величину интерференционного фонового сигнала. В нашем случае это легко было сделать, предадсорбируя образец в лунке с якорным антителом или добавляя в образец избыток того же нанотела, которое используется как якорное. Также для этой цели можно использовать предварительную блокировку иммобилизованного якорного антитела препаратом очищенного антигена, если такой есть в наличии. Такие контрольные эксперименты необходимы для того, чтобы оценить долю измеряемого сигнала, которая действительно связана с детекцией собственно измеряемого аналита (биомаркера), а не с интерференционными эффектами (неспецифическим фоном).

Благодарности

Работа выполнена в рамках темы Госзадания Министерства науки и высшего образования РФ (№ 0100-2016-0016) и была частично поддержана РНФ (Проект № 15-14-00081).

Список литературы / References

1. Горайнова О.С., Иванова Т.И., Рутовская М.В., Тиллиб С.В. Метод параллельного и последовательного генерирования однодоменных антител для протеомного анализа плазмы крови человека // Молекулярная биология, 2017. Т. 51. № 6. С. 985-996. [Goryainova O.S., Ivanova T.I., Rutovskaya M.V., Tillib S.V. A method for the parallel and sequential generation of single-domain antibodies for the proteomic analysis of human blood plasma. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2017, Vol. 51, no. 6, pp. 985-996. (In Russ.)]
2. Тиллиб С.В., Вятчанин А.С., Муилдерманс С. Молекулярный анализ структуры особых антител *Camelus bactrianus*, состоящих только из тяжелых цепей // Биохимия, 2014. Т. 79. № 12. С. 1687-1697. [Tillib S.V., Vyatchanin A.S., Muyltermans S. Molecular analysis of heavy chain-only antibodies of *Camelus bactrianus*. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 12, pp. 1687-1697. (In Russ.)]
3. Boehm T.K., Sojar H., DeNardin E. Concentration-dependent effect of fibrinogen on IgG-specific antigen binding and phagocytosis. *Cell. Immunol.*, 2010, Vol. 263, no. 1, pp. 41-48.
4. Bolstad N., Warren D.J., Nustad K. Heterophilic antibody interference in immunometric assays. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013, Vol. 27, pp. 647-661.
5. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyltermans S., Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, Vol. 363, pp. 446-448.
6. Harmsen M.M., de Haard H.J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, Vol. 77, pp. 13-22.
7. Moreno-Expósito L., Illescas-Montes R., Melguizo-Rodríguez L. Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. *Life Sciences*, 2018, Vol. 195, pp. 61-64.
8. Muyltermans S., Baral T.N., Retamozzo V.C. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2009, Vol. 128, pp. 178-183.
9. Muyltermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.*, 2013, Vol. 82, pp. 775-797.

10. Steeland S., Vandenbroucke R.E., Libert C. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discovery Today*, 2016, Vol. 21, pp.1077-1113.
11. Tillib S.V., Privezentseva M.E., Ivanova T.I. Single-domain antibody-based ligands for immunoaffinity separation of recombinant human lactoferrin from the goat lactoferrin of trasgenic goat milk. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2014, pp. 48-57, 949-950.
12. Ward G., Simpson A., Boscatto L., Hickman P. E. The investigation of interferences in immunoassay. *Clin. Biochem.*, 2017, Vol. 50, pp. 1306-1311.
13. Wyatt A.R., Kumita J.R., Farrowell N/. Alpha-2-macroglobulin is acutely sensitive to freezing and lyophilization: Implications for structural and functional studies. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 6, e0130036. doi: 10.7868/S0026898417060106.

Авторы:

Горайнова О.С. — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Хан Е.О. — к.б.н., младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Иванова Т.И. — к.б.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Тиллиб С.В. — д.б.н., заведующий лабораторией молекулярных биотехнологий ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Goryainova O.S., Junior Research Associate, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Khan E.O., PhD (Biology), Junior Research Associate, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Ivanova T.I., PhD (Biology), Research Associate, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Tillib S.V., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biotechnologies, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 18.12.2018

Отправлена на доработку 26.12.2018

Принята к печати 04.01.2019

Received 18.12.2018

Revision received 26.12.2018

Accepted 04.01.2019