

АНАЛИЗ КРИВЫХ ТИТРОВАНИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ELISA

© С. А. БОБРОВНИК

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: s-bobrov@bk.ru*

Дана новая интерпретация получаемых в эксперименте с помощью метода ELISA дозозависимых кривых титрования, характерных для сывороточных или моноклональных антител, а также для полиреактивных иммуноглобулинов. Показано, что предложенная автором оценка этих кривых позволяет получить дополнительную информацию о свойствах исследуемых образцов антител, в частности о факторах, блокирующих антитела или, наоборот, обстоятельствах, способствующих реакции антиген–антитело.

Ключевые слова: антитела, дозозависимые кривые титрования, ELISA.

Для того, чтобы проследить зависимость активности определенного вида молекул от их концентрации, часто исследуют эту активность при различных разведениях имеющегося в распоряжении исследователя пула данных молекул. При этом обычно получают так называемые дозозависимые кривые титрования, которые могут иметь самую разную форму, что само по себе дает некоторую информацию о свойствах этих молекул. Таким образом, титрование — это часто используемый подход для изучения не только образцов антител, но и многих иных биологически активных молекул [1–5]. Дозозависимые кривые титрования получают для изучения разнообразных молекул и процессов, начиная с самых простых, таких как титрование кислоты щелочью и заканчивая весьма сложными, например, зависимостью выживания клеток культуры ткани от дозы облучения. В данной статье рассматриваются, в основном, кривые титрования сывороточных антител иммуноэнтзимным методом (ELISA).

До конца 70-х годов прошлого века сыворотки в основном титровали с помощью относительно примитивных и менее информативных методов, таких, как метод агглютинации (или метод непрямой агглютинации) и метод преципитации [6–8]. С появлением более точных и более информативных методов анализа образцов антител, в частности такого метода как ELISA, появилась возможность определять активность антител в каждом из образцов, разведенных в несколько раз. Хотя метод ELISA является намного информативнее, чем более

примитивные методы, тем не менее, данные, полученные с помощью ELISA, до последнего времени, в основном, использовали только для оценки концентрации свободных антител в исследуемом образце. Очевидно, что кривые титрования антител, полученные с помощью ELISA, содержат намного больше полезной информации, чем просто полуколичественное сравнение содержания антител в исследуемых образцах. Имеющиеся в литературе данные по этому вопросу мы считаем в некоторой степени ошибочными, и целью настоящей статьи является новая интерпретация особенностей формы дозозависимых кривых титрования сывороточных антител или так называемых полиреактивных иммуноглобулинов (ПРИГ).

В настоящей статье рассматриваются, главным образом, кривые титрования сывороточных и моноклональных антител или ПРИГ, которые содержатся в сыворотках животных и человека, а также которые можно получить путем трансформации в ПРИГ сывороточных или моноклональных антител [9–11]. Можно надеяться, что предложенная нами интерпретация дозозависимых кривых титрования позволит получать дополнительную информацию о свойствах титруемых сывороточных антител, которую ранее просто не замечали вследствие неправильного понимания данного вопроса.

Результаты и обсуждение

Рассмотрим вначале самый простой пример дозозависимого титрования препарата антител с помощью ELISA. Пусть, например,

имеется раствор одного вида моноклональных антител заранее неизвестной концентрации. Тогда, сделав несколько последовательных разведений этих антител и поместив данные образцы в лунки микроплат с сорбированным соответствующим антигеном, с помощью ELISA получим окраску лунок, которая, при условии достаточно больших разведений антител, будет пропорциональна концентрации антител в данных образцах (рис. 1, прямая *a*). Это свидетельствует о том, что к антигену, сорбированному на микроплатах, прикрепилось количество антител, пропорциональное концентрации антител в исследуемых образцах.

Необходимо особо отметить, что такой результат будет получен только в том случае, если концентрации антител в исследуемых образцах будут достаточно низкими, чтобы не получилось так называемого «зашкаливания» в иммуоэнзимной реакции, что может произойти по самым разным причинам. Например, при слишком высокой концентрации антител в исследуемых образцах антитела, связавшиеся с сорбированным антигеном, будут препятствовать свободным антителам, имеющимся в растворе, связываться с антигеном. Поэтому в образцах с более низкими концентрациями антител большая часть антител данного образца свяжется с антигеном, чем в образцах с более высокими концентрациями антител. По этой причине представленная на рис. 1 прямая пропорциональность между окраской лунок и разведением антител (*a*) наблюдаться не будет. Наоборот, будет получена кривая, которая с увеличением концентрации антител в исследуемых образцах все больше будет отклоняться от прямой линии (рис. 1, кривая *b*) и выходить на плато.

Примерно такой же результат будет наблюдаться и в случае, если концентрация вторичных антител, используемых в ELISA, будет недостаточно высокой, а также в том случае, когда полученная в эксперименте окраска лунок окажется слишком интенсивной и из-за этого микрофотокалориметр не сможет правильно измерить их окраску, давая заниженные оценки. Во всех этих случаях в эксперименте будет получена нелинейная зависимость, напоминающая кривую *b* на рис. 1. Очевидно, что упомянутые отклонения от линейной зависимости между концентрацией антител и разведением исследуемых образцов связаны с погрешностями в постановке самого эксперимента. В дальнейшем нас будут интересовать только те случаи, когда наблюдаемые отклонения от прямой пропорциональности у дозозависимых кривых титрования антител связаны не с недостатками в постановке эксперимента, а присущи исследуемым образцам антител в связи с их свойствами.

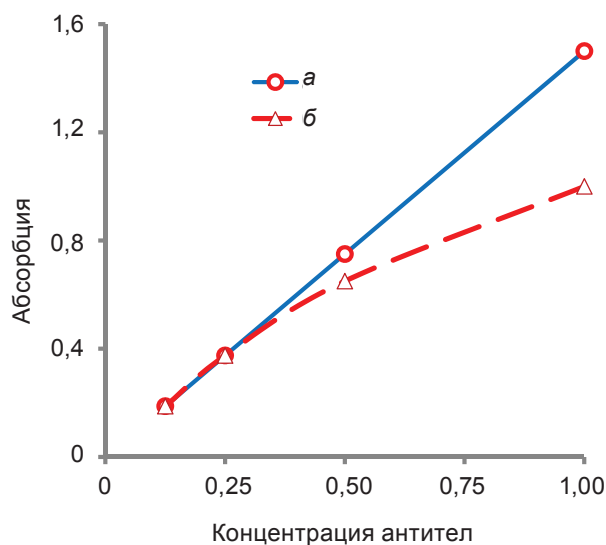


Рис. 1. Лінійна залежність між концентрацією антител в образцах (*a*) і окраскою лунок, отриманих з допомогою ELISA, а також нелінійна залежність між цими характеристиками (*b*), отримувана в експерименті. Об'яснення в тексті

висимих кривих титрування антител пов'язані не з недоліками в постановці експерименту, а присущі досліджуваній зразкам антител в зв'язі з їх властивостями.

Важко відзначити, що при титруванні сировоточних антител з допомогою ELISA практично ніколи не отримуються строго лінійні залежності між концентрацією антител і окраскою лунок, яка пропорційна кількості антител, зв'язаних з сорбированим на платах антигеном. Наоборот, звичайно отримуються криві, які мають досить складний характер, які мають дві точки перегибу, причому іноді отримані криві перетинаються одна з одною, так як вони мають неоднакові кути нахилу при різних розведеннях (рис. 2) [4, 12, 13]. Полагають, що подібний вид кривих титрування сировоточних антител пов'язаний з тим, що сировотки містять велике число клонів антител, які відрізняються по афінності зв'язування з даним антигеном. Оскільки концентрації високо- і низкоафінних антител в різних сировотках можуть сильно відрізнятися, то це може бути причиною перетинаються між собою дозозависимих кривих титрування (рис. 2).

К сожалению, нам не удалось найти в литературе доказательств правильности такой точки зрения, хотя подобные мнения высказываются довольно часто. Попробуем вна-

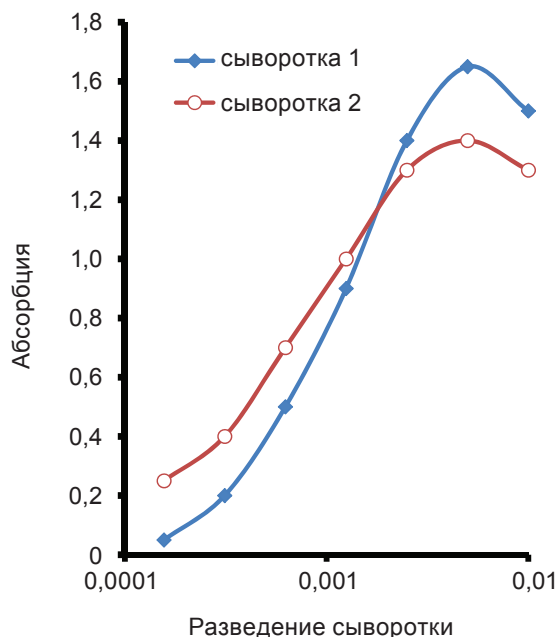


Рис. 2. Дозозависимые кривые, получаемые в эксперименте при титровании иммунных сывороток

чале понять, откуда могло появиться мнение, что больший тангенс угла наклона кривой титрования соответствует большей аффинности титруемых антител. Представим себе, что имеются два образца моноклональных антител, концентрации которых совершенно одинаковы, но аффинность первых антител выше, чем аффинность вторых. Тогда при связывании этих антител с сорбированным антигеном количество связавшихся с антигеном высокоаффинных антител будет несколько выше, чем количество низкоаффинных антител. В связи с этим, полученная линейная зависимость для высокоаффинных антител (рис. 3, прямая *a*) будет иметь немного больший угол наклона, чем такая же зависимость для низкоаффинных антител (рис. 3, прямая *б*).

Таким образом, существующее мнение о том, что при титровании двух видов антител с помощью ELISA антитела с большей аффинностью дадут более крутую дозозависимую кривую, чем низкоаффинные антитела, нельзя считать полностью неправильным. Вместе с тем, необходимо отметить, что подобная точка зрения не может объяснить тот факт, что титрование сывороточных антител практически всегда дает кривые, весьма далекие от линейных зависимостей. Помимо этого отметим, что заметное увеличение аффинности антител может привести только к незначительному увеличению угла наклона кривой титрования.

С другой стороны, увеличение концентрации титруемых антител в несколько раз должно приводить к увеличению угла наклона кривой титрования в такое же количество раз, т.е. этот параметр исследуемого образца антител значительно более существенный для величины тангенса угла наклона данной кривой, чем аффинность антител.

Чтобы продемонстрировать это, представим себе титрование некоего образца антител с помощью ELISA. В результате этого титрования получим зависимость окраски лунок, представленную прямой *1* на рис. 4. Далее за исходные образцы мы примем первоначальный раствор антител, но предварительно разведенный в 2, 4 или 8 раз. Тогда титрование таких предварительно разведенных образцов даст прямые *2*, *3* и *4* (рис. 4), которые соответственно имеют углы наклона в 2, 4 и 8 раз меньше, чем угол наклона прямой *1*. Таким образом, как мы видим из приведенного примера, на величину тангенса угла наклона кривой титрования влияет, в основном, концентрация антител в исследуемом образце, тогда как аффинность данных антител влияет значительно меньше.

Теперь приступим к рассмотрению главного вопроса настоящей работы, а именно: какие факторы могут вызвать заметные искривления дозозависимых кривых титрования сывороточных антител? Здесь уместно

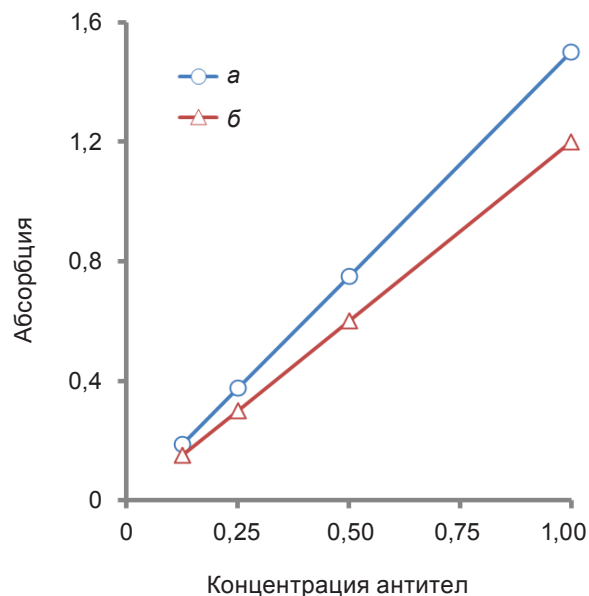


Рис. 3. Предполагаемые линейные зависимости, получаемые при титровании высокоаффинных (*a*) и низкоаффинных антител (*б*) с помощью ELISA

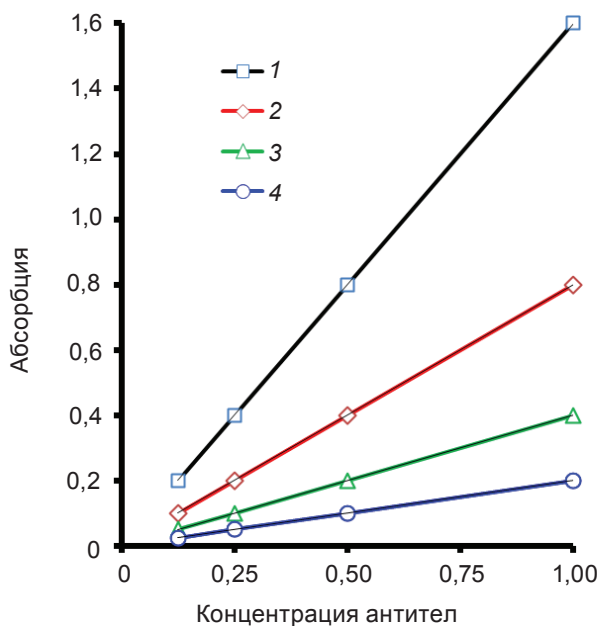


Рис. 4. Предполагаемые линейные зависимости, получаемые при титровании с помощью ELISA исходного образца антител (1) и того же образца антител, но предварительно разведенного в 2, 4 и 8 раз (прямые 2, 3 и 4) соответственно

отметить следующее. Согласно данным, полученным нами ранее, кривые титрования, подобные представленным на рис. 2 или рис. 5 (кривые *a* и *б*) обычно наблюдаются в том случае, если титруется цельная сыворотка человека или животных. Если же из этой сыворотки с помощью аффинной хроматографии выделить специфичные антитела, то их титрование обычно дает линейную зависимость – рис. 5 (кривая *в*) [4]. Эти данные позволяют предположить, что в отличие от препарата очищенных антител, в цельной сыворотке могут присутствовать некоторые факторы, которые приводят к искривлению линейной зависимости. Видимо, при получении очищенных образцов антител эти факторы устраняются, и титрование очищенных образцов антител дает линейную зависимость. Каковы могут быть эти факторы?

Чтобы рассмотреть данный вопрос, используем ранее предложенные нами, так называемые, координаты для синхронного изменения концентрации реагентов [14–16], которые принципиально отличаются от координат Клотца–Скетчерда [17,18]. Суть этого подхода состоит в том, что константу аффинности взаимодействия реагентов можно определить не только для случаев, рассмотренных Клотцем или Скетчердом, т.е. когда концентрация од-

ного из реагентов постоянна, а концентрация другого – постепенно возрастает, но и в том случае, когда концентрации обоих реагентов изменяются синхронно (т.е. обе концентрации одновременно увеличиваются или, наоборот, снижаются в равное количество раз) [19].

Применение этого метода для определения аффинности антител показало, что дозозависимые кривые титрования смеси антител и антигена имеют вид, представленный на рис. 6 (кривая *б*). Очевидно, что отклонение кривой титрования от линейной зависимости (рис. 6, прямая *a*) тем более выражено, чем большая концентрация антигена находится в смеси. Таким образом, разведение смеси антител с антигеном, блокирующим эти антитела, приведет к получению нелинейной зависимости кривой титрования. Наклон этой кривой титрования будет уменьшаться с увеличением концентрации смеси реагентов или же увеличиваться по мере их разведения.

Следует отметить, что сывороточными факторами, влияющими подобным образом на кривые титрования, могут быть не только антигены, но и антиидиотипические антитела [20–22], которые также способны блокировать антитела. Очевидно, что подобный эффект могут вызывать и другие факторы, например, хаотропные ионы SCN⁻, которые при возрастании их концентрации до 2,5–3,0 М препят-

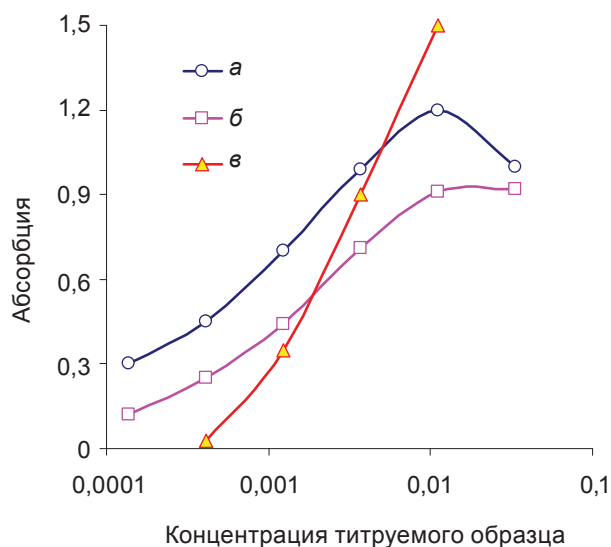


Рис. 5. Дозозависимые кривые титрования сывороточных антител мышей к стафилококку с помощью ELISA для иммунной антисыворотки (*a*), контрольной сыворотки (*б*) и очищенного с помощью аффинной хроматографии образца антител (*в*), полученных из иммунной антисыворотки [4]

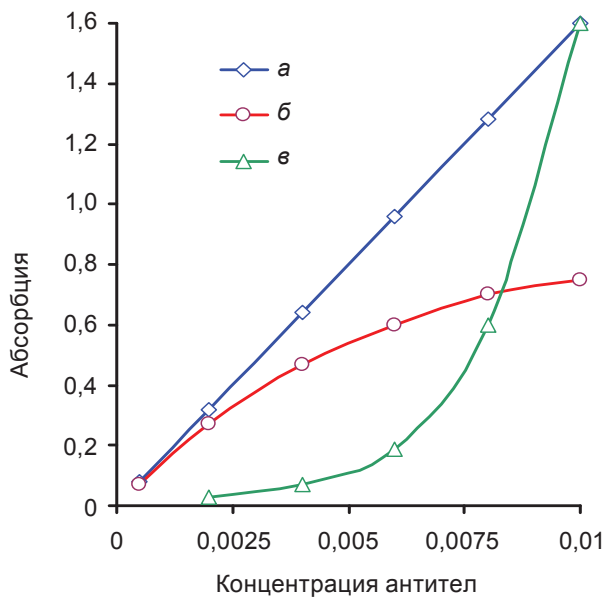


Рис. 6. Дозозависимые кривые титрования антител для случаев, когда образец антител не содержит стимуляторов или супрессоров взаимодействия антиген–антитело (а), когда образец содержит супрессор (б) или стимулятор (в) реакции антиген–антитело

ствуют связыванию антител с антигеном. Следовательно, если имеются два образца антител, которые при исходной концентрации дают одинаковую активность при исследовании их связывания с сорбированным на платах антигеном, причем в первом образце имеются только очищенные антитела, а во втором есть еще и блокирующий антиген, то при титровании этих образцов с помощью ELISA, для первого образца должна получиться линейная зависимость, а для второго — выпуклая кривая (рис. 6, кривая б).

Теперь рассмотрим прямо противоположный вариант. Предположим, что в образце антител имеется некий сывороточный фактор, способствующий взаимодействию этих антител с соответствующим антигеном. Спрашивается, какой вид кривой титрования антител будет получен в данном случае? Очевидно, что если в растворе антител имеется такой фактор, то разведение данного раствора приведет к уменьшению концентрации не только антител, но и данного фактора. Это, в свою очередь, ослабит влияние этого фактора на связывание антител с сорбированным на платах

антигеном и, следовательно, приведет к тому, что количество антител, связавшихся с антигеном будет меньше, чем при оптимальной концентрации стимулирующего фактора. Таким образом, при титровании подобного образца антител, содержащего некий стимулятор реакции антиген–антитело, также должна получиться нелинейная зависимость, но в этом случае кривая будет вогнутой, т.к. активность антител будет снижаться быстрее, чем в том случае, когда образец антител не содержит предполагаемого стимулирующего фактора (рис. 6, кривая в). Отметим, что именно такие кривые титрования были получены нами в эксперименте при титровании ПРИГ в присутствии раствора протамина, который является мощным стимулятором взаимодействия ПРИГ с антигенами.

Суммируя приведенные выше результаты, становится ясным, что вид дозозависимой кривой титрования антител в значительной степени может зависеть как от факторов, препятствующих связыванию антител с антигеном, сорбированным на платах, так и от факторов, способствующих такому связыванию. Наши выводы позволяют сделать следующее предположение относительно поведения сывороточных антител при их взаимодействии с антигенами. Поскольку образцы сывороточных антител при их титровании часто дают дозозависимые кривые, похожие на кривую б (рис. 6), что указывает на присутствие в образцах факторов, блокирующих эти антитела (антигенов или антиидиотипических антител), тогда можно предположить следующее. Если подобный образец антител развести в 100–1000 раз и проинкубировать несколько часов для того, чтобы произошла диссоциация комплексов антиген–антитело (или комплексов антитело–антиидиотипическое антитело), тогда активность антител в таком проинкубированном образце будет заметно выше, чем в точно таком же образце, но разведенном непосредственно перед экспериментом. Отметим, что подобный феномен нами также был обнаружен в эксперименте. Таким образом, предложенная нами интерпретация дозозависимых кривых титрования сывороточных антител позволила предположить поведение данных антител в экспериментах, связанных с титрованием сывороточных антител с помощью ELISA.

АНАЛІЗ КРИВИХ ТИТРУВАННЯ СИРОВАТКОВИХ АНТИТІЛ, ОДЕРЖАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ ELISA

С. О. Бобровник

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

Подано нову інтерпретацію одержаних в експерименті за допомогою методу ELISA дозозалежних кривих титрування для сироваткових або моноклональних антитіл, а також для поліреактивних імуноглобулінів. Показано, що запропонована автором оцінка цих кривих дозволяє одержати додаткову інформацію про присутність в досліджуваних зразках антитіл та про їхні властивості, а також про фактори, блокуючі або такі, що сприяють зв'язуванню антитіл з антигенами, яку раніше не помічали внаслідок неправильного розуміння цього питання.

Ключові слова: антитіла, дозозалежні криві титрування, ELISA.

ANALYSIS OF TITRATION CURVES OF SERUM ANTIBODIES OBTAINED BY ELISA

S. A. Bobrovnik

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

Summary

Different forms of titration curves obtained by ELISA for serum antibodies, monoclonal antibodies and polyreactive immunoglobulins were considered. A new interpretation of dose-dependent titration curves was suggested. It was shown that our interpretation of dose-dependent titration curves for antibodies which are presented in some biological liquids allow obtaining additional information about properties of the samples. This information was not obtained earlier because of the wrong understanding of the considered problem.

Key words: antibodies, dose-dependent titration curves, ELISA.

1. Righetti P. G., Krishnamoorthy F., Lapoumeroulie C., Labie D. // *J. Chromatogr.* – 1979. – **177**. – P. 219–225.
2. Hobler H., Schotterle U., Nickel S. // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1985. – **23**. – P. 89–97.
3. Gianazza E., Miller I., Eberini I., Castiglioni S. // *Electrophoresis.* – 1999. – **20**. – P. 1325–1338.
4. Бобровник С. А. // *Укр. біохім. журн.* – 2003. – **75**, № 4. – С. 139–145.
5. Nielsen J. E. // *Methods Enzymol.* – 2009. – **454**. – P. 233–258.
6. Roelcke D. // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1974. – **2**. – P. 266–280.
7. Bjerrum O. J. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1977. – **472**. – P. 135–195.
8. Williams N. E. // *Methods Cell. Biol.* – 2000. – **62**. – P. 449–453
9. Бобровник С. А. // *Укр. біохім. журн.* – 1990. – **62**, № 5. – С. 86–89.
10. Bobrovnik S. A. // *Comments Molec. Cell. Biophys.* – 1999. – **9**. – P. 323–356.
11. Bouvet J. P., Stahl D., Rose S. et al. // *J. Autoimmun.* – 2001. – **16**. – P. 163–172.
12. Gripenberg M., Nissinen A., Vaisanen E., Linder E. // *J. Clin. Microbiol.* – 1979. – **10**. – P. 279–284.
13. Gripenberg M., Gripenberg G. // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – **62**. – P. 315–323.
14. Бобровник С. А. // *Укр. біохім. журн.* – 1998. – **70**, № 6. – С. 144–146.
15. Бобровник С. А. // *Там само.* – 1999. – **71**, № 5. – С. 110–122.
16. Bobrovnik S. A. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2003. – **55**. – P. 71–86.
17. Klotz I. M. // *Arch. Biochem.* – 1946. – **9**. – P. 109–116.
18. Scatchard G. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1949. – **51**. – P. 660–672.
19. Bobrovnik S. A. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2005. – **65**. – P. 30–44.
20. Jerne N. K. // *Ann. Immunol. (Paris).* – 1974. – **125C**. – P. 373–389.
21. Granato D., Braun D. G., Vassalli P. // *J. Immunol.* – 1974. – **113**. – P. 416–420.
22. Cazenave P. A., Le Guern C., Bona C., Buttin G. // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1980. – **42**. – P. 359–370.

Получено 04.11.2011